



Dissection fonctionnelle des spécificités et des redondances des facteurs de transcription de la famille Ikaros dans les lymphocytes T

Marie Goepp

► To cite this version:

Marie Goepp. Dissection fonctionnelle des spécificités et des redondances des facteurs de transcription de la famille Ikaros dans les lymphocytes T. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ043 . tel-01696561

HAL Id: tel-01696561

<https://theses.hal.science/tel-01696561>

Submitted on 30 Jan 2018

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.



UNIVERSITE DE STRASBOURG
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Thèse présentée par

Marie GOEPP

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Soutenue publiquement le 21 septembre 2015

Dissection fonctionnelle des spécificités et redondances des facteurs de transcription de la famille Ikaros dans les lymphocytes T

Membres du Jury :

Directeur de thèse : Dr Philippe KASTNER

Rapporteur interne : Dr Daniel METZGER

Rapporteur externe : Dr Jacques GHYSDAEL

Rapporteur externe : Dr Jean-Luc VILLEVAL

*« Patience and tenacity are worth more than twice their weight of
cleverness. »*

Thomas Huxley

REMERCIEMENTS

Toutes choses ayant une fin, la fin de ma rédaction de thèse se terminera donc sur cette note plus légère qu'est la rédaction des remerciements.

Tout d'abord un grand merci à Philippe et Susan, mes superviseurs pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire dès le Master 2 afin de préparer la MRT et plus tard le doctorat. Leur encadrement et encouragements m'ont permis de mener à bien mon cheminement scientifique au cours de ce projet.

Je souhaite ensuite remercier les membres de mon jury, Dr Ghysdael, Dr Metzger et Dr Villeval d'avoir accepté de juger mon travail.

Un grand merci à Philippe, Isma, Tom et Peggy qui ont accepté de relire mon manuscrit.

Au bout de quatre années passées dans cette équipe, j'ai pu apprendre que la vie d'un laboratoire est faite de rires, d'entraides, de discussions scientifiques ou non d'ailleurs et de beaucoup de gâteaux (d'ailleurs grand merci à nos pâtisseries émérites Patricia, Beate, Gaëtan et Claudine). Un grand merci à toute l'équipe, d'abord ceux qui sont partis : Alejandra qui a encadré mon stage de M2 avec toute sa gentillesse et sa patience (thanks for the LSR training) ; Deepika et sa bonne humeur ; Jérôme, son humour et ses bons conseils aux quotidiens, (profites bien de ton post-doc) et Apos et sa formation accélérée au clonage.

Puis les présents à ne pas oublier : merci à Isma pour les conseils sur les expériences et pour tous les bavardages, à Attila pour les conseils de Western (qui ont fini par payer), à Patricia pour m'avoir appris le clonage et la culture cellulaire, Beate et son aide en virus (and all my little silly questions) et à Kate pour les rigolades et les discussions sur Eos et Helios (you see we started together we are finishing together).

Passons maintenant dans l'autre box, où je voudrais remercier Rose-Marie sur les précieux conseils de manips et sur comment survivre à sa thèse, Ujjwal you are too nice for your own good, stay like this, Gaëtan et nos conversations sur tout et n'importe quoi... en fait principalement sur n'importe quoi (la fin de thèse aurait été bien moins drôle sans toi), et enfin Peggy qui m'a bien aidé sur un projet qu'elle aura pris en cours de route. Finalement un grand merci aux étudiants Marie-Pierre, Stéphanie, Sophie et Clément (je ne verrai plus jamais les poneys et les lamas de la même manière), pour avoir animé et égayé notre laboratoire.

Pour finir dans l'IGBMC, un grand merci aux équipes Reina, Sexton et ceux de chez Mei Li pour les « journals clubs » et les « labs meetings » du mardi. Un énorme merci au service de culture (que j'ai tellement embêté avec toutes mes lignées), à la plateforme de Biopuces, à Claudine du Facs (avec tous mes tris et mes tubes récalcitrants), et à Doulaye qui m'a tant aidé avec mes transcriptomes. J'aimerais aussi remercier Christine (mon ange caché) pour avoir relu le dossier CAPET et tous les précieux conseils, Valeria (thank you for cheering me up when my mood was down), tout le laboratoire Soutoglou (you are adorable, girls) et pour l'utilisation intensive de votre Lightcycler, Corinne et les discussions du matin, Brahim et toutes ses corrections et son écoute attentive.

Toute l'aventure que représente une thèse n'est pas faite que de celle-ci mais commence bien avant. Je souhaiterais donc remercier Mme Anne-Catherine Schmit, la personne qui m'a donné ma première chance et le goût de continuer dans la recherche, et toutes les autres personnes qui m'ont ensuite soutenu et encouragé au fil des ans et qui se reconnaîtront je pense : Étienne (et les « results » à foison) Jean-Luc (SOS Mac), Barbara (qui malheureusement n'est plus là), Vincent (un stage de rêve au GMGM), Guillaume (je confirme un sujet de recherche c'est velu), Johan (et son humour mordant), Sylvie F. (sa bonne humeur à toute épreuve et son écoute attentive surtout les derniers temps), Aline, Bruno, Cyrille (les curly et notre chromatogramme d'enfer), Guigui, J-C, Roland, Christian, Olivier, Valentin, Anissa, Dessie et Kim (vive les batailles de glace !).

Je voudrais remercier mes amis pour tout le soutien et les encouragements apportés tout au long de ma thèse : Alexis (c'est ton tour bientôt !), Lolo (un énorme merci pour le soutien sonore), et tous les autres qui seraient bien trop nombreux à nommer....

Enfin un remerciement s'impose et il n'est pas des moindres. Je voudrais remercier mes parents et mes grands-parents, pour avoir toujours crus en moi, pour toutes les années à me supporter (notamment mes râleries de fin de thèse), pour leurs encouragements constants et leurs soutiens sans faille. Un grand merci aussi à mon chéri qui a toujours été là pour me soutenir et me réconforter même dans les coups durs. Cela n'aurait pas été pareil sans **VOUS** !!!!!!!

Et finalement je remercie ma « playlist musicale » pour m'avoir permis de garder ma santé mentale tout au long de ces mois, merci Clapton, Dire Straits, Halestorm, Slash, Hendrix, Sinatra, Vaughan, Sarah McLachlan.....

Résumé de thèse

RESUME

Mon projet de thèse se concentre sur l'étude des facteurs de transcription de la famille Ikaros et en particulier sur leurs spécificités fonctionnelles. Cette famille est composée des protéines Ikaros, Helios, Aiolos et Eos. Les différents membres sont exprimés pendant le développement des lymphocytes B et T et régulent la différenciation de ces cellules. Ces protéines présentent une forte homologie de séquences nucléiques et protéiques notamment au niveau des domaines spécifiques. Malgré ces ressemblances structurales importantes, les membres de la famille Ikaros présentent de très fortes divergences dans leurs profils d'expression, leurs fonctions et leurs gènes cibles. Toutes ces protéines présentent un intérêt biologique important puisqu'elles sont toutes, de façon plus ou moins directes, impliquées dans l'apparition de leucémies lymphoblastiques T ou B.

Pour ce faire, j'ai étudié une ligne cellulaire T immature déficiente pour Ikaros qui me permet d'étudier en même temps les différences fonctionnelles et moléculaires des membres de la famille. J'ai pu montrer que la ré-expression d'Ikaros permet la différenciation et la diminution de la prolifération de cette ligne cellulaire; ce qui est aussi le cas pour Aiolos et Helios dans une moindre mesure. J'ai également montré que les différents membres de la famille avaient des capacités distinctes pour activer ou réprimer certains gènes cibles. Ainsi les profils transcriptomiques des lignées exprimant Aiolos et Ikaros montrent des gènes cibles différents pour ces deux gènes, ainsi que des cibles communes. J'ai également procédé à un échange des séquences des domaines de liaison à l'ADN (DBD) entre les protéines Aiolos et Ikaros pour déterminer l'importance de ces domaines dans la régulation des gènes cibles. Mes résultats montrent que la spécificité fonctionnelle est en partie déterminée par le domaine de liaison à l'ADN, mais aussi par les autres régions d'Ikaros et d'Aiolos.

SUMMARY

My thesis project concentrates on the study of the Ikaros transcription factor family and in particular on their functional specificities. This family is made of the proteins Ikaros, Helios, Aiolos and Eos. The various members are expressed during the development of B and T lymphocytes, and regulate the differentiation of these cells. These proteins present a strong homology between their nucleic and protein sequences, in particular at the level of the specific domains. In spite of these important structural resemblances, members of the Ikaros family present very strong differences in their profiles of expression, their functions and their target genes. All these proteins present an important biological interest because they are all, of more or less directly involved in the appearance of lymphoblastiques leukaemia T or B.

I studied an immature T cell line deficient for Ikaros who allows me to study at the same time the functional and molecular differences of members of the family. I was able to show that the re-expression of Ikaros allows the differentiation and the decrease of the proliferation of this cell line; what is also the case for Aiolos and Helios to a lesser extent. I also showed that the various members of the family had different capacities to activate or repress some target genes. So the transcriptomique profiles of the cell lines expressing Helios, Aiolos and Ikaros show different target genes, as well as common target genes. I also proceeded to an exchange of the protein sequences coding for the DNA Binding Domains (DBD) between Aiolos and Ikaros to determine the importance of these domains in the regulation of the target genes. My results show that the functional specificity is partially determined by the DBD domain, but also by the other domains of Ikaros and Aiolos.

Abréviations

ABREVIATIONS

4-OHT : 4-hydroxy-tamoxifen

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIRE : Auto Immune Regulator Element

APC : Allophycocyanin

ARN : Acide Ribonucléique

BCR-ABL : Breakpoint Cluster Region - Abelson murine Leukemia viral oncogene 1

BSA : Bovine Serum Albumine

CD : Cluster de Différenciation

cDNA : Acide désoxyribonucléique complémentaire

CGH : Acide désoxyribonucléique

ChIP : Chromatine Immunoprécipitation

CLP : Progéniteur Commun Lymphoïde

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMP : Progéniteur Commun Myéloïde.

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

Cy 5.5 : Cyanine 5.5

DAPI : 4'6'diamidino-2-phenylindol

DBD : DNA Binding Domain

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DN : Double Négative (cellules)

Dn : Dominant négatif (isoformes)

dNTP : désoxyribonucléotides

DP : Doubles Positives (cellules)

dT : oligo dT

DTT : DiThioThréitol

DZ : Doigt de Zinc (domaines)

EGL : Eminence Ganglionique Latérale

ER : domaine de liaison (récepteur) de l'Estrogène- α humain

EtOH : Ethanol

FC : Fold Change

FoxP3 : Forkhead box P3

FSC : Forward Scatter

GFP : Green Fluorescent Protein

HCl : Acide Chlorhydrique

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

IL : Interleukine

IRES : Internal Ribosome Entry Site

iTreg : Lymphocytes T régulateurs inductibles

KCl : Chlorure de Potassium

kDa : kilodalto

LAL : Leucémie Lymphoblastique Aiguë

LBD : Ligand Binding Domain

Lck : Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LSK : Lineage negative, Sca1 positive, c-kit negative

LT : Lymphocytes T

Mig : pMSCV-IRES-GFP

MO : Moelle Osseuse

MPP : Multipotent Progeniteur

NKT : Natural Killer T cells

nTreg : Lymphocytes T régulateurs naturels

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PE : Phycoérythrine

PerCP : Peridinin Chlorophyll

PIC : Protein Inhibitor Cocktail

PS : Phosphatidyl Sérine

PVDF : Polyfluorure de Vinylidène

RACE-PCR : Rapid Amplification of cDNA-ends - Polymerase Chain Reaction

RBP-J : Recombining Binding protein suppressor of hairless

ROR γ T : Retinoic acid-related orphan receptor γ T

rpm : Rotation par minutes

RPMI : Roswell Mark Memorium Institute

RT-qPCR : Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction

SDS : dodécylsulfate de sodium

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SP : Single Postive (cellules)

SSC : Side Scatter

TBP : TATA-box Binding Protein

Tc : Lymphocyte T cytotoxique

TCR : T cell Receptor

Th : Lymphocyte T helpeur

Treg : Lymphocytes T régulateur

WT : Wild Type (sauvage)

Sommaire

SOMMAIRE

	Page
REMERCIEMENTS	
TABLES DES ILLUSTRATIONS	
ABREVIATIONS	
TABLES DES FIGURES	
INTRODUCTION	1
Partie 1 : Le système hématopoïétique murin	1
1. Généralités	1
2. Les cellules souches hématopoïétiques	3
3. Les cellules érythroïdes	3
4. Les cellules myéloïdes	3
4.1. <u>Les granulocytes</u>	3
4.2. <u>Les monocytes/macrophages</u>	3
5. Les cellules lymphoïdes	4
5.1. <u>Les lymphocytes B</u>	4
5.2. <u>Les lymphocytes T</u>	5
5.3. <u>Les cellules NK</u>	6
6. Les cellules dendritiques	7
Partie 2 : Le compartiment lymphoïde T	8
1. La génération des précurseurs lymphoïdes	8
2. Les différents marqueurs de la différenciation	10
3. Le développement et la maturation des cellules T dans le thymus	11
3.1. <u>Le développement des cellules T immatures : Stade DN1 à DN3</u>	11
3.2. <u>Le réarrangement du TCR</u>	12
3.3. <u>Le développement des cellules T immatures : Stade DN4 à DP</u>	14
3.4. <u>Les sélections positives et négatives</u>	14
4. Les sous-populations de lymphocytes T	15
Partie 3 : Similarités des membres de la famille Ikaros	17
1. Découvertes des membres de cette famille	17
2. Similarités structurales de la famille Ikaros	18
3. Similarités de séquences entre les différents membres	19
4. Isoformes des différents membres de la famille Ikaros	20
5. Similarités fonctionnelles entre les différents membres	21
5.1. <u>Activité répressive de la transcription</u>	22
5.1.1. Répression dépendante des HDAC	22
5.1.2. Répression indépendante des HDAC	23
5.2. <u>Activité inductrice de la transcription</u>	24

Partie 4 : Les différents membres de la famille des facteurs Ikaros	26
1. Le facteur Aiolos (Ikzf3)	26
1.1. <u>L'expression de Aiolos</u>	26
1.2. <u>La fonction de Aiolos in vivo</u>	27
1.2.1. Rôle dans le contrôle de la mort cellulaire programmée	27
1.2.2. Rôle dans les lymphocytes Th17	27
1.2.3. Rôle dans la leucémogénèse	28
1.3. <u>Modèles murins existants pour Aiolos</u>	28
2. Le facteur Helios (Ikzf2)	29
2.1. <u>L'expression de Helios</u>	29
2.2. <u>La fonction de Helios in vivo</u>	29
2.2.1. Rôle dans les cellules T régulatrices	29
2.2.2. Rôle dans la leucémogénèse	30
2.3. <u>Modèles murins existants pour Helios</u>	31
3. Le facteur Ikaros (Ikzf1)	31
3.1. <u>L'expression de Ikaros</u>	31
3.2. <u>La fonction de Ikaros in vivo</u>	32
3.2.1. Rôle durant l'hématopoïèse	32
3.2.2. Rôle dans les lymphocytes T	32
3.2.3. Rôle dans la leucémogénèse	33
3.3. <u>Modèles murins existant pour Ikaros</u>	34
3.3.1. La mutation dominant négatif : Ik ^{DN}	34
3.3.2. La mutation nulle : Ik ^{-/-}	34
3.3.3. La mutation plastic : Ik ^{plstc}	35
3.3.4. La mutation hypomorphique : Ik ^{L/L}	36
3.3.5. La mutation conditionnelle : Ik ^{f/f} Mb1-Cre ⁺	36
MATERIELS ET METHODES	39
1. Cellules et culture cellulaire	39
1.1. <u>Lignées cellulaires</u>	39
1.2. <u>Génération de constructions chimériques : AdI et IdA</u>	40
1.3. <u>Conditions de culture</u>	41
1.4. <u>Traitement des cellules au 4-hydroxytamoxifen</u>	42
2. Clonage et vecteurs utilisés	42
2.1. <u>Vecteurs rétroviraux</u>	42
2.2. <u>Production des vecteurs</u>	43
2.3. <u>Production des virus</u>	43
2.4. <u>Obtention des lignées cellulaires stables par transduction rétrovirale</u>	43
3. Analyse par cytométrie en flux	44
3.1. <u>Tri des cellules GFP+ pour la création des lignées stables</u>	44
3.2. <u>Analyse de la différenciation</u>	44
3.3. <u>Analyse du nombre de cellules</u>	45
3.4. <u>Analyse de l'apoptose cellulaire</u>	45
3.5. <u>Marquage intracellulaire</u>	45
4. RT-qPCR	46
4.1. <u>Extraction de l'ARN</u>	46
4.2. <u>Transcription inverse</u>	46
4.3. <u>qPCR</u>	47
4.4. <u>Analyse des RT-qPCR</u>	49
4.4.1. <u>Au niveau du Light Cycler</u>	49

4.4.2. Au niveau d'Excel	49
5. Western Blot	49
5.1. Extractions protéiques	49
5.2. Gels SDS-PAGE, transfert et incubation des anticorps	50
6. Puces à oligonucléotides Affymetrix	51
6.1. Hybridation des puces à oligonucléotides Affymetrix.	51
6.2. Analyse des données générées par les puces Affymetrix.	51
RESULTATS	52
Préambule	52
Partie 1 : Etablissement des lignées cellulaires	53
1. Génération des lignées	53
1.1. Caractéristiques de la lignée cellulaire ILC87	53
1.2. Génération des lignées cellulaires dérivées de la lignée ILC87	54
2. Caractérisations des lignées cellulaires	55
2.1. Vérification des lignées cellules réalisées	55
2.2. Vérification de l'induction des lignées cellulaires.	55
2.3. Caractérisation du profil de CD4/CD8 des lignées ILC87 non induites	59
Partie 2 : Aiolos et Helios sont-ils capables de réguler des gènes spécifiques ?	60
1. Aiolos et Helios semblent capables d'induire une régulation transcriptionnelle indépendante de celle d'Ikaros de manière limitée.	60
1.1. Identification d'une vingtaine de gènes spécifiquement régulés par Helios	60
1.2. Aiolos ne semble pas pouvoir réguler spécifiquement des gènes cibles.	62
2. Identification de gènes spécifiquement régulés par Helios	65
3. La translocation d'Ikaros dans le noyau a un effet plus rapide que celle d'Aiolos	68
3.1. Vérification de l'induction des lignées cellulaires	68
3.2. Analyse de l'effet temporel de Aiolos sur les gènes cibles d'Ikaros	69
3.3. Analyse de l'action cinétique d'Aiolos sur ses gènes cibles	71
4. Quelle est l'implication du DBD dans la régulation génique ?	73
Partie 3 : Aiolos et Helios ont-ils un rôle dans la différenciation cellulaire ?	76
1. Aiolos et Helios permettent une expression faible des marqueurs cellulaires CD4 et CD8 α .	76
2. Aiolos et Helios entraînent une différenciation partielle des cellules T immatures.	77
3. Le taux de CD4/CD8 α est fonction du niveau d'expression des protéines de la famille.	79
4. Helios n'entraîne pas la spécification des cellules en cellules Treg.	81
Partie 4 : Aiolos et Helios ont-ils un rôle dans la prolifération cellulaire ?	84
1. Aiolos et Helios entraînent une diminution de la croissance cellulaire.	84
2. Aiolos ne semble pas induire de mort cellulaire par apoptose.	85
	89

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Partie 1 : Implication des facteurs de la famille Ikaros dans la différenciation et la spéciation des lymphocytes T	89
1. Aiolos et Helios semblent être capables de remplacer Ikaros de façon limitée lors de la différenciation des lymphocytes T	89
2. Helios semble incapable de permettre l'apparition de cellules de type Treg	91
3. Aiolos pourrait être à l'origine de l'apparition de cellules de type Th17	92
4. Les facteurs de la famille Ikaros ont-ils la possibilité de générer d'autres sous-types ?	93
Partie 2 : Implication des facteurs de la famille Ikaros dans le contrôle de la prolifération des lymphocytes T	95
1. La mort des cellules est-elle due à une diminution de la croissance cellulaire ?	95
2. Y- a - t'il une action des protéines de la famille Ikaros sur le contrôle du cycle cellulaire ?	98
Partie 3 : Helios semble capable de réguler des gènes spécifiques	100
1. Les gènes activés par le facteur Helios	100
2. Les gènes réprimés par le facteur Helios	101
Partie 4 : Y- a- t'il une collaboration possible entre les facteurs Aiolos et Ikaros dans le développement des lymphocytes T ?	102
1. Détermination de gènes co-régulés suggérant une collaboration entre Aiolos et Ikaros	102
2. Quelle est l'importance des domaines DBD dans la régulation des différents gènes cibles ?	105
3. La collaboration de Aiolos et Ikaros peut-elle être mise en place de façon chronologique ?	106
Partie 5 : Conclusion générale	107
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	108

Table des figures

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Numéro de figure		Page
INTRODUCTION		
I1	Le système hématopoïétique humain.	2
I2	Schéma de l'engagement des précurseurs hématopoïétiques dans la lignée lymphoïde de la moelle osseuse au thymus (Wu <i>et al.</i> , 2006).	8
I3	Marqueurs phénotypiques caractérisant les différentes sous-populations immatures (Rothenberg <i>et al.</i> , 2008).	10
I4	Représentation des phases du développement et de spéciation des lymphocytes T dans le thymus (Rothenberg <i>et al.</i> , 2008).	11
I5	Représentation schématique du processus de réarrangement du locus de la chaîne du TCR β (adapté de Tourigny <i>et al.</i> , 1997).	13
I6	Structure générale des protéines de la famille Ikaros.	18
I7	Analyse des identités de séquences entre les doigts de zinc des différentes protéines.	19
I8	Structure des isoformes des protéines Ikaros, Aiolos et Helios (adapté Rebollo <i>et Schmitt</i> , 2003).	21
I9	Représentation schématique des domaines fonctionnels d'Ikaros (Koipally <i>and Georgopoulos</i> , 2002)	22
I10	Schémas des modes de répression médiés par Ikaros (Koipally <i>and Georgopoulos</i> , 2002).	24
I11	Schéma des modes d'activation potentiels médiés par Ikaros (Koipally <i>et al.</i> , 2002).	25
I12	Schéma de l'implication des facteurs de la famille Ikaros dans la lignée lymphoïde de la moelle osseuse au thymus (Wu, 2006).	26
MATERIEL ET METHODE		
M1	Structure génique de la lignée cellulaire ILC87 réalisée	39
M2	Schéma de la construction des lignées chimériques ILC87-AdI-ER et ILC87-IdA-ER dans le vecteur rétroviral pMig	41
RESULTATS		
R1	Identification des caractéristiques de la lignée ILC87	53
R2	Structure des différentes constructions insérées dans les différentes lignées cellulaires créées à partir de la lignée ILC87	54
R3	Tri des populations cellules GFP+ formant les différentes lignées	55
R4	Comparaison des niveaux d'expression de la GFP des différentes lignées	56
R5	Quantification protéines rétrovirales exprimées dans les différentes lignées cellulaires non induites par Western Blot totaux	57
R6	Vérification de la localisation des protéines des différentes lignées cellulaires	58
R7	Analyse de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 α par cytométrie en flux dans des lignées non induites	59

R8	Représentation graphique « Heatmap » comparant les résultats issus des analyses transcriptomiques des lignées ILC87-Helios-ER et ILC87-Ikaros-ER après 24 heures de traitement au 4-OHT	61
R9	Schéma de l'analyse d'une représentation graphique des données de transcriptomique sous forme de « Scatter plot	62
R10	Analyse de l'expression de gènes cibles de Ikaros	63
R11	Représentation graphique « Scatter plot » comparant les résultats issus des analyses transcriptomiques des lignées ILC87-Aiolos-ER et ILC87-Ikaros-ER après 24 heures de traitement au 4-OHT	63
R12	Analyse de l'expression de potentiels gènes cibles de Aiolos	64
R13	Représentation graphique sous forme de diagramme de Venn et de graphique des gènes Induits (Up) et Réprimés (Down) dans les lignées cellulaires exprimant Helios ou Ikaros	66
R14	Analyse de l'expression de potentiels gènes cibles de Helios	67
R15	Vérification de la localisation des protéines des différentes lignées cellulaires	69
R16	Analyse de l'expression de gènes cibles de Ikaros	70
R17	Analyse de l'expression de gènes cibles de Aiolos	72
R18	Représentation graphique « Scatter plot » comparant les résultats issus des analyses transcriptomiques des lignées ILC87-Aiolos-ER, ILC87-Ikaros-ER, ILC87-AdI-ER et ILC87-IdA-ER après 24 heures de traitement au 4-OHT	73
R19	Représentation graphique de l'analyse de l'expression des différents gènes issus des lignées cellulaires exprimant les facteurs de transcription	74
R20	Quantification des marqueurs CD4 et CD8 α par qPCR	76
R21	Différenciation des lignées cellulaires ILC87	78
R22	Analyse de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 en fonction du niveau d'expression de la GFP	79
R23	Analyse de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 en fonction du niveau d'expression de la GFP	80
R24	Analyse de l'expression du facteur FoxP3 dans les cellules ILC87	82
R25	Analyse de la croissance cellulaire des cellules ILC87	84
R26	Analyse du nombre de cellules vivantes au cours du temps après traitement au 4-OHT	86
R27	Analyse de l'apoptose des cellules au bout de 24 heures de traitement au 4-OHT	87

DISCUSSION

D1	Schéma représentant l'impact potentiel des membres de la famille Ikaros dans l'apparition des différents sous-types de cellules CD4+ (Adapté de O'Shea <i>et al.</i> , 2010).	94
D2	Schéma représentant l'action potentielle des membres de la famille Ikaros dans la régulation du phénomène d'apoptose.	97

Introduction

Partie 1 :
Le système hématopoïétique murin

Partie 1 : Le système hématopoïétique murin.

1. Généralités.

Le système hématopoïétique murin, comme celui de tous les mammifères est en constant développement depuis le stade fœtal, jusqu'à la vie adulte. Il est composé de cellules matures spécialisées présentant différentes caractéristiques morphologiques et fonctionnelles. Les cellules peuvent avoir une activité immunitaire ou non. Toutes les cellules sanguines proviennent d'une population de cellules pluripotentes, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentent dans la moelle osseuse des organismes (MO). Ces cellules ont la capacité de se multiplier à l'infini et peuvent se différencier pour générer trois lignages cellulaires distincts : les cellules myéloïdes, lymphoïdes ou érythrocytaires (**Figure I1**). Chacun de ces lignages est constitué de différents types cellulaires présentant des caractéristiques qui leurs sont propres sur les plans morphologiques et fonctionnels. La première étape de cette croissance hiérarchique est la génération de cellules progénitrices. Ces cellules sont directement issues des CSH. Elles présentent des caractéristiques d'auto-renouvellement réduites par rapport à celles-ci et sont à l'origine des trois lignages cellulaires précédemment cités.

2. Les cellules souches hématopoïétiques.

Les **cellules souches hématopoïétiques** (CSH) sont les cellules à l'origine de toutes les lignées de cellules sanguines présentes durant l'hématopoïèse (Challen *et al.*, 2009). Ces cellules sont très peu nombreuses dans la MO (0,01 % des cellules nucléées chez la souris). Elles sont capables de s'auto-renouveler par un système de division dit asymétrique. En effet à chaque cycle de division, elles donnent naissance à une cellule fille qui pourra se diviser et deviendra un progéniteur multipotent (MPP), et à une cellule fille souche, qui permettra le renouvellement du pool de CSH. Les cellules MPP se diviseront à leur tour en cellules plus différenciées, les progéniteurs communs qui deviendront des cellules matures (Blank *et al.*, 2008).

Les CSH peuvent être classées en deux catégories :

- les LT-CSH ou CSH de long-terme, qui peuvent s'auto-renouveler indéfiniment et qui se différencient en la seconde catégorie de CSH.
- Les ST-CSH ou CSH de court-terme, qui peuvent uniquement s'auto-renouveler

pendant une période de temps définie de quelques semaines (Morrison *et al.*, 1995) ; ces cellules se différencieront en MPP, en cellules progénitrices (CLP, CMP, GMP ou MEP), puis en cellules de plus en plus matures.

Les différentes cellules progénitrices donneront les différentes lignées hématopoïétiques observées. Les CLP (Précurseur Lymphoïde Commun) permettent d'obtenir le lignage lymphoïde : cellules B, T, NK ou dendritiques (Kondo *et al.*, 1997). Les CMP (Progéniteur Myéloïde Commun) se diviseront en GMP (Progéniteur Granulo-Myelomonocytaire) et en MEP (Progéniteur Erythro-mégacaryocytaire). Les cellules GMP permettent d'obtenir les monocytes (macrophages), et tous les granulocytes (éosinophiles, basophiles, neutrophiles et mastocytes). Les MEP donneront naissance à la lignée érythrocytaire : érythrocytes et mégacaryocytes (plaquettes).

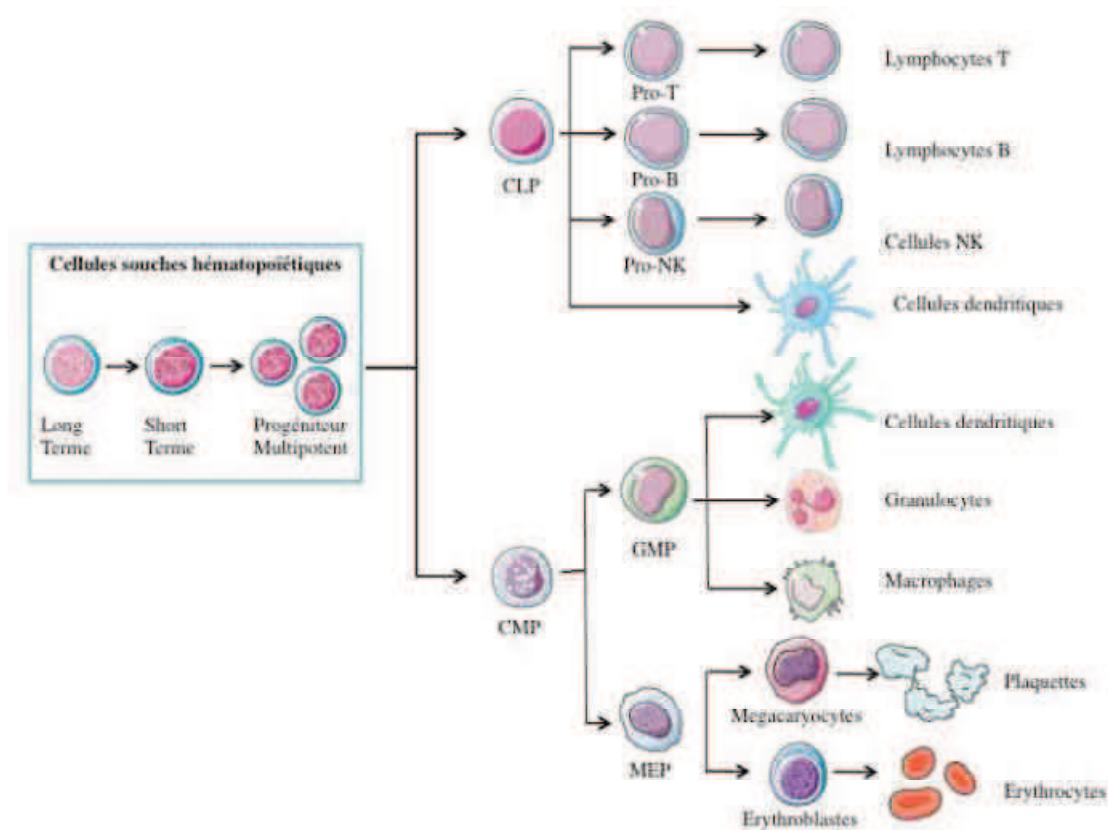


Figure I1 : Le système hématopoïétique humain (source personnelle).

Un modèle de différenciation des cellules hématopoïétiques à partir des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) qui se différencient en progéniteur lymphoïde ou myéloïde. La différenciation du Progéniteur Lymphoïde Commun (CLP) donne les différentes cellules lymphocytaires, les cellules NK et un des sous-types des cellules dendritiques. Le Progéniteur Myéloïde Commun (CMP) donne les érythrocytes, granulocytes et macrophages ainsi que les plaquettes. CLP: Progéniteurs des cellules Lymphoïdes; CMP: Progéniteurs des cellules Myéloïdes; GMP: Progéniteurs des cellules Myélo-monocytaires; MEP: Progéniteurs des cellules Myélo-érythroïdes.

3. Les cellules érythroïdes.

Les cellules de la lignée érythroïde et les cellules mégakaryocytaires ne présentent pas de fonction immunitaire, alors que toutes les autres cellules issues des CSH présentent des fonctions immunitaires (cellules lymphoïdes, myéloïdes et dendritiques). Les **érythrocytes**, ou globules rouges transportent l'oxygène dans l'ensemble de l'organisme. Les **mégacaryocytes** sont des cellules polyploïdes géantes qui, par fragmentation cytoplasmique, forment les plaquettes qui sont responsables de l'hémostase (réparation des vaisseaux sanguins).

4. Les cellules myéloïdes.

Le précurseur myéloïde commun (CMP) donne les cellules myéloïdes qui ont un rôle dans l'immunité innée : granulocytes, macrophages, et cellules dendritiques. Elles sont présentes dans la plupart des tissus de l'organisme.

4.1. Les granulocytes.

Les **granulocytes** (dont le nom vient des granules présents dans le cytoplasme) présentent un noyau polylobé. Ils ont une durée de vie courte. Ils sont présents dans le sang et en cas d'infection migrent vers le site d'infection et prolifèrent, en créant une réponse inflammatoire. Il en existe plusieurs types qui sont différenciés par leur capacité à absorber des colorants neutres, basiques, ou acide (éosine). Les neutrophiles peuvent phagocyter les pathogènes présents dans l'organisme. Les basophiles, éosinophiles et mastocytes sont recrutés lors des réactions inflammatoires ; en particulier les mastocytes qui sont capables de libérer des histamines. Les éosinophiles sont aussi mobilisés dans la défense contre les parasites.

4.2. Les monocytes/macrophages.

Les **monocytes** sont issus de la différenciation des cellules GMP présentes dans le sang. Une fois parvenus dans les tissus ils se différencient en macrophages. Les **macrophages** sont très efficaces dans l'élimination de pathogènes de par leur capacité phagocytaire. Ce phénomène permet la mort de l'agent infectieux par la sécrétion de molécules toxiques dans le phagosome : peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), anion super-oxyde (O_2^-), et oxyde nitrique (NO). Ils peuvent aussi participer à la défense immunitaire par d'autres biais : attraction des neutrophiles par la production de chimiokines, perméabilisation des vaisseaux sanguins pour augmenter l'infiltration tissulaire. Ils peuvent activer la réponse immunitaire adaptative en activant les cellules T par la présentation d'antigènes via la molécule de CMH (rôle de CPA).

5. Les cellules lymphoïdes.

Le **précurseur lymphoïde commun** (CLP) donne les lymphocytes qui ont un rôle dans l'immunité adaptative ainsi que des cellules dendritiques. Il en existe deux types principaux : les lymphocytes B ou cellules B et les lymphocytes T ou cellules T. Ces cellules sont les principaux acteurs de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules NK font aussi partie du compartiment lymphoïde, mais participent à la réponse immunitaire innée.

5.1. Les lymphocytes B

Les **lymphocytes B** sont les cellules responsables de l'immunité humorale de par leur capacité à produire des anticorps. Ils représentent environ 5 à 15 % des lymphocytes circulants et sont définis par la présence d'immunoglobulines (Ig) de surface, qui permettent la reconnaissance des antigènes spécifiques des LB. Les immunoglobulines produites par la cellule jouent le rôle de récepteur spécifique pour l'antigène (BCR). Les cellules B sont générées dans la MO, où elles passeront par différentes étapes de maturation. Elles vont ensuite migrer dans la rate et devenir des LB transitionnels, puis des cellules B matures (Hardy *et al.*, 2007). Les lymphocytes B une fois activés, se différencient en plasmocytes sécrétant des anticorps. Ils peuvent aussi lors d'une réaction immunitaire, acquérir un phénotype quiescent et devenir des lymphocytes B mémoires, qui seront réactivés lors d'une infection ultérieure par le même pathogène, ce qui donnera une réaction immunitaire plus efficace. Ce sont ces cellules qui sont impliquées lors du processus de vaccination. Les fonctions effectrices des LB sont de différents types : anticorps liant les pathogènes, neutralisation des pathogènes, opsonisation, activation du système du complément.

L'ontogenèse des cellules B est réalisée en deux phases successives :

- une phase indépendante de l'antigène qui se déroule dans la moelle osseuse et aboutit à la génération de lymphocytes B immatures exprimant une immunoglobuline de surface capable de reconnaître un antigène. Elle est formée des stades CLP -> Pré-pro-B -> Pro-B -> Pré-B -> B immature.
- une phase dépendante des antigènes du soi d'abord puis du non-soi en périphérie au niveau des organes lymphoïdes secondaires (rate). Elle aboutit à la formation de plasmocytes et de cellules B mémoires spécifiques d'un antigène.

Les premières étapes du développement sont dépendantes du micro-environnement particulier apporté par les cellules stromales de la moelle osseuse. Ces cellules stromales permettent de

réguler la croissance, la maturation et la survie des précurseurs par l'intermédiaire des facteurs de croissance, cytokines et chémokines émises par celles-ci (par exemple IL7, SCF, SDF-1) et de contacts entre les cellules. De part la nature aléatoire du réarrangement du BCR, une étape de sélection négative permet d'éliminer les cellules possédant des immunoglobulines membranaires spécifiques pour les antigènes du soi pendant le stade B immature. Les cellules survivantes quittent alors la MO pour se rendre dans la rate, où se passeront les étapes de différenciation des cellules B matures.

Au cours de la différenciation des cellules B matures de nombreux facteurs de transcription se fixent sur les séquences promotrices et activatrices de gènes impliqués dans la quiescence, la survie, la différenciation et la mort des lymphocytes B. Un certain nombre de ces facteurs de transcription apparaissent comme indispensables à ces étapes : PU1 (ou Spi-1) semble être nécessaire à faible dose, pour le développement des cellules B (DeKoter et Singh, 2000). Les facteurs E2A, EBF1 (Early B cell Factor), Pax5 et Ikaros sont nécessaires à leur développement : les souris E2A^{-/-} ne présentent pas de cellule pro-B et présentent une absence de cellule B mature (Bain *et al.*, 1997), ce qui est observé aussi dans le cas des souris déficientes pour EBF (Lin et Grosschedl, 1995), Pax5 (Urbanek *et al.*, 1994) et Ikaros (Kirstetter *et al.*, 2002).

5.2. Les lymphocytes T.

Les **lymphocytes T $\alpha\beta$** seront présentés en détail dans la partie 2 de l'introduction notamment leur génération. Je vais cependant présenter leurs fonctions générales dans le système immunitaire ainsi que sur les cellules T « non-classiques ».

Après l'activation des cellules LT naïves, celles-ci peuvent devenir soit des cellules T « auxiliaires » CD4⁺ (LTh) ou « cytotoxiques » CD8⁺ (LTc). Les LT_c (CD8⁺) peuvent éliminer les cellules infectées par des virus ou autres parasites et jouent un rôle dans la lyse des cellules tumorales. Les LT_h (CD4⁺) sont des cellules activatrices des lymphocytes B et des macrophages. Elles modulent l'action du système immunitaire grâce à un panel de cytokines.

Et pour finir les lymphocytes T « régulateurs » (Treg) qui sont aussi T CD4⁺ ont la capacité d'inhiber la prolifération et l'expansion des autres types de cellules T dites lymphocytes T effecteurs en comparaison (LTc et LTh). Leur expression est nécessaire au maintien de la tolérance immunitaire (**Figure I3**).

A côté des lymphocytes $T\alpha\beta$ dit « classiques » on distingue d'autres populations de lymphocytes T qui ont une ontogénie différente et surtout une diversité beaucoup plus restreinte :

- **les lymphocytes $T\gamma\delta$** : ils sont considérés comme faisant partie du système immunitaire inné. Ils ont un phénotype similaire aux lymphocytes $\alpha\beta$ (les $LT\gamma\delta$ matures ont un phénotype double-négatif DN, ou simple positif SP $CD8^+$, ou exceptionnellement SP $CD4^+$), mais ils ne passent pas par les mêmes étapes de différenciation intra-thymique, car la séparation entre les deux lignées apparaît très tôt dans le processus ; Ils sont essentiellement présents dans les tissus, les muqueuses et la peau et ils ne reconnaissent pas des épitopes classiques mais plutôt des épitopes conservés au sein des pathogènes (non circonscrits au CMH).

- **les lymphocytes NKT** : ces cellules partagent des caractéristiques propres aux lymphocytes T ($CD3$) mais également aux lymphocytes NK ($CD56$ et $CD16$). Le TCR des cellules NKT est cependant considéré comme quasi invariant. La chaîne α est toujours formée des segments génétiques $V\alpha14$ et $J\alpha18$ recombinaison de façon stochastique, mais les chaînes β présentent une diversité beaucoup plus restreinte que dans le cas des lymphocytes $\alpha\beta$ classiques. Le TCR ainsi formé reconnaît non pas des peptides présentés par le CMH mais des lipides et des glycolipides présentés par la molécule $CD1d$. Ces cellules sont faiblement présentes dans le sang (0,001 à 3 % des lymphocytes circulants), mais ont un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires et leur absence, ou dysfonction, sont à l'origine de pathologies auto-immunes, inflammatoires ou tumorales.

5.3. Les cellules NK

Les **cellules NK** ou Natural Killer sont des cellules cytotoxiques appartenant au lignage lymphoïde. Elles sont considérées comme de grands lymphocytes granuleux (présence de granules cytoplasmiques), en comparaison avec les cellules T ou B (petits lymphocytes). Elles n'expriment pas les marqueurs spécifiques des cellules T ($CD3$) ou B ($CD19$, $Ig\alpha-\beta$), mais possèdent un récepteur invariant. Elles font partie des cellules ILC1 (Innate Lymphoïde Cells) et sont caractérisées par leur capacité à avoir une activité cytotoxique spontanée sans activation préalable par les CPA, comme les cellules LT cytotoxique (Kiessling *et al.*, 1975). Elles produisent de l'interféron γ et du TNF et sont activées par interférons et cytokines produites par les macrophages. Elles participent notamment à la réponse immunitaire innée contre les virus et jouent un rôle important dans l'élimination des cellules tumorales.

6. Les cellules dendritiques.

Les **cellules dendritiques** sont issues à la fois des lignées lymphoïdes et myéloïdes, mais partagent un marqueur commun, l'intégrine Cd11c. Il existe en tout 3 types de cellules dendritiques : les cellules dendritiques lymphoïdes, myéloïdes et plasmacytoïdes.

Les cellules dendritiques lymphoïdes et myéloïdes partagent certains marqueurs de surface caractéristiques des cellules myéloïdes Cd11b (Vremec *et al.*, 2000) et lymphoïdes CD8 α (Wu *et al.*, 1996). Ces cellules sont des CPA ou Cellules Présentatrices d'Antigènes et permettent l'activation de la défense immunitaire acquise. Les DC immatures circulent dans le sang sous forme immature et s'activent lorsqu'elles rencontrent un pathogène, puis migrent vers les ganglions lymphatiques afin d'induire la réponse immunitaire adaptative par activation des cellules T. Lors de la rencontre avec un pathogène, elles deviennent plus matures et ingèrent les antigènes à présenter par pinocytose et phagocytose. Ces cellules sont spécialisées dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes et jouent un rôle central au cours de la réaction immunitaire.

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes ne possèdent pas la même morphologie que les autres cellules dendritiques (absence d'expansion cytoplasmique et absence de dendrite), et expriment des marqueurs de surface qui leur sont propres (B220, 120G8 et SiglecH). Elles participent à la réaction immunitaire contre certaines infections virales grâce à leur forte sécrétion d'interférons (IFN α et IFN β) et apparaissent comme un lien important entre la réponse innée et adaptative.

Partie 2 :

Le compartiment lymphoïde

Partie 2 : Le compartiment lymphoïde T

Le compartiment lymphoïde est constitué des cellules B, $T\alpha\beta$, $T\gamma\delta$ et NKT présentées précédemment. Dans cette partie je m'intéresserai et développerai les étapes de la différenciation permettant l'obtention des cellules $T\alpha\beta$, ainsi que leurs sous-types et fonctions.

1. La génération des précurseurs lymphoïdes

Chez les mammifères, le foie fœtal (site de l'hématopoïèse fœtale) produit des cellules CSH, qui migreront dans la moelle osseuse (MO) avant la naissance. Les cellules souches sont différenciées par l'expression des marqueurs de surface, ce qui permet de définir leur stade de différenciation à partir des CSH les plus primitives (**Figure I2**).

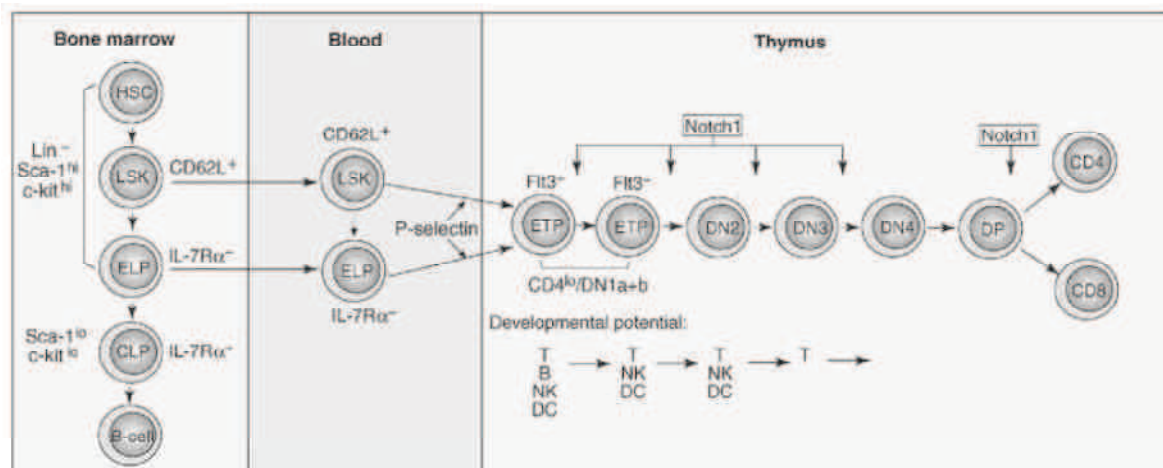


Figure I2 : Schéma de l'engagement des précurseurs hématopoïétiques dans la lignée lymphoïde de la moelle osseuse au thymus (Wu, 2006).

HSC ou CSH : Hématopoïétique Stem Cell ; LSK : $Lin^-Sca1^+c-Kit^+$; ELP : Early Lymphoid Progenitor ; CLP : Common Lymphoid Progenitor ; ETP : Early T Cell Progenitor ; DN : Double Negative ; DP : Double Positive.

A partir de là les CSH ou HSC se différencient en précurseurs plus primitifs appelés LSK et présentent un phénotype de type $Lin^-Sca1^+c-Kit^+$ (Ikuta and Weissman, 1992 ; Spangrude *et al.*, 1988). Elles se différencient en cellules nommées ELP ($Lin^-Sca1^+c-Kit^+Flt3^+CD27^+IL7R\alpha^{+/-}$) qui sur-expriment les gènes RAG1 et RAG2 qui sont impliqués dans la recombinaison des gènes VDJ formant le TCR (Igarashi *et al.*, 2002).

Trois possibilités s'offrent aux cellules à partir de ce moment. Les ELP présentes dans la MO peuvent se différencier en cellules CLP ($Lin^-Sca1^{low}c-Kit^{low}Flt3^+CD27^+IL7R\alpha^+$), qui ont le potentiel pour devenir des cellules de lignages lymphoïdes, mais pas myéloïdes (Kondo *et al.*, 1997). Les ELP (exprimant PSGL1 ou P-Selectin Glycoprotein Ligand 1) et les LSK

(exprimant le marqueur CD62L ou L-Selectine) peuvent migrer dans la circulation sanguine et coloniser le thymus via sa jonction cortico-médullaire, en se liant respectivement aux récepteurs CD34 et aux molécules de P-Selectin exprimés par les cellules de l'endothélium thymique.

Ces cellules peuvent ensuite se différencier en précurseurs thymiques ou ETP (Rossi *et al.*, 2005). Les cellules ETP représentent seulement 0,01 % des cellules thymiques ($\text{Lin}^- \text{CD4}^{\text{lo}} \text{Sca1}^+ \text{cKit}^+ \text{CD24}^{\text{int}} \text{CD25}^- \text{CD44}^+ \text{CMHI}^+$) et sont capables de générer toutes les cellules de la lignée lymphoïde : T, B, NK et DC (Wu *et al.*, 1991). Le stade suivant leur fait perdre l'expression de Flt3, au profit de celui de CD4 (stade DN1), réduisant ainsi les possibilités puisque ces cellules deviennent incapables de générer des lymphocytes B. Les cellules DN1 se différencient alors en cellules DN2, DN3 et enfin DN4, tout en réduisant leur potentiel de différenciation. A partir du stade DN3, le destin des cellules est limité aux lymphocytes T (Godfrey *et al.*, 1992).

2. Les différents marqueurs de la différenciation

Les étapes de la différenciation des lymphocytes T ont été phénotypiquement caractérisées et permettent un suivi de l'état de maturation fonctionnelle de la cellule. Deux systèmes ont été proposés pour caractériser les différentes étapes du développement des cellules T, l'un calqué sur l'une des nomenclatures des cellules B (Rolink *et al.*, 1994), l'autre basé sur l'expression des marqueurs de surface (Ceredig and Cummings, 1983; Godfrey and Zlotnik, 1993).

La différenciation des cellules T est divisée en deux parties grâce à l'expression des protéines de surface cellulaires co-réceptrices CD4 et CD8. Les cellules immatures $\text{CD4}^- \text{CD8}^- \text{CD3}^-$ (double négative ou DN) se différencient de façon transitoire en cellules dites ISP $\text{CD4}^- \text{CD8}^+ \text{CD3}^{\text{low}}$ (Intermédiaire Single Positive), puis en thymocytes $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+ \text{CD3}^{\text{low}}$ (double positive ou DP), puis évoluent vers les stades $\text{CD4}^+ \text{CD8}^- \text{CD3}^+$ ou $\text{CD4}^- \text{CD8}^+ \text{CD3}^+$ (simple positive ou SP). Les stades DN sont subdivisés en 4 populations selon l'expression des marqueurs CD44 et CD25 (Godfrey *et al.*, 1993) : DN1 ($\text{CD44}^+ \text{CD25}^-$), DN2 ($\text{CD44}^+ \text{CD25}^+$), DN3 ($\text{CD44}^- \text{CD25}^+$) et DN4 ($\text{CD44}^- \text{CD25}^-$).

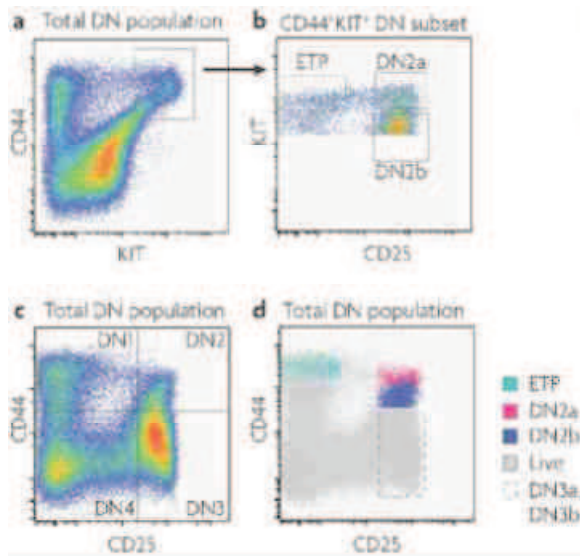


Figure I3 : Marqueurs phénotypiques caractérisant les différentes sous-populations immatures (Rothenberg *et al.*, 2008).

- Profil d'expression de cytométrie en flux des marqueurs CD44 et cKit des thymocytes DN d'une souris sauvage adulte.
- Profil d'expression des marqueurs CD25 et cKit de la population DN CD44⁺cKit⁺ permet de déterminer les sous-populations ETP, DN2a et DN2b.
- Profil d'expression des marqueurs CD44 et CD25 des cellules thymiques d'une souris sauvage, permettant de distinguer les populations DN1, DN2, DN3 et DN4.
- Localisation des populations ETP, DN2 et DN3 sur le dot plot CD44/CD25.

3. Le développement et la maturation des cellules T dans le thymus

Le passage dans le thymus permet aux précurseurs lymphoïdes de se développer pour donner naissance à des lymphocytes T matures dit « naïfs ».

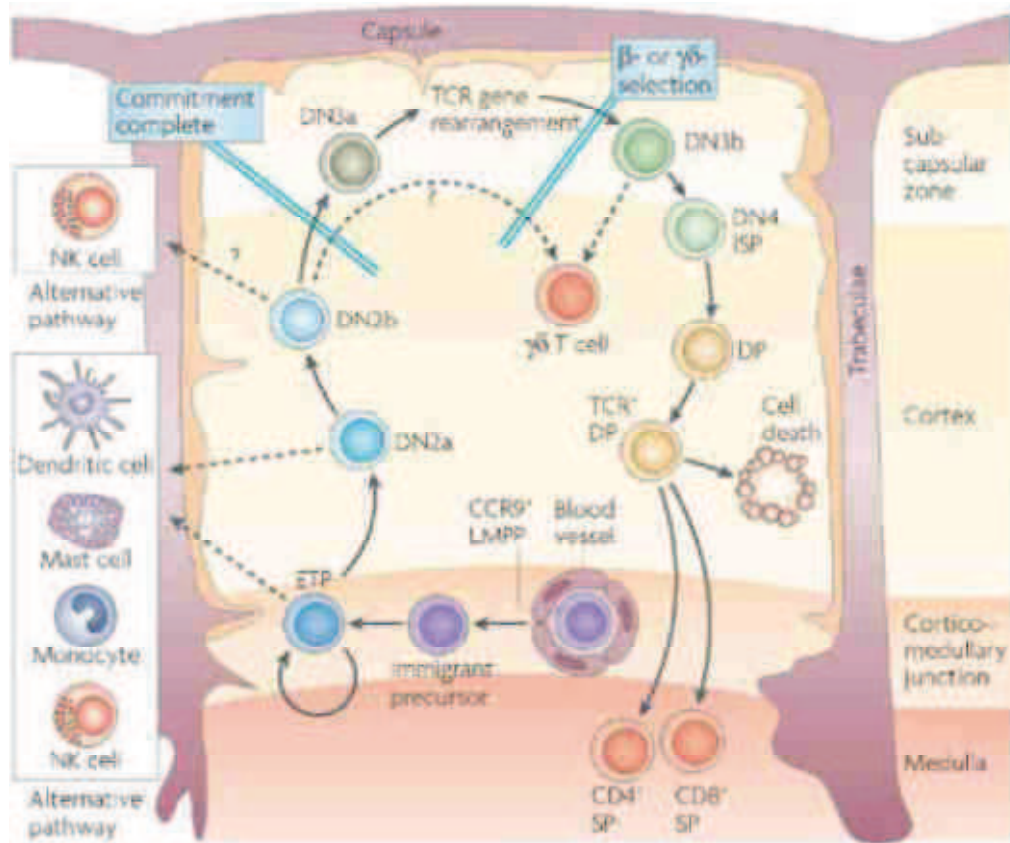


Figure I4 : Représentation des phases du développement et de spéciation des lymphocytes T dans le thymus (Rothenberg *et al.*, 2008).

Le thymus est divisé en quatre zones : zone sous-capsulaire, zone corticale, jonction cortico-médullaire et zone médullaire. Ces divisions sont réalisées grâce aux différences de micro-environnement thymique observées, ce qui permet la différenciation des thymocytes. Les cellules ELP rentrent dans le thymus via le système sanguin au niveau de la jonction cortico-médullaire, et se différencient en cellules ETP (ou DN1). Ces cellules vont alors migrer dans la zone corticale, où se passeront les stades de DN1 à DN2, puis dans la zone sous-capsulaire les stades DN3a-DN3b pendant lesquels il y aura réarrangement de la chaîne β du TCR. La différenciation des cellules DP prendra place dans la partie médullaire.

3.1. Le développement des cellules T immatures : Stade DN1 à DN3

Cette première phase est indépendante de la signalisation du TCR et requiert la signalisation de la voie Notch (Radtke *et al.*, 1999 ; Sambandam *et al.*, 2005). Les cellules immatures majoritairement présentes dans le thymus sont les ETP (Dik *et al.*, 2005) et proviennent d'une population de cellules $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^{\text{high}} \text{c-Kit}^{\text{high}} \text{IL-7R}\alpha^{\text{low}} \text{Flt3}^{\text{low}}$ et possédant une activité multipotente de différenciation en cellules T, B, NK, et DC (Bhandoola *et al.*, 2003). Elles entrent au niveau de la jonction cortico-médullaire et prolifèrent fortement et se différencient

en une population de cellules DN1 hétérogènes composées : de cellules DN1 (Lind *et al.*, 2001), cellules NKT (Benlagha *et al.*, 2002), macrophages (Balciunaite *et al.*, 2005) et rarement des cellules B (Porritt *et al.*, 2004). Les cellules DN1 expriment toutes les marqueurs CD44 et cKit, mais peuvent être subdivisées en cellules DN1a à DN1e en fonction de l'expression de CD90 (Thy-1), CD24 et IL7R α (Porritt *et al.*, 2004).

Seuls les sous-types DN1a et DN1b (CD24^{low}CD90⁻cKit⁺) peuvent continuer leur différenciation en cellules de type DN2, en acquérant l'expression du marqueur CD25 (CD44⁺CD25⁺) dans la zone corticale. Cette étape nécessite les facteurs de transcription GFI1 (Yücel *et al.*, 2003), TCF1 (Schilham *et al.*, 1998) ou MYB (Emambokus *et al.*, 2003). Les cellules DN2 sont divisibles en DN2a et DN2b (spécifiées par l'expression de c-Kit) qui ont des comportements différents. Les cellules DN2a pourront se différencier en cellules DN3, ainsi qu'en cellules NK, DC, monocytes ou même en mastocytes sous l'action du facteur Gata-3 (Taghon *et al.*, 2007). Les cellules DN2b perdent la possibilité de se différencier en cellules NK (**Figure I4**). L'étape de transition entre les stades DN2 et DN3 est médiée par le complexe Runx1/CBF β et la diminution du facteur PU1 (Franco *et al.*, 2006). A partir de là, les cellules DN3 obtenues sont subdivisées en deux sous-populations : les cellules DN3a (CD27⁻) qui n'ont pas encore procédé au réarrangement de leur TCR et les cellules DN3b (CD27⁺) qui elles ont un TCR β sélectionné (Taghon *et al.*, 2006). Les cellules du stade DN3 ont fini leur engagement lymphoïde et ne peuvent plus se différencier en d'autres types de cellules. Les cellules DN3 arrêtent de proliférer et expriment les protéines RAG1 et RAG2 pour permettre le réarrangement du TCR β .

3.2. Le réarrangement du TCR

Le TCR est codé par différents fragments de gènes présents sur les chromosomes 14 (répertoires TCR α et δ) et 7 (répertoires TCR β et γ). Ces gènes permettent d'obtenir les segments de type C (Constant), V (Variable), D (Diversité) et J (Jonction) pour les chaînes β et δ , V et J pour les chaînes α et γ . Ces segments sont assemblés selon un processus de recombinaison somatique, similaire de celui à l'origine des immunoglobulines, qui permettra l'obtention des réarrangements VJ ou DJ puis VDJ. A partir du stade DN3, les enzymes de recombinaison RAG1 et RAG2 (Recombination Activating Gene) sont exprimées et permettent de recombiner les séquences ADN (par clivage et réparation de l'ADN). Ce processus est réalisé à partir de séquences « signal » (RSS), flanquantes aux segments VDJ à sélectionner (**Figure I5**).

L'importance de cette étape est mise en évidence par les souris RAG déficientes, qui présentent un blocage des lymphocytes T au stade DN3 et donc une absence de cellule T mature (Yannoutsos *et al.*, 2001 ; Mombaerts *et al.*, 1992). D'autres protéines sont impliquées dans ce processus parmi lesquelles Ku70, LigaseIV et TDT. L'enzyme TdT (Terminal Deoxynucleotidyl transferase) est responsable en particulier de l'ajout de nucléotides aux niveaux des jonctions DJ et VDJ de la chaîne β du TCR, permettant d'augmenter la diversité de sa région variable.

La chaîne du TCR β nouvellement formée va s'associer avec la chaîne pTCR α et le récepteur CD3 formant ainsi le complexe du pré-TCR (Saint-Ruf *et al.*, 1994). Ce complexe va induire la dégradation des protéines RAG, stoppant le réarrangement des chaînes β de l'autre allèle. Cette étape a lieu aux stades DN3b-DN4 et permet la prolifération et la progression des cellules au stade DN4 (Von Boehmer *et al.*, 1999), par l'activation des voies NF- κ B (Aifantis *et al.*, 2002) et Ras (Swat *et al.*, 1996). L'activation du pré-TCR β permet aussi l'activation des marqueurs CD25, CD4 et CD8. L'étape de transition DN3-DN4 est contrôlée par de nombreux facteurs de transcription, parmi lesquels : Notch, E2A et GATA3 pour la sélection de la chaîne β (Engel and Murre, 2004 ; Pai *et al.*, 2003), TCF et Lef1 (Okamura *et al.*, 1998).

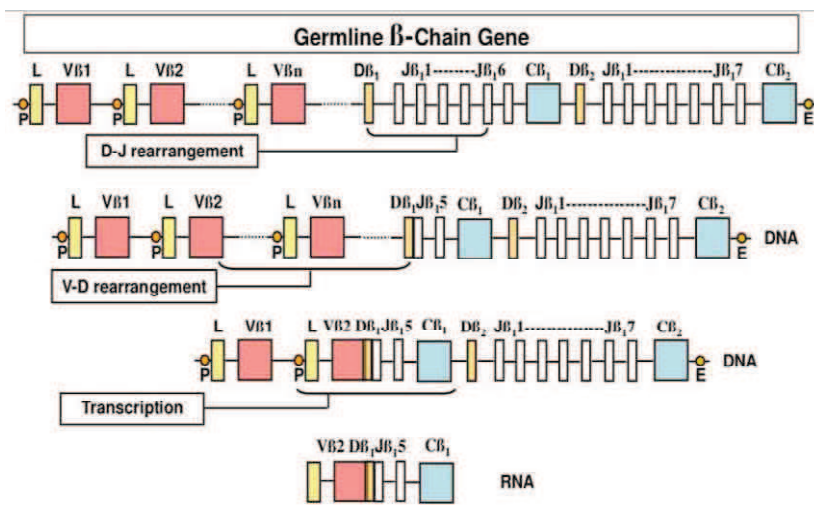


Figure 15 : Représentation schématique du processus de réarrangement du locus de la chaîne du TCR β (adapté de Tourigny *et al.*, 1997).

Le locus du TCR β est réarrangé par 3 étapes : (1) Le réarrangement des fragments D-J par juxtaposition des segments notés D β_1 et J β_1 , puis (2) le réarrangement des fragments D β_1 J β_1 avec le segment V β_2 et (3) la transcription du segment obtenu suite aux réarrangements successifs.

3.3. Le développement des cellules T immatures : Stade DN4 à DP

Après acquisition de la chaîne β du TCR et donc formation du pré-TCR au niveau de la zone sous-capsulaire du thymus, les cellules DN3b prolifèrent et se différencient en cellules DN4 rapidement puis en cellules ISP (Immature Single Positive). Les cellules ISP sont de phénotype $CD44^+CD25^-CD3^{low}CD24^+CD4^-CD8^+$ et sont présentes de façon très transitoire, puisqu'elles deviennent rapidement des cellules DP en exprimant le marqueur CD4. Pendant cette transition ISP-DP, il y a réarrangement du $TCR\alpha$ à partir des segments $C\alpha$, $V\alpha$ et $J\alpha$ grâce aux enzymes RAG1 et RAG2 de la même manière que la recombinaison du $TCR\beta$ (Wilson *et al.*, 1994). Le réarrangement cessera après la phase de sélection positive des cellules T (Brandle *et al.*, 1992 ; Kouskoff *et al.*, 1995).

Les cellules DP obtenues ($CD4^+CD8^+CD3^{low}$) représentent 85 % des lymphocytes présents dans le thymus. Elles vont exprimer un $TCR\alpha\beta$ mature et fonctionnel en remplacement du pré- $TCR\beta$ (Mombaerts *et al.*, 1997).

3.4. Les sélections positives et négatives

Le thymus d'une souris produit de nombreuses cellules immatures, mais seul un faible pourcentage de cellules matures circulera dans la périphérie au final. Cette sélection est réalisée au stade DP grâce à l'activation du TCR, qui activera une cascade de signalisations, induisant les étapes de sélection (Germain, 2002).

Le processus de sélection positive a lieu en premier dans le cortex thymique. Il permet de tester la capacité des molécules du TCR pour la reconnaissance d'antigènes étrangers à l'organisme. Les cellules corticales épithéliales thymiques présentent les molécules antigéniques via le CMH. Si le thymocyte est capable de reconnaître la molécule du CMH de façon brève et avec une faible affinité, il sera sélectionné positivement via un signal de survie. Dans le cas contraire (pas d'interaction du tout, ou une interaction d'affinité trop forte) il sera détruit. Les cellules T peuvent lier via leur TCR des molécules du CMH de classe I ou II. Cela permettra de spécifier les cellules, celles se liant au CMHI garderont le marqueur CD8 (LT $CD8^+$), celles qui se fixeront au CMHII garderont le CD4 (LT $CD4^+$) (Alam *et al.*, 1996 ; Williams *et al.*, 1999)

Le processus de sélection négative a lieu ensuite dans la médulla du thymus, et permet l'acquisition d'une tolérance vis-à-vis des molécules issues du soi. Ce processus est permis grâce au gène *aire* (Auto-Immune-Regulator-Element), qui code pour un facteur de

transcription qui permet l'expression de peptides issus de tissus du soi, qui ne sont normalement pas retrouvés au seins du thymus (Anderson *et al.*, 2002). Ce gène est exprimé par les cellules épithéliales médullaires et la protéine du soi produite est présentée par des molécules du CMH I présentes sur ces cellules. Si le thymocyte est capable de reconnaître le peptide présenté par les molécules du CMH avec une faible affinité, il sera alors considéré comme acceptable et ne recevra pas de signal de mort.

Ces deux processus permettent la génération de lymphocytes T restreints au CMH du soi et immunotolérants. Après ces étapes de sélection, les thymocytes sont devenus matures et sont dits cellules T naïves, car ils n'ont pas encore rencontré leur antigène dans l'organisme. Ils passeront alors dans la circulation sanguine et migreront vers les ganglions lymphatiques.

4. Les sous-populations de lymphocytes T

Au cours de la réponse immunitaire, les lymphocytes T naïfs vont se différencier en :

- **cellules T auxiliaires CD4⁺** (Th) sont des cellules activatrices d'autres cellules comme les lymphocytes B et les macrophages. Elles modulent l'action du système immunitaire grâce à un panel de cytokines. Selon le type de pathogène rencontré et de réaction immunitaire induite, le lymphocyte Th va finir de se différencier en Th1, Th2, Th17 ou Tfh et sécréter un cocktail de cytokines spécifiques.
- **cellules T cytotoxiques CD8⁺** (Tc) peuvent éliminer les cellules infectées par des virus ou autres parasites et jouent un rôle dans la lyse des cellules tumorales par leur fonction cytotoxique (apoptose par le système FasL, TNF α / β ou IFN γ ; les perforines ou granzymes), en absence de co-stimulation.
- **cellules T régulateur CD4⁺** (Treg) sont aussi T CD4⁺ ont la capacité d'inhiber la prolifération et l'expansion des autres types de cellules T dites lymphocytes T effecteurs en comparaison. Elles sont nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire.

Les cellules ThCD4⁺ sont activées par les antigènes exogènes présentés via le CMH et sont différenciables sous formes de sous-types :

- cellules **Th1** secrètent majoritairement de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-2 et induisent des réponses immunes cellulaires efficaces contre les virus et bactéries par l'activation des macrophages. Cette activité est médiée par le facteur de transcription T-bet (Szabo *et al.*, 2000).
- cellules **Th2** produisent les cytokines d'IL-4, IL-5 et IL-6 et soutiennent la

différentiation des lymphocytes B, ainsi que la commutation de classe lors de la production des anticorps. Leur rôle permet la production d'IgE de façon massive et l'action des éosinophiles favorisant l'élimination des parasites extracellulaires. Leur fonction est permise par l'expression de facteur de transcription GATA3 (Zheng and Flavell, 1997). Le profil Th2 favorise les maladies allergiques.

- Cellules **Th17** produisent de l'IL-17, de l'IL-22 et de l'IL-21 et jouent un rôle dans le contrôle des infections bactériennes extracellulaires et fongiques par le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée (neutrophiles) par chimiotactisme. Elles sont issues de cellules Th déjà actives par induction de la voie de signalisation STAT3 et du facteur de transcription Ror γ T (Ivanov *et al.*, 2006).
- Cellules **Tfh** participent à la création des centres germinatifs dans les zones folliculaires B des organes lymphoïdes. Elles permettent la production d'anticorps de haute affinité en soutenant la différenciation et la maturation des lymphocytes B via la production d'IL-4, IL-10 et IL-21. Elles se distinguent des autres sous-types par l'expression des marqueurs CXCR5 et CXCL13, ainsi que le facteur BCL-6 (Crotty, 2011).

Il existe d'autres sous-types de cellules Th CD4+, (Th9, Th3, Tr1 ou Th22) que je n'ai pas souhaité présenter ici.

Partie 3 :
Similarités des membres de la
famille Ikaros.

Partie 3 : Similarités des membres de la famille Ikaros

1. Découvertes des membres de cette famille

La famille de facteurs de transcription Ikaros est essentielle au développement normal du système hématopoïétique et notamment au système lymphopoïétique (Cortes *et al.*, 1999; Georgopoulos, 1997; Georgopoulos *et al.*, 1997; Nichogiannopoulou *et al.*, 1998). Elle est composée des protéines : Aiolos, Eos, Helios, Ikaros et Pegasus. La protéine Pegasus n'a pour l'instant pas de rôle défini dans l'hématopoïèse alors que les quatre autres membres sont impliqués dans celle-ci à différents niveaux. Je me concentrerai uniquement sur les protéines Aiolos, Helios et Ikaros au cours du développement des lymphocytes T. Le facteur de transcription Eos a également été étudié, mais les lignées cellulaires réalisées présentent une absence de phénotype et je n'ai donc pas réalisé l'intégralité des études sur celles-ci.

Le premier gène de la famille à avoir été découvert, est *Ikzf1* qui code pour la protéine Ikaros. La protéine Ikaros a été caractérisée conjointement par son interaction avec des séquences régulatrices des gènes lymphoïdes *Cd3d* (Georgopoulos *et al.*, 1992) et *dntt* (Lo *et al.*, 1991; Hahm *et al.*, 1994), et elle est le membre fondateur de la famille de facteurs de transcription à laquelle elle donne son nom. De part la présence de motifs à doigts de zinc (DZ) dans sa séquence, elle est apparentée à la protéine Hunchback présente chez la *Drosophila melanogaster*, au cours de son développement (Tautz *et al.*, 1987). Cette protéine est conservée de la lamproie jusqu'à l'homme (Georgopoulos, 2002).

Le second gène identifié est *Ikzf3*, qui code pour Aiolos. Il a été caractérisé en 1997, par l'équipe de Bruce Morgan en découvrant l'existence d'un transcrit, homologue à 70 % à Ik-1, codant une protéine à doigts de zinc de 58 kDa, qui se révéla être la protéine Aiolos (Morgan *et al.*, 1997).

Finalement le gène *Ikzf2*, qui code pour la protéine Helios a été découvert en 1998. Deux équipes ont découvert cette protéine, d'une part par une étude d'immunoprécipitation qui a permis d'identifier une protéine de 70 kDa et partageant 94 % d'identité de séquences avec Ikaros (Hahm *et al.*, 1998). Une seconde étude s'est intéressée la même année à des souris déficientes pour Aiolos, dont l'analyse des cDNA de la rate a permis de mettre à jour, par RACE-PCR, la protéine Helios qui présente 75 % d'identité de séquences avec Ikaros (Kelley *et al.*, 1998).

2. Similarités structurales de la famille Ikaros

Les protéines de la famille Ikaros sont des facteurs de transcription qui jouent un rôle essentiel durant l'hématopoïèse. Cette famille est composée de quatre membres : Aiolos, Eos, Helios et Ikaros, codés respectivement par Ikzf3, Ikzf4, Ikzf2 et Ikzf1. Les quatre facteurs possèdent une structure similaire caractérisée par la présence de deux groupes à doigts de zinc de type C₂H₂ (Figure I6.a.).

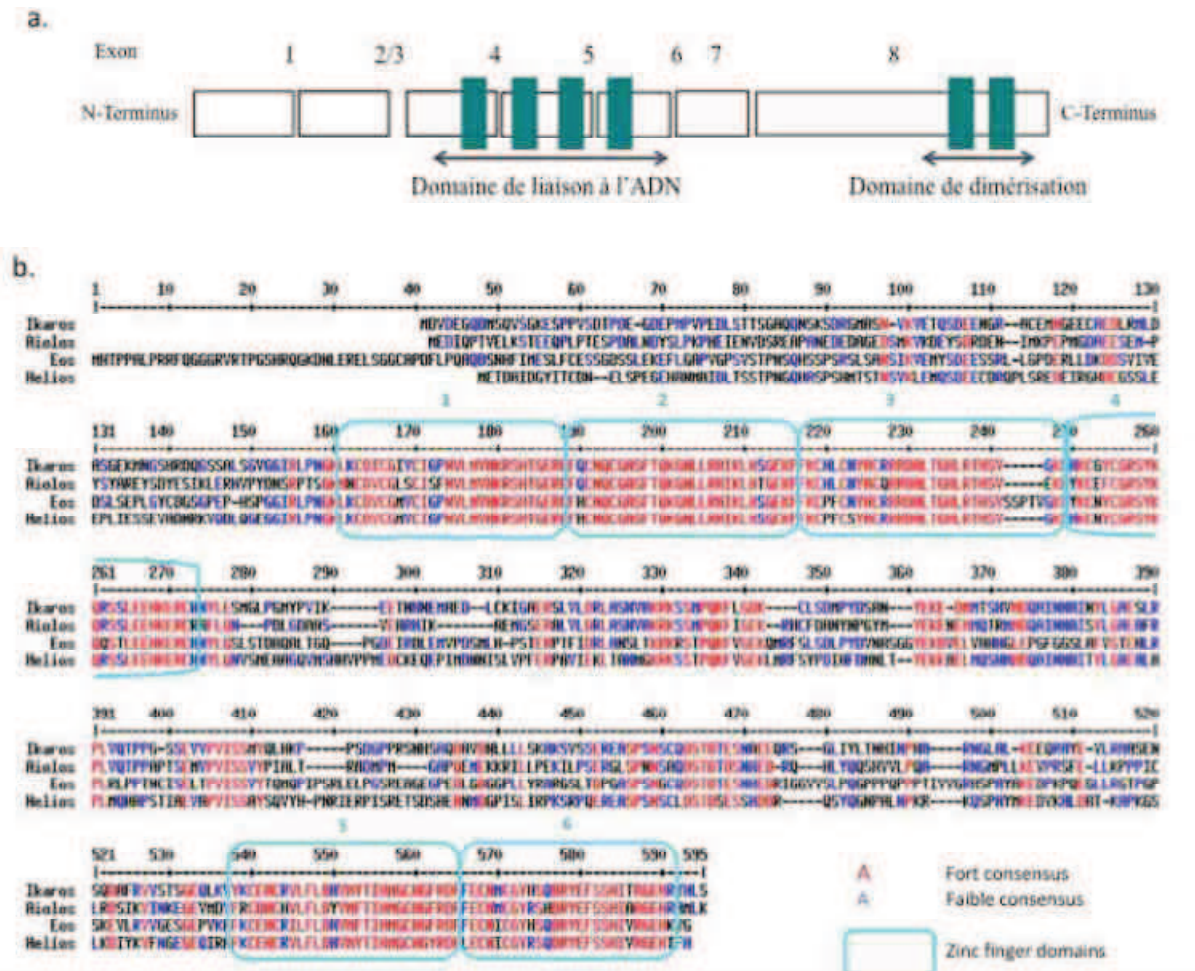


Figure I6. : Structure générale des protéines de la famille Ikaros.

Ces doigts de zinc forment deux domaines fonctionnels : un domaine de liaison à l'ADN en N-terminal ou DBD (DNA Binding Domain) qui permet à la protéine de se fixer à des séquences cibles sur l'ADN et d'agir comme facteur de transcription, et un domaine de dimérisation en C-terminal, qui permet la formation de dimères Ikaros/Ikaros ou d'hétéro-dimères entre différents membres de la famille (Payne *et al.*, 2011) (Figure I6.b.).

3. Similarités de séquences entre les différents membres

Il existe une forte identité de séquences entre les différents membres de la famille Ikaros : avec 60 % de similarités nucléiques, et 52 % pour les séquences protéiques (Hahm *et al.*, 1998). Cette homologie est encore plus forte au niveau des motifs à doigts de zinc ; et se situe entre 79 % et 99 % d'identités entre leurs séquences protéiques.

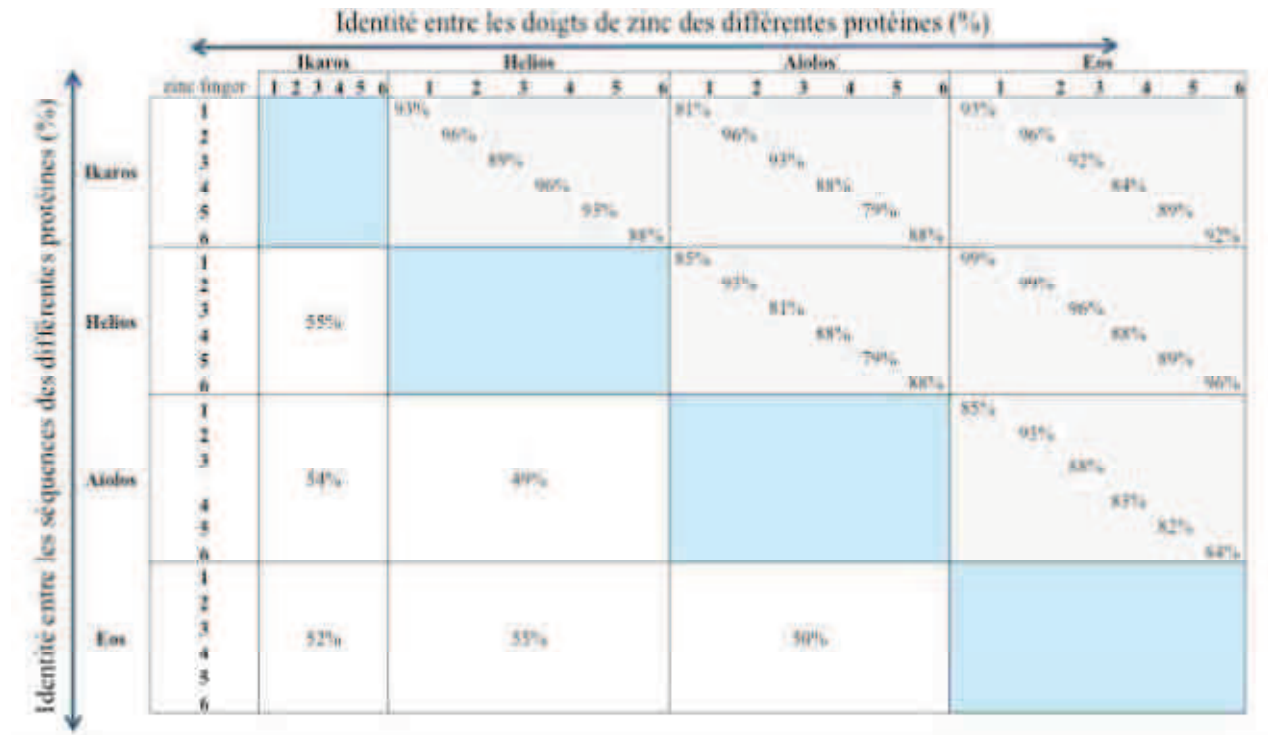


Figure I7 : Analyse des identités de séquences entre les doigts de zinc des différentes protéines.

En réalisant une analyse des séquences protéiques des différentes protéines, on observe qu'il y a entre 49 % et 55 % entre les séquences des protéines entières, et que ces identités de séquences sont particulièrement présentes au niveau des doigts de zinc et de domaines formés par ceux-ci (**Figure I7**). Si on s'intéresse de plus près aux séquences de doigts de zinc et qu'on les aligne, on voit que les identités de séquences sont entre 79 % et 99 %. Les deux protéines les plus proches, Aiolos et Ikaros partagent 94 % et 85 % d'identités de séquences entre leurs deux domaines respectifs et sont les deux protéines les plus proches en terme de séquences. Ces protéines sont capables de reconnaître une séquence ayant un élément consensus : le motif 5'-tGGGAa-3' (Molnar et Georgopoulos, 1994 ; Morgan *et al.*, 1997 ; Koipally *et al.*, 1999; Cobb *et al.*, 2000; Sridharan *et al.*, 2007). Ce motif est le motif central de la séquence spécifique des différentes protéines et il est reconnu par le DBD présent en N-Terminal.

Le domaine de dimérisation en C-Terminal permet l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation des protéines avec un autre membre de la famille (Sun *et al.*, 1996, Morgan *et al.*, 1997 ; Hahm *et al.*, 1998 ; Perdomo *et al.*, 2000 ; McCarty *et al.*, 2003). La dimérisation des protéines est essentielle à leur fonction car elle augmente l'affinité de celle-ci pour l'ADN, ainsi que son activité transcriptionnelle (Sun *et al.*, 1996).

4. Isoformes des différents membres de la famille Ikaros

Les différents membres de la famille Aiolos, Helios et Ikaros présentent différentes isoformes suite à épissage alternatif, ou dans le cas d'Ikaros et des leucémies aiguës suite à une recombinaison aberrante. Les isoformes forment deux groupes :

- celles qui ont un DBD fonctionnel (au moins trois doigts de zinc en N-Terminal) et peuvent reconnaître le motif central GGGA,
- celles qui ont une absence du DBD (moins de trois doigts de zinc en N-Terminal) mais ont toujours un domaine de dimérisation fonctionnel.

Les isoformes du second cas de figure sont qualifiées de dominants négatifs (Dn), car elles peuvent toujours former des dimères, mais ne peuvent plus se lier à l'ADN, entraînant une perte de leur activité transcriptionnelle (Sun *et al.*, 1996, Tabayashi *et al.*, 2007). Les isoformes du premier groupe possèdent un DBD intègre, mais ne sont pas forcément complètement fonctionnelles, car la spécificité et l'affinité de leur liaison à l'ADN sont dépendantes des séquences flanquantes au motif central (Molnar et Georgopoulos, 1994 ; Morgan *et al.*, 1997 ; Hahm *et al.*, 1998). Malgré leur incapacité à fixer l'ADN, ces protéines peuvent, en se liant aux autres protéines, toujours moduler l'activité des isoformes «fonctionnelles » (Hahm *et al.*, 1994). Les isoformes fonctionnelles se trouvent en principe dans le noyau, alors que les formes Dn sont contenues dans le cytosol. Il est possible de trouver de nombreuses isoformes dans les cellules saines ou cancéreuses.

La protéine Ikaros est codée par les 7 derniers exons du gène (sur les 8). Le mécanisme d'épissage alternatif du transcrit primaire permet de générer de multiples isoformes de la protéine Ikaros (Hahm *et al.*, 1994; Molnar and Georgopoulos, 1994). La forme majoritaire d'Ikaros (Ik1) est détectée dans les thymocytes sains (**Figure I8**). Les autres isoformes (Ik-4,4a, 5, 6, 7 et 8) sont plus courtes et diffèrent dans leur nombre de doigts de zinc N-terminaux constituant le site de liaison à l'ADN. Ces formes dominantes négatives se lient aux formes fonctionnelles (Ik-1,2, 2a, 3 et 3a) et inhibent leur liaison avec l'ADN (Koipally

and Georgopoulos, 2002 ; Sun *et al.*, 1996).

La protéine Aiolos présente chez l'homme six isoformes différentes, et en particulier des formes dominantes négatives (Dn) hAio2 et hAio5 (Caballero *et al.*, 2007 ; Liippo *et al.*, 2001 ; Nakase *et al.*, (2000 – 2002) et Takanashi *et al.* 2002). Une seule isoforme a été décrite chez la souris pour le moment. Pour finir, le facteur Helios est exprimé sous forme d'isoformes Hel-1 et Hel-2 dans les cellules normales (Hahm *et al.*, 1998 ; Kelley *et al.*, 1998), alors que les cellules leucémiques expriment aussi des isoformes Dn non fonctionnelles (Fujii *et al.*, 2003 ; Nakase *et al.*, 2002).

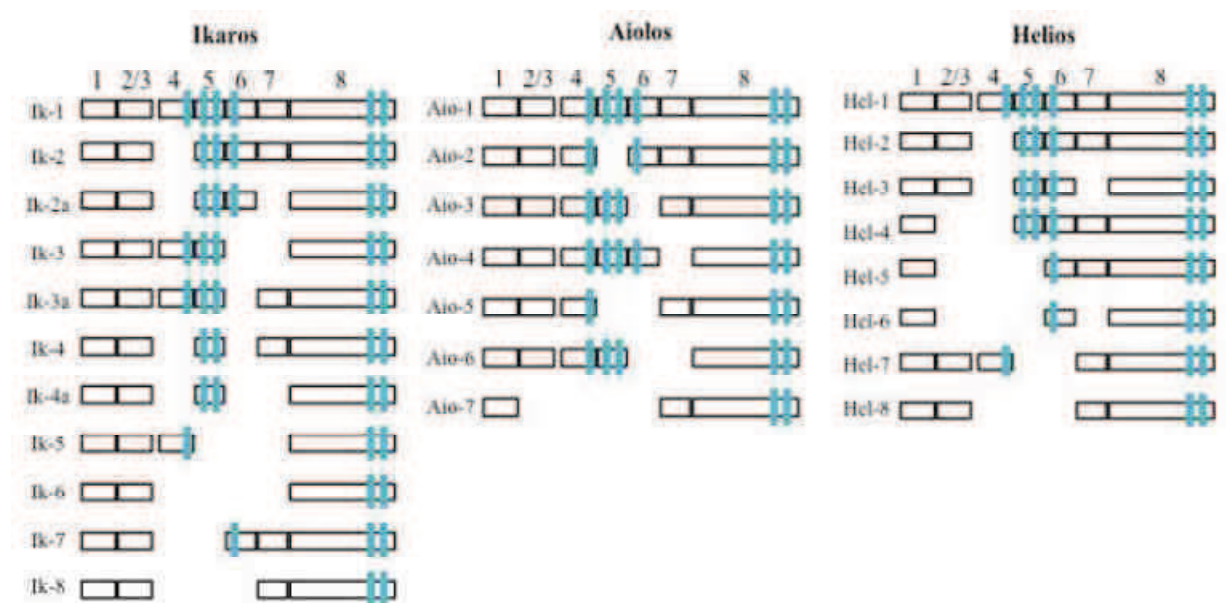


Figure I8 : Structure des isoformes des protéines Ikaros, Aiolos et Helios (adapté Rebollo et Schmitt, 2003).

5. Similarités fonctionnelles entre les différents membres

Une des spécificités propre à la famille Ikaros est sa dualité de fonction comme facteur de transcription. En effet ces facteurs peuvent à la fois agir comme répresseurs ou activateurs de l'expression de leurs gènes cibles.

Je vais décrire les activités répressives et inductrices, en me basant sur celles observées pour Ikaros, qui est le membre le plus connu, puis je préciserai dans chaque cas les résultats obtenus pour Aiolos et Helios.

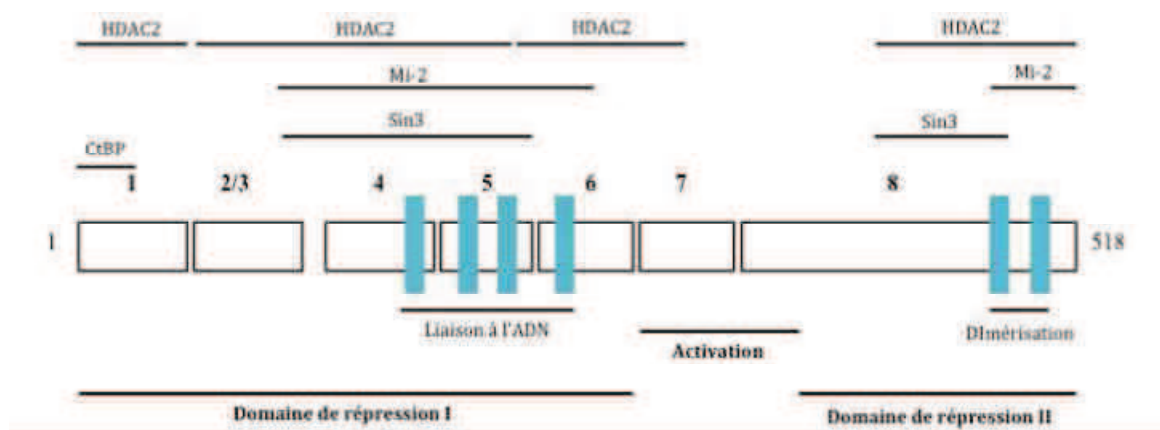


Figure I9 : Représentation schématique des domaines fonctionnels d'Ikaros (Adapté de Koipally and Georgopoulos, 2002).

5.1. Activité répressive de la transcription

L'activité de répression de Ikaros peut se faire de deux manières : dépendamment des HDAC ou indépendamment de ceux-ci.

5.1.1. Répression dépendante des HDAC

Des expériences de localisation par microscopie confocale et électronique ont permis de montrer la présence de la protéine Ikaros au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique ou HCPC (Brown *et al.*, 1997 ; Klug *et al.*, 1998). La protéine Ikaros a été montrée comme étant associée dans le noyau des cellules T matures à l'ATPase Mi-2 β sous forme de structures toroïdales (Kim *et al.*, 1999, Koipally et Georgopoulos 2002, O'Neill *et al.*, 2000 ; Sridharan and Smale, 2007). Cette enzyme fait partie du complexe NuRD (Nucleosome Remodeling and Histone Deacetylase) qui contient aussi les molécules HDAC1 et HDAC2. Ikaros a également été montré comme interagissant avec les corépresseurs transcriptionnels SIN3A et SIN3B (Sin3 transcriptional regulator A et B), qui interagissent aussi avec les HDAC1 et HDAC2 présentes dans le complexe NuRD (Koipally and Georgopoulos, 2002). Un résumé des partenaires répresseurs et de leur domaine de liaison sur Ikaros est expliqué dans la **figure I9**. Ces différentes interactions permettront de médier une répression de type HDAC dépendante (**Figure I10.A**).

Les gènes *Rag* et *dntt* sont réprimés au stade DP, et localisés au niveau de l'HCPC, tout comme Ikaros, ce qui suggère que la répression des gènes peut être due à Ikaros (Brown *et al.*, 1999). Ikaros a été montré comme régulant négativement le gène *dntt* (Hahm *et al.*, 1994), qui peut aussi être régulé par un facteur de la famille Ets, Elf-1 (Ernst *et al.*, 1996). Lors du stade DP et du réarrangement du TCR α , il y a une compétition entre ces deux protéines pour se

fixer sur la séquence régulatrice de *dntt* (Trinh *et al.*, 2001). Des études par immuno-FISH ont permis de montrer la localisation de Ikaros dans l'HCPC, au niveau de gènes dont l'expression est réprimée (Brown *et al.*, 1997). En outre, Ikaros colocalise avec la machinerie de réplication (Avitahl *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 1997). Dans les cellules en division, les gènes *dntt* et *RAG* sont relocalisés au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique (HC-PC), suite à l'activation du TCR (Brown *et al.*, 1999). Les facteurs Aiolos et Helios sont aussi présents au sein de l'HCPC en interagissant avec les protéines Mi-2 β , SIN3A, SIN3B, et de façon plus indirecte les HDAC1 et HDAC2 (Sridharan and Smale, 2007 ; Koipally *et al.*, 1999). Aiolos semble agir comme un répresseur de l'activité du gène $\lambda 5$ au niveau des cellules pré-BII (Thompson *et al.*, 2007). Le facteur Helios se lie au promoteur du gène de l'IL-2, et réprime son expression en désacétylant les histones à ce niveau (Baine *et al.*, 2013).

5.1.2. Répression indépendante des HDAC

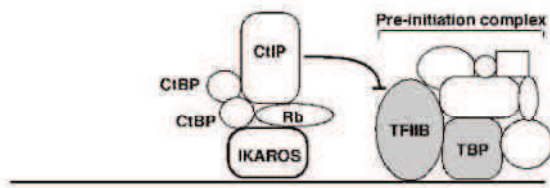
D'autres études ont permis de montrer que le facteur Ikaros peut interagir avec le co-répresseur CtBP (C-terminal Binding Protein) via son motif PEDLS situé en N-terminal qui va interagir directement avec la machinerie basale comme TBP (TATA Binding Protein) (Koipally and Georgopoulos, 2000). Il peut aussi s'associer avec un autre co-répresseur, CtIP (CtBP Interacting Protein) via un intermédiaire qui est le domaine fonctionnel de la protéine Rb (Retinoblastome), un régulateur important du cycle cellulaire (Koipally and Georgopoulos, 2002). Le complexe ternaire formé par Ikaros/CtBP/CtIP/Rb va alors pouvoir interagir avec TBP et TFIIB qui font partie de la machinerie transcriptionnelle (**Figure I10.B**)

Une autre possibilité de répression génique peut être réalisée par la compétition de Ikaros pour se fixer sur des sites cibles d'autres facteurs de transcription. Notre laboratoire a permis de démontrer que Ikaros réprime l'expression de *Hes1* par compétition avec le facteur de régulation RBP-Jk (Kleinmann *et al.*, 2008). Ce mécanisme pourrait également être utilisé par les autres membres de la famille, mais pour le moment aucune preuve n'a été démontrée. Des expériences de ChIP et de siRNA ont permis de montrer que le facteur Helios se fixe sur les séquences régulatrices du gène *FoxP3* et que son absence induit une répression de l'expression de *FoxP3* (Genet *et al.*, 2010). Le facteur Aiolos est incapable de se lier directement à CtBP, car il lui manque le domaine PEDLS (Koipally et Georgopoulos, 2000). Il participera cependant aux répressions via le complexe CtBP/CtIP/Rb, grâce aux hétérodimerisations avec le facteur Ikaros.

A. HDAC-mediated repression by Ikaros



B. HDAC-independent repression by Ikaros

**Figure I10 : Schémas des modes de répression médiés par Ikaros (Koipally and Georgopoulos, 2002).**

- A.** Mécanisme HDAC-dépendant au cours duquel Ikaros recrute les HDAC via les molécules Mi-2 β (Complexe NuRD) ou SIN3A/B sur les promoteurs des gènes cibles, permettant la compaction de la chromatine et l'absence de transcription.
- B.** Mécanisme HDAC-indépendant pendant lequel Ikaros recrute les molécules CtBP et CtIP (via la protéine adaptatrice Rb) aux niveaux des séquences promotrices des gènes cibles. CtBP et CtIP permettent le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et bloquent son action.

5.2. Activité inductrice de la transcription

Il a été montré *in vitro* que le facteur Ikaros est capable d'activer modestement le gène rapporteur CAT (Chloramphenicol Acetyl Transferase) sous la régulation des régions promotrices du gène *CD3 δ* (Georgopoulos *et al.*, 1992) ou une séquence contenant 4 motifs consensus de liaison à l'ADN de Ikaros (TGGGAA) (Sun *et al.*, 1996). Cela a permis d'identifier le motif de liaison à l'ADN dans les séquences régulatrices de plusieurs gènes dont : TCR $\alpha/\beta/\delta$, CD3 $\gamma/\delta/\epsilon$, CD4, CD2, IL-2R α , TdT, EBF, NF- κ B, IFN β et CMHII (Molnar et Georgopoulos, 1994).

Le facteur de transcription Ikaros, ainsi que les autres membres de la famille peuvent jouer un rôle d'activateur transcriptionnel. Cette activité pourrait être réalisée de différentes manières, selon les hypothèses proposées :

- La protéine Ikaros a été montrée comme pouvant se transloquer dans l'HCPC indépendamment de la protéine Mi-2 β , grâce à sa capacité à se fixer sous forme de dimère à l'ADN (Cobb *et al.*, 2000). En s'associant au complexe NuRD via les protéines Mi-2 β , SIN3A et SIN3B, elle a la capacité à séquestrer ce complexe au niveau de l'HCPC (**Figure I11.A.**). Ce processus va permettre de façon indirecte de potentialiser l'expression d'autres gènes dans la cellule, en permettant la fixation des complexes activateurs sur leurs gènes cibles (Koipally *et al.*, 2002). Un exemple est celui du gène *Cd8 α* . Ikaros se fixe sur ses séquences promotrices dans les cellules CD8+, et dans les cellules CD8-, il y a une translocation de ces séquences dans les

HCPC (Harker *et al.*, 2002).

- Des études d'immunopurification ont montré que la protéine Ikaros est capable d'interagir avec l'ATPase Brg-1 et les protéines hSWI-3 et BAF-60 qui sont des composantes du complexe SWI/SNF (Switch / Sucrose Non Fermentable) dans des cellules T proliférantes (Kim *et al.*, 1999) ou des cellules érythroïdes (O'Neill *et al.*, 2000). Ce complexe est impliqué dans le remodelage de la chromatine de manière ATP- dépendante afin de rendre les gènes accessibles à la machinerie transcriptionnelle, en déplaçant les nucléosomes et en ouvrant le chromatine.
- De part son association avec le complexe NuRD, une dernière hypothèse serait que Ikaros agisse comme un activateur de la transcription par un remodelage épigénétique, permet l'ouverture ou la fermeture de la chromatine et donc l'expression de certains gènes (**Figure I11.B**).

Les facteurs Aiolos et Helios permettent aussi l'induction de certains gènes. Aiolos semble être un activateur plus puissant que Ikaros, ce qui est montré par sa forte induction de l'expression de CAT *in vitro* grâce à sa fixation à une séquence contenant 4 motifs consensus de liaison à l'ADN de Ikaros (TGGGAA) (Morgan *et al.*, 1997). Aiolos comme Ikaros semblent pouvoir activer l'expression des gènes Cd8 α et STAT4 dans les thymocytes (Harker *et al.*, 2002, Yap *et al.*, 2005).

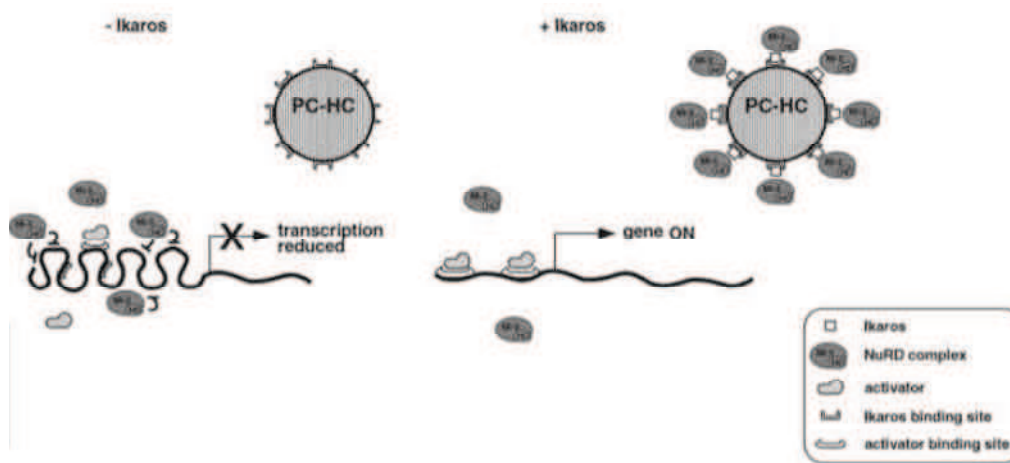


Figure I11 : Schéma des modes d'activation potentiels médiés par Ikaros (Koipally *et al.*, 2002).

En absence du facteur Ikaros, le complexe NuRD (Mi2 β -HD) est fixé sur les promoteurs des gènes empêchant la fixation des activateurs transcriptionnels. En présence d'Ikaros, les molécules de ce complexe s'associent à Ikaros, et se retrouvent relocalisées dans l'HCPC. Les sites promoteurs sont à ce moment là vides, et les facteurs activateurs peuvent s'y fixer, induisant ainsi l'expression de ces gènes.

Partie 4 :

**Les différents membres de la
famille Ikaros**

Partie 4 : Les différents membres de la famille des facteurs Ikaros

Les facteurs de transcription de la famille Ikaros sont impliqués comme vu précédemment dans le processus d'hématopoïèse. Aiolos est exprimé à partir des cellules T immatures tardives (DN3-4), avec un maximum d'expressions aux stades Double Positive $CD4^+CD8^+$ (nommée DP) et T matures. Helios est exprimé par les Cellules Souches Hématopoïétique (HSC) et son niveau d'expression diminue jusqu'à être minimal au stade du Progéniteur Lymphoïde Commun (CLP). Il est de nouveau exprimé dans les cellules T $CD4^+$ matures de phénotype Treg. Ikaros est exprimé dans les cellules T à partir des cellules immatures précoces (DN1-2), et de façon plus prononcée aux stades DN2, DN4, DP et les cellules T matures. Leurs implications dans les différentes étapes de développement hématopoïétique sont détaillées dans la suite de la partie 2 ainsi que leurs implications plus précises dans le développement et la maturation des lymphocytes T.

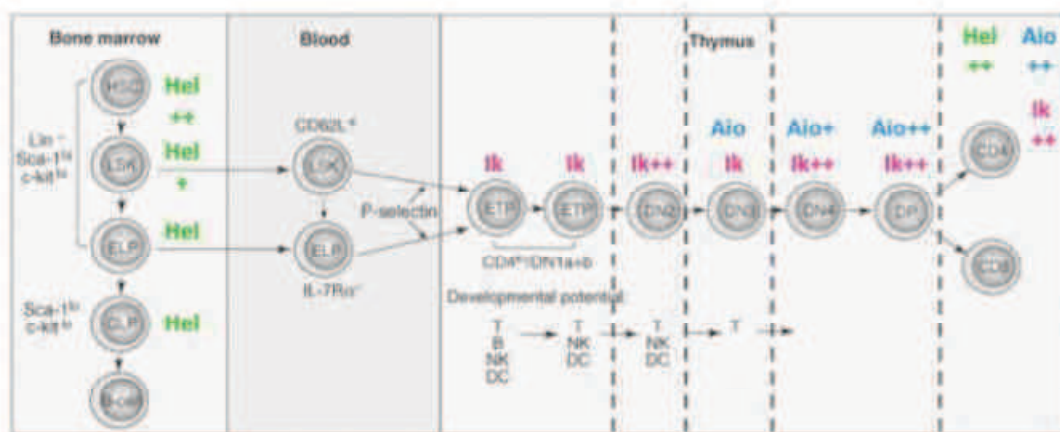


Figure I12 : Schéma de l'implication des facteurs de la famille Ikaros dans la lignée lymphoïde de la moelle osseuse au thymus (Wu, 2006).

1. Le facteur Aiolos (Ikzf3).

1.1. L'expression de Aiolos

La protéine Aiolos est exprimée principalement dans le système hématopoïétique. Elle n'est pas exprimée dans les cellules souches (HSC) ou progénitrices au cours de l'embryogenèse murine, elle est exprimée dans le lignage T à partir du stade CLP jusqu'au stade DN, puis DP, où son expression est maximale (Wang *et al.*, 1998). Elle est aussi exprimée dans le lignage B. Elle présente une expression faible dans les cellules pro-B puis elle augmente très fortement dans les cellules pré-B et les cellules B matures, où elle atteint un niveau supérieur à celui rencontré dans les cellules T. La protéine Aiolos est présente en faible quantité dans les cellules NK et dans les cellules dendritiques. Elle n'est en revanche pas détectée dans les HSC et dans les cellules érythroïdes (Kelley *et al.*, 1998 ; Morgan *et al.*, 1997).

1.2. La fonction de Aiolos in vivo

1.2.1. Rôle dans le contrôle de la mort cellulaire programmée

Des études réalisées par le laboratoire de A. Rebollo ont démontré l'implication du facteur Aiolos dans la régulation de l'apoptose. Des études ont permis de voir que Aiolos régulaient les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL dans un modèle de cellules T murines, IL-2 ou IL-4 dépendantes (Romero *et al.*, 1999 ; Rebollo *et al.*, 2001). Les résultats obtenus par des études de gènes rapporteurs et d'immunofluorescence ont permis de démontrer que la protéine Aiolos, séquestrée sous forme phosphorylée dans le cytoplasme interagit avec Ras, une protéine impliquée dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose en l'absence de stimulation par l'IL-2. En présence de la cytokine, Aiolos est re-phosphorylé puis migre dans le noyau où il induit la transcription du gène codant pour Bcl-2 et participe ainsi à la survie de la cellule. Dans le cas de la protéine Bcl-xL, les cellules utilisées sont dépendantes de l'IL-4 pour leur croissance. Aiolos semble interagir avec Bcl-xL dans le cytoplasme des cellules principalement lorsque l'IL-4 est absente du milieu. La protéine Bcl-xL semble être séquestrée dans le cytoplasme par Aiolos.

D'autres études ont permis de montrer que la sur-expression de Aiolos dans une lignée cellulaire pré-B (Nalm6) entraîne une diminution de la prolifération cellulaire, une augmentation de la proportion de cellules en phase G0/G1, combinée à une diminution des cellules en phase S. Les auteurs de cette étude ont également observé une diminution des cellules en apoptose qui semble être liée à une répression du facteur PTEN et une augmentation de la phosphorylation de Akt (Zhuang *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2015).

1.2.2. Rôle dans les lymphocytes Th17.

Les lymphocytes Th17 jouent un rôle dans le contrôle des infections bactériennes extracellulaires et fongiques par le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée (neutrophiles) par chimiotactisme. Ils sont caractérisés par la présence du facteur de transcription Ror γ T (Ivanov *et al.*, 2006).

Les souris Aio^{-/-} analysées montrent que dans des conditions de culture polarisante pour les cellules Th17 (TGF β , IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23), il y a une augmentation de l'expression des facteurs STAT3 et Ahr, ce qui entraîne une diminution des modifications épigénétiques liées à la répression de l'expression de IL-2. Il semblerait donc que l'absence de Aiolos engendrerait une disparition du phénotype des cellules Th17 via l'augmentation de la production de l'IL-2 (Quintana *et al.*, 2012).

1.2.3. Rôle dans la leucémogénèse

Comparé à Ikaros, le rôle d'Aiolos dans la leucémogénèse est beaucoup moins documenté. Les souris Aio^{-/-} développent préférentiellement des lymphomes B (Wang *et al.*, 1998). Certaines études réalisées dans des leucémies aiguës lymphoblastiques ou LAL (Liippo *et al.*, 2001 ; Nakase *et al.*, 2002 ; Takanashi *et al.*, 2002) et des Leucémies Lymphoblastiques Chroniques ou LLC (Liippo *et al.*, 2001), ont permis de détecter une isoforme majoritaire de Aiolos, hAio-1, ainsi que certaines minoritaires comme hAio4, 2 et 5. Les deux dernières sont des dominants négatifs mais leur présence est identique dans les cellules saines. Une autre étude a permis de confirmer la sur-expression de Aiolos dans les cellules LLC, et a permis de montrer que cette expression est indépendante de modifications épigénétiques telles que l'acétylation de H3K9 ou la triméthylation de H3K4 (Duhamel *et al.*, 2008 (1 et 2)).

D'autres études se sont intéressées au statut de phosphorylation de la protéine Aiolos dans des échantillons de différents types de leucémies, LAL (B et T), LLC et Leucémie Aigües Myéloïdes ou LAM, mais cela n'a pas permis de démontrer un lien réel entre les deux (Antica *et al.*, 2007). D'autre part des délétions d'Aiolos et d'Ikaros ont été identifiées dans des LAL pédiatriques (Mullighan *et al.*, 2007). Une étude plus récente s'est intéressée aux cellules LLC-B, et a permis de montrer une sur-expression de Aiolos dans ces cellules qui est indépendante de la présence d'isoformes, ou d'une relocalisation de Aiolos dans la cellule. L'équipe a pu observer une augmentation de la déméthylation (H3K4triméthylation à H3K4diméthylation). Cela entraînerait une augmentation de l'euchromatine, une ouverture de la chromatine et la fixation de facteurs tels que NF-kB, ce qui entraînerait la sur-expression de Aiolos (Billot *et al.*, 2011).

1.3. Modèles murins existants pour Aiolos

L'équipe de K. Georgopoulos a généré une souris déficiente pour Aiolos (Aiolos^{-/-}) par insertion d'une cassette PGK-Néomycine par recombinaison homologue dans la séquence Ikzf3 au niveau de l'exon 8. Cette insertion engendre une délétion de l'exon 8, induisant une perte du domaine de dimérisation. Il y a une absence totale de la protéine Aiolos (Wang *et al.*, 1999).

La souris obtenue ne présente pas de déficience pour les lymphocytes T. Les lymphocytes B présentent de nombreuses modifications : nombre normal de cellules pré-B, augmentation de 50 % du nombre de cellules pro-B mais les cellules B non-conventionnelles (cellules B1a

péritonéales, et les cellules B de zones marginales), il y a une diminution de près de 50 % des cellules B re-circulant dans la moelle. Le nombre de cellules B de la rate est constant mais présente une diminution des cellules B naïves exportées, une augmentation des cellules B dans les centres germinatifs et celles-ci présentent des caractéristiques phénotypiques de cellules B activées (CMHII, CD23, et une répression des marqueurs CD22 et FcγRIIb1). Il y a présence d'anticorps auto-réactifs. Les souris développent fréquemment des lymphomes B (Table I1).

2. Le facteur Helios (Ikzf2).

2.1. L'expression de Helios

La protéine Helios est exprimée dans les tissus hématopoïétiques, d'abord durant le développement embryonnaire notamment dans le sac vitellin, le foie fœtal et le thymus fœtal (Kelley *et al.*, 1998). Après la phase fœtale elle est exprimée dans les cellules LSK (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺), terme regroupant les cellules souches hématopoïétiques (CSH) ainsi que les cellules progénitrices (MPP) (Kelley *et al.*, 1998). Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé ma thèse a notamment pu montrer une forte expression dans les cellules CSH (long terme) puis une diminution de son expression lors de la différenciation des CSH en cellules progénitrices. Dans les cellules matures Helios est présent uniquement dans les lymphocytes T, et plus précisément dans les cellules T régulatrices (Kelley *et al.*, 1998, Sugimoto *et al.*, 2006 ; Thornton *et al.*, 2010 ; Cai *et al.*, 2009). Il est considéré comme étant un des marqueurs de spécificité des cellules Treg dans l'organisme (Sugimoto *et al.*, 2006 ; Hill *et al.*, 2007 ; Thornton *et al.*, 2010), au même titre que le facteur de transcription FoxP3.

Lors du développement embryonnaire, Helios a été détecté dans le cerveau notamment au niveau des tissus ectodermes et neuro-ectodermes, dans l'éminence ganglionnaire latérale (EGL), le cortex insulaire et rétro-spinal, l'hippocampe et le bulbe olfactif. L'équipe de J.M. Canal a pu en particulier montrer son importance dans le développement des neurones du striatum, ainsi que sa régulation par les facteurs Gsx2 et Dlx1/2 (Martín-Ibañez *et al.* 2012). Helios sera toujours exprimé dans les neurones de Purkinje après la naissance.

2.2. La fonction de Helios in vivo

2.2.1. Rôle dans les cellules T régulatrices

Les cellules T régulatrices proviennent de la différenciation des Progéniteurs Lymphoïdes Communs (CLP), suivi des phases de sélections positives et négatives. Ces cellules sont

classées en deux types : les lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg) naturellement produits par le thymus et sélectionnés via la présentation d'un peptide endogène du soi, et les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg) ou adaptatifs produits en périphérie suite à une exposition à un environnement inflammatoire par une expansion du pool de cellules nTreg déjà présentes ou par transformation de cellules Th sous l'influence d'une stimulation antigénique et de cytokines. Tous les Treg sont caractérisés par une expression du facteur de transcription Foxp3 et sont responsables du contrôle des LT autoréactifs.

Helios a été montré comme étant exprimé au stade DN des cellules T, en particulier associé à Ikaros (Hahm *et al.*, 1998, Kelley *et al.*, 1998). Une étude de sur-expression de Helios dans les cellules progénitrices a pu montrer qu'il y a un blocage dans le développement des lymphocytes T au stade DN et une diminution de la prolifération des cellules T (Zhang *et al.*, 2007). Le laboratoire dans lequel j'ai réalisé ma thèse a montré que des cellules déficientes pour Helios ne présentaient pas de différence dans la différenciation et la fonctionnalité des lymphocytes T, Treg et cellules NKT (Cai *et al.*, 2009).

Malgré cela, d'autres études ont permis de déterminer l'importance du facteur de transcription Helios pour les lymphocytes Treg. L'équipe de Shevach a montré que le facteur de transcription Helios est exprimé dans les cellules T au stade DP et plus précisément dans les précurseurs des Treg Foxp3⁺ dans le thymus. Elle a aussi déterminé que la plupart des cellules exprimant FoxP3⁺ présentes dans les ganglions lymphatiques, co-expriment Helios. Les Treg induits *in vitro* et *in vivo* n'expriment pas Helios, ce qui en fait un marqueur des nTreg (Sugimoto *et al.*, 2006, Thornton *et al.*, 2010). D'autres études ont permis de montrer l'importance de Helios pour l'activité fonctionnelle des cellules Treg, de par sa fixation au promoteur de FoxP3, ou en permettant l'expression de l'IL-2 (Getnet *et al.*, 2010 ; Zabransky *et al.*, 2012 ; Baine *et al.*, 2013). D'autres études ont montré des résultats contradictoires, notamment en parvenant à induire des Treg FoxP3⁺ exprimant Helios à partir de cellules Th CD4⁺ *in vivo* ou *in vitro* (Gottschalk *et al.*, 2012; Verhagen et Wraith, 2010).

2.2.2. Rôle dans la leucémogenèse

Helios semble avoir un rôle de suppresseur de tumeurs dans les leucémies aigües lymphoblastiques (LAL). Les LAL sont des cancers des cellules hématopoïétiques immatures devenues hyper-prolifératives et fonctionnellement et morphologiquement anormales.

Helios a été montré comme étant impliqué dans les LAL-T. Les formes dominantes négatives issues de l'épissage alternatif (isoformes Hel-5 à Hel-8) sont rencontrées dans les LAL-T (Fujii *et al.*, 2003, Nakase *et al.*, 2002). L'isoforme Hel-3 en particulier a été détectée dans des cultures primaires provenant de LAL-T pédiatriques (Sun *et al.*, 2002, Takanashi *et al.*, 2012), ainsi que dans des cas de leucémies chroniques (Fujii *et al.*, 2003).

D'autres études sur des cellules de LAL-T adultes ont permis de déterminer des formes d'épissages alternatifs de Helios, générant des isoformes tronquées agissant comme des formes Dn qui semblent être responsables de l'apparition des leucémies (Asanuma *et al.*, 2013).

2.3. Modèles murins existants pour Helios

Notre équipe a généré une souris mutante pour Helios (Helios^{-/-}) par insertion d'une cassette PGK-Néomycine par recombinaison homologue dans la séquence Ikzf2 au niveau de l'exon 8. Cette insertion engendre une délétion de l'exon 8, induisant une perte du domaine de dimérisation. Il y a une absence totale de la protéine Helios (**Table I1**).

Cette souris déficiente pour Helios ne présente aucun déficit dans la présence, la fonction, ou la différenciation des lymphocytes T, Treg et NKT (Cai *et al.*, 2009).

3. Le facteur Ikaros (Ikzf1)

Ikaros est un facteur de transcription de 58 kDa, membre de la famille éponyme qui joue un rôle important durant les stades précoces de l'hématopoïèse, ainsi que durant la différenciation des différentes lignées hématopoïétiques. Ce facteur est capable de se fixer sur les séquences régulatrices de plusieurs gènes spécifiques des lymphocytes (*Cd3δ*, *Dntt*, *Lambda5*, *Vpreb1* et *Lck*) et permet la régulation de leurs expressions.

3.1. L'expression de Ikaros

La protéine Ikaros est exprimée quasi exclusivement par les cellules du système hématopoïétique. On détecte cependant son expression à E12 dans le cerveau, dans les tissus qui deviendront le corpus proximal du striatum (Georgopoulos *et al.*, 1992).

Son expression est détectée dès E8 dans le sac vitellin, puis dans le foie fœtal, à partir du stade E9.5 par différentes populations cellulaires dont les neutrophiles (Dumortier *et al.*, 2003). A partir du stade E12, l'expression de Ikaros devient plus forte dans le thymus jusqu'à devenir maximale 5 jours plus tard, tout en diminuant parallèlement dans le foie fœtal. Les cellules T issues du thymus vont alors commencer à coloniser les organes lymphoïdes

secondaires, dont la rate dans laquelle on pourra détecter alors une faible quantité de l'ARNm d'Ikaros (Georgopoulos *et al.*, 1992).

Son expression chez l'adulte est majoritairement circonscrite au système sanguin. On retrouve ce facteur dans les HSC, progéniteurs, lymphocytes T, lymphocytes B, les cellules myéloïdes et érythroïdes à des niveaux variables (Morgan *et al.*, 1997 ; Klug *et al.*, 1998 ; Kelley *et al.*, 1998 ; Kirstetter *et al.*, 2002). Son expression augmente au cours de la différenciation précoce des cellules lymphoïdes, et diminue à contrario lors de la différenciation des cellules des lignées myéloïdes et érythromyeloïdes. Cette protéine est également exprimée dans le système neuro-endocrinien, principalement dans l'hypophyse et l'hypothalamus (Ezzat *et al.*, 2005).

3.2. La fonction de Ikaros in vivo

3.2.1. Rôle durant l'hématopoïèse

Dans un premier temps Ikaros semble avoir un rôle dans le développement des cellules souches hématopoïétiques comme le démontre une étude réalisée sur un mutant induit par agent mutagène (Ik^{Plstc/Plstc}). Ceci montre qu'en l'absence d'une protéine fonctionnelle il y a une forte réduction du « pool » de cellules souches (Papathanasiou *et al.*, 2009). Dans une autre étude, les cellules souches déficientes pour Ikaros présentent une très sévère perte de leur potentiel d'auto-renouvellement. Ceci a été démontré par une expérience de compétition entre des cellules souches WT et mutantes dans un hôte immuno-déficient (Nichogiannopoulou *et al.*, 1999). Tous ces résultats semblent ainsi suggérer que le facteur Ikaros interviendrait dans la génération des cellules hématopoïétiques en intervenant sur : l'auto-renouvellement des précurseurs (HSC), la génération des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP), et myéloïdes (CMP).

3.2.2. Rôle dans les lymphocytes T

Ikaros semble également jouer un rôle important en aval du progéniteur lymphoïde par interaction avec d'autres facteurs de transcription spécifiques et protéines de régulation. Dans les souris déficientes pour Ikaros, on observe une hyper-prolifération des cellules CD4⁺ et une absence de cellule NK et des lymphocytes B (Wang *et al.*, 1996). D'autres études réalisées sur différents modèles de souris mutantes pour Ikaros (Kirstetter *et al.*, 2002) (Georgeopoulos *et al.*, 1994), montrent une absence des cellules de type lymphoïde, alors que les cellules myéloïdes sont présentes de façon normale.

L'un des modes d'action d'Ikaros lors de la différenciation hématopoïétique semble avoir lieu

via sa capacité de répression de la voie de signalisation de Notch, impliquée dans le développement des lymphocytes T. Cette répression, en partie médiée par une compétition entre le complexe NIC/RBP-J_K et le facteur Ikaros n'a pu être démontrée que pour le gène cible de Notch : Hes-1 (Kleinmann *et al.*, 2008). Une seconde étude impliquant une analyse de type Génome Wide Analyse a permis de déterminer que Ikaros permettait de réprimer la quasi-totalité des gènes cibles de Notch (Geimer Le Lay *et al.*, 2014).

3.2.3. Rôle dans la leucémogénèse

En plus de son rôle au cours de la différenciation lymphocytaire, Ikaros est aussi un suppresseur de tumeurs chez la souris. Des études réalisées sur des cancers induits par des agents mutagènes ou par irradiations, ont montré l'apparition de mutations dans le locus du gène codant pour Ikaros dans 10 à 50 % des cas. Il y a alors un déficit d'expression de la protéine, corrélé à l'apparition d'un lymphome thymique (Kastner *et al.*, 2011 pour revue).

Toutes les souris déficientes pour Ikaros développent des leucémies de type T (Winandy *et al.*, 1995 ; Wang *et al.*, 1996 ; Kirstetter *et al.*, 2002) . Ces données suggèrent que le facteur Ikaros agirait comme un suppresseur de tumeurs dans le cas des leucémies de type LAL-T. D'autres études ont pu montrer un lien entre Notch 1 et Ikaros, comme dans le cas des souris Ik^{L/L}, où on observe également une activation précoce et soutenue de la voie Notch (Dumortier *et al.*, 2006). Cette activation est associée à des mutations activatrices du gène Notch1, similairement à ce qui est observé dans 50 % des cas de LAL-T humaines (Weng *et al.*, 2004) Cette possible action d'Ikaros dans les LAL-T est également soutenue par le fait que Notch et Ikaros possèdent des cibles transcriptionnelles communes. Le rôle essentiel de la voie Notch dans les leucémies Ik^{L/L} a été confirmé par suppression des leucémies suite à l'inactivation spécifique de RBP-J (facteur transcriptionnel médiateur de l'activité de Notch) dans les lymphocytes T des souris Ik^{L/L} (Jeannet *et al.*, 2010).

Plusieurs études ont permis de suggérer qu'Ikaros aurait également un rôle comme suppresseur de tumeurs dans les LAL chez l'homme. Ainsi par des expériences de CGH-array (Mullighan *et al.*, 2008) on a pu montrer la présence d'une altération génétique du gène *Ikzf1* dans près de 85 % des cas de leucémies aigües lymphoblastiques B exprimant le transcrit de fusion BCR/ABL. Ces altérations conduisent soit à l'expression de protéines dépourvues de leur domaine de liaison à l'ADN agissant comme dominant négatif, ou une haplo-insuffisance par la perte totale d'un allèle. Plus récemment, une étude de séquençage génomique réalisée sur des LAL-T de phénotype immature, a permis de détecter la présence de mutations

récurrentes de *Ikzf1* dans ce groupe de leucémies, supportant ainsi le rôle d'Ikaros dans les LAL-T (Zhang *et al.*, 2012).

3.3. Modèles murins existant pour Ikaros

Le rôle du facteur de transcription Ikaros dans les cellules hématopoïétiques et plus particulièrement lymphoïdes a pu être analysé grâce à quatre modèles de souris mutantes (Table I1).

3.3.1. La mutation dominant négatif : Ik^{DN}

Le premier modèle à avoir été généré est la mutation DN, en 1994 par l'équipe de Georgopoulos. Cette souris possède une délétion des exons 3 et 4 du gène *Ikzf1*, formant le domaine de liaison à l'ADN ou DBD de la protéine. Cette délétion engendre la formation de protéines de type dominant négatif (Dn). Celles-ci peuvent toujours se dimériser entre elles, ou avec d'autres membres de la famille Ikaros, mais ne peuvent plus se fixer à leur séquence cible et assurer leur fonction régulatrice. Le phénotype qu'on peut observer est probablement dû à une perte de fonction de plusieurs membres de la famille Ikaros et pas seulement à la perte de son membre éponyme.

La mutation homozygote (Ik^{DN/DN}) entraîne une perte de tous les lignages lymphoïdes (LB, LT, NK et DC sauf cellules de Langerhans), ainsi que des précurseurs qui leur sont associés (diminution de l'activité des HSC), ce qui suggérerait un rôle précoce de Ikaros dans le développement de ces cellules. Les autres lignées (myéloïdes et érythroïdes) ne sont pas affectées. Les souris meurent dans les 4 premières semaines d'infections opportunistes.

La mutation hétérozygote (Ik^{DN/+}) présente un phénotype moins sévère avec un développement normal des cellules LB, la présence des cellules LT matures (mais pas de cellules LT immatures), mais il y a développement des leucémies lymphoïdes de type T dans 100 % des cas, avec la mort des animaux dans les 3 à 6 mois (Winandy *et al.*, 1995).

3.3.2. La mutation nulle : Ik^{-/-}

La mutation nulle (Ik^{-/-}) a été créée par le même groupe deux ans plus tard (Wang *et al.*, 1996). Elle est due à une délétion de l'exon 8 qui code pour le domaine de dimérisation de la protéine (fragment C-terminal). La protéine Ikaros engendrée est instable et vite dégradée, on a donc une absence totale de la protéine Ikaros dans ces souris. Cette mutation à la différence de la mutation Ik^{DN/DN}, est nulle que pour Ikaros et n'affecte aucun autre membre de cette famille.

Le phénotype obtenu présente une absence des cellules LB et NK, et DC. Les cellules LT sont absentes au niveau fœtal, mais des cellules LT $\alpha\beta$ sont présentes au stade adulte, peut-être grâce à l'activité de la protéine Helios (Hahm *et al.*, 1998 ; Kelley *et al.*, 1998). Les cellules LT présentes ont tendance à proliférer fortement après stimulation du TCR. Il n'y a pas de défaut dans les lignées myéloïdes et érythroïdes. Les souris hétérozygotes (Ik $^{-/+}$) présentent un rabaissement du seuil d'activation antigénique du TCR des cellules LT, ce qui entraîne une augmentation de la prolifération et de l'entrée en phase S des cellules LT (Avitahl *et al.*, 1999 ; Boggs *et al.*, 1998 ; Nichogiannopoulou *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 1996 et Wu *et al.*, 1997).

3.3.3. La mutation plastic : Ik^{plstc}

Les souris plastics (Ik^{plstc}) sont issues d'une mutation ponctuelle présente au niveau du doigt de zinc n°3 (exon 5). Cette mutation a été produite par un agent mutagène, le N-nitroso-N-éthylurée ou ENU qui a induit une transition de type A $\rightarrow$ G, ce qui a transformé une Histidine en Arginine, détruisant la structure tertiaire du doigt de zinc, et inhibant la liaison de la protéine à l'ADN. La protéine est donc exprimée à un niveau similaire à celui des souris sauvages (WT), bien qu'elle soit de type Dn (Papathanasiou *et al.*, 2003).

Le phénotype obtenu est cependant bien plus sévère que celui observé pour les souris Ik^{DN}. Il y a une absence des cellules LB, des cellules LT fœtales, les granulocytes et les érythrocytes sont fortement diminués, alors que les populations de monocytes/macrophages sont augmentées. Les souris meurent d'anémie avant la naissance ce qui est lié au défaut dans la différenciation des cellules érythrocytaires. Comme dans le cas des souris Ik^{DN/DN}, les symptômes observés semblent être le résultat d'une inactivation des différents membres de la famille, suite à la perte du domaine DBD, et à la capture et immobilisation des autres protéines par dimérisation. Les souris hétérozygotes (Ik^{plstc/+}) présentent des anomalies similaires pour les thymocytes, malgré un nombre anormalement élevé de cellules LT dans la rate après la naissance. Les cellules LB fœtales présentent un blocage de développement, alors que les LB adultes se développent normalement avant un blocage lors du réarrangement des IgH. Les souris présentent un développement de leucémies T vers 4 mois de vie.

3.3.4. La mutation hypomorphique : $Ik^{L/L}$

Les souris hypomorphiques ($Ik^{L/L}$) ont été générées dans mon laboratoire de thèse. La lignée de souris $Ik^{L/L}$ présente une mutation hypomorphe du gène *Ikzf1*, entraînant un faible taux d'expression de la protéine Ikaros fonctionnelle dans les cellules hématopoïétiques. Cette mutation a été créée par une insertion de la séquence de la région codante du gène *LacZ* (β -galactosidase) dans la séquence de l'exon 3 d'*Ikzf1*. Ces souris mutantes devaient permettre une visualisation de l'expression du gène dans les différentes populations cellulaires grâce à l'activité de la β -galactosidase, ainsi qu'une inactivation totale du gène. En réalité, des protéines Ikaros sont toujours exprimées à un niveau réduit (10 % d'expression par rapport au sauvage WT) suite à un épissage alternatif en phase omettant l'exon 3 modifié, et générant des protéines Ikaros fonctionnelles et tronquées (Kirstetter *et al.*, 2002).

Le phénotype de ces souris est peu sévère comparé aux autres types de souris présentées dans cette partie. Ces souris ne présentent pas de cellule LB fœtale, et ont un blocage dans le développement des LB adultes (diminution du seuil d'activation du BCR, différenciation des LB IgM^+ retardée, défaut dans les anticorps IgG produits), et une absence de pDC mature. Les cellules LB et LT sont hyper-prolifératives, ce qui entraîne l'apparition de leucémies T au bout de 20 semaines.

3.3.5. La mutation conditionnelle : $Ik^{f/f}$ Mb1-Cre⁺

Notre équipe a généré une lignée murine présentant une mutation conditionnelle de l'exon 8 du gène *Ikzf1*. La lignée murine $Ik^{f/f}$ a été générée en insérant des sites loxP entourant l'exon 8 du gène *Ikzf1* et a été croisée avec une lignée murine Mb1-Cre, exprimant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *Ig α* . La délétion est effectuée de façon conditionnelle au stade immature pro/pré-B. Les souris obtenues ne présentent pas de défaut sur les lignées cellulaires T, NK, DC, ou myéloïdes. Elles présentent un blocage du développement et de la différenciation des cellules B entre le stade large-pré B et small pré-B. Il n'y a cependant pas de développement de lymphome B dans ces souris (Heizmann *et al.*, 2013).

Modèle murin	Mutation	Génotype	Phénotype	Références
Aiolos (<i>Ikzf 3</i>)				
Aiolos^{-/-}	Délétion de l'exon 8 donc du domaine de dimérisation	Aiolos ^{-/-}	- Pas de déficience des cellules T. - Nombre normal cellules pré-B, ↑ 50 % des cellules pro-B, ↓ 50 % cellules B re-circulantes. - Nombre de cellules B constant dans la rate mais ↓ cellules B naïves et ↑ cellules B dans les centres germinatifs. - Présence d'anticorps auto-réactifs.	Wang <i>et al.</i> , 1998
Helios (<i>Ikzf 2</i>)				
Helios^{-/-}	Délétion de l'exon 8 donc du domaine de dimérisation	Helios ^{-/-}	- Populations de cellules myéloïdes ou érythroïdes normales - Populations de cellules T, Treg et NKT normales	Cai <i>et al.</i> , 2009
Ikaros (<i>Ikzf 1</i>)				
Ik^{DN}	Délétion de l'exon 4 et 5 donc du domaine DBD	Ik ^{DN/DN}	- ⊖ des cellules lymphoïdes : L, B, NK et DC (mais pas cellule de Langerhans). - lignages myéloïdes et érythroïdes normaux. - ↓ activité des cellules HSC. - 95 % des souris meurent d'infections opportunistes au cours des 4 premières semaines de vie.	Avitahl <i>et al.</i> , 1999 Boggs <i>et al.</i> , 1998 Georgopoulos <i>et al.</i> , 1994 Nichogiannopoulou <i>et al.</i> , 1999 Winandy <i>et al.</i> , 1995 Wu <i>et al.</i> , 1997
		Ik ^{DN/-}	- ⊖ Cellules T immatures (DP ou SP) - ↑ Cellules T matures (CD4⁺CD8⁺TCR^{hi}). - ↑ proliférations et entrée en phase S des cellules T après stimulation du TCR, ou en réponse à l'IL-2. - Développement normal des cellules B. - Meurent entre 3 et 6 mois de leucémie T avec 100 % de pénétrance.	
Ik^{-/-}	Délétion de l'exon 8 donc du domaine de dimérisation	Ik ^{-/-}	- ⊖ Cellules B foetales et adultes, DC et des NK. - ⊖ Cellules T foetales mais présence des Tαβ mais pas Tγδ matures. - ⊖ de défauts dans les lignées myéloïdes et érythroïdes. - ↓ Cellules DP, ↑ cellules T CD4⁺ mais pas CD8⁺ - ↑ Prolifération des cellules T après stimulation du TCR - ↓ Activité des HSC. - Meurent au bout de 4 mois de leucémies T.	Avitahl <i>et al.</i> , 1999 Boggs <i>et al.</i> , 1998 Georgopoulos <i>et al.</i> , 1994 Nichogiannopoulou <i>et al.</i> , 1999 Wang <i>et al.</i> , 1996 Wu <i>et al.</i> , 1997
		Ik ^{-/+}	- ↑ Prolifération des cellules T après stimulation du TCR ou en réponse à l'IL-2. - ↑ Entrée en phase S des cellules T.	

Ik^{plstc/plstc}	Mutation ponctuelle A-> G altérant la conformation spatiale du 3ème doigt de zinc du DBD empêchant sa fixation à l'ADN	Ik ^{plstc/plstc}	- ⊖ Cellules B matures et T fœtales. - Présence de cellules B dans le thymus fœtal. - ↓ Granulocytes et érythrocytes. - ↑ Populations monocytes et macrophages. - Meurent d'une anémie <i>in utero</i>.	Papathanasiou <i>et al.</i> , 2003
		Ik ^{plstc/+}	- Anomalies similaires aux souris Ik^{plstc/plstc} - ↑ Cellules T dans la rate après la naissance. - Blocage développement cellules B fœtales mais pas B matures (blocage lors du réarrangement IgH). - Développement leucémies T au bout de 4 mois.	
IK^{L/L}	Insertion du gène codant pour la β-galactosidase dans l'exon 3, ce qui induit un épissage alternatif et donc une mutation hypomorphique	Ik ^{L/L}	- ⊖ Cellules B fœtales - Blocage dans le développement des cellules B : ↓ seuil d'activation du BCR, différenciation des cellules B IgM+ retardé, défaut IgG produits) - ⊖ Cellules pDC matures. - ↑ Prolifération cellules T et B - Apparition de leucémies T au bout de 20 semaines.	Allman <i>et al.</i> , 2006 Dumortier <i>et al.</i> , 2006 Kirstetter <i>et al.</i> , 2002 Sellars <i>et al.</i> , 2009.
		Ik ^{L/+}	- ↑ Prolifération des thymocytes après stimulation avec un anticorps anti-CD3.	
Ik^{f/f}Mb1-Cre⁺	Délétion conditionnelle de l'exon 8 donc du domaine de dimérisation	Ik ^{f/f} Mb1-Cre ⁺	- ⊖ Défauts des cellules T, NK, DC ou myéloïdes. - Blocage de différenciation des cellules B entre le stade large-pré-B et small-pré-B - Pas de lymphome B.	Heizmann <i>et al.</i> , 2013

Table I1 : Caractéristiques des différents modèles murins disponibles pour les membres de la famille Ikaros : Aiolos, Helios et Ikaros.

Matériels et Méthodes

1. Cellules et culture cellulaire

1.1. Lignées cellulaires

La lignée cellulaire ILC87 est dérivée d'une tumeur thymique primaire d'une souris $Ik^{fl/fl}$ Lck-Cre⁺. Cette lignée murine floxée présente un exon 8 du gène *Ikzf1* (contenant le domaine de dimérisation) flanqué de sites LoxP, et contient un transgène permettant d'exprimer la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur du gène Lck qui est spécifique des lymphocytes T (**Figure M1**). Il y a alors une délétion de l'exon à partir du stade de développement DN2. Ces souris présentent une absence de la protéine Ikaros dans les lymphocytes T. Elles développent des tumeurs thymiques avec 100 % de pénétrance et meurent au bout de 15 semaines. La lignée cellulaire ILC87 présente un phénotype de type DN et SP CD4⁺ et une absence d'expression d'Ikaros au niveau protéique.

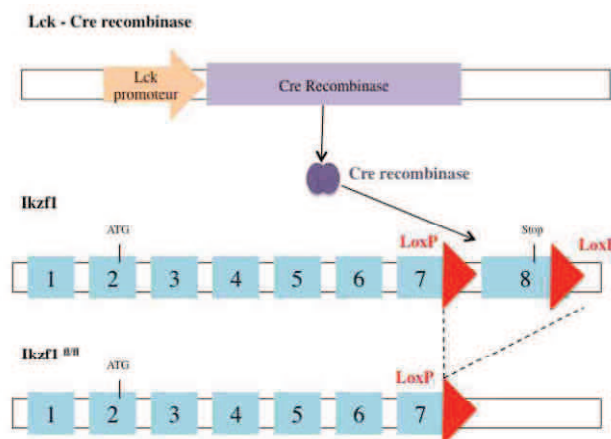


Figure M1 : Structure génétique de la lignée cellulaire ILC87 réalisée.

Le gène codant pour Ikaros est constitué de 8 exons. Le deuxième exon contient le site initiateur de la traduction et le dernier exon contient le codon d'arrêt de la traduction (STOP).

Dans une lignée de souris, un site LoxP a été inséré en amont du dernier codon et le deuxième site LoxP se trouve en aval du codon STOP. Une deuxième lignée murine possède la séquence de la Cre-recombinase, fusionnée au gène Lck. La délétion de la séquence se trouvant entre les deux sites LoxP conduit à la suppression de l'exon 8, ce qui a pour conséquence d'inactiver Ikaros (forme tronquée inactive). Les cellules possédant une forme inactive d'Ikaros vont développer une leucémie T. Ces cellules de thymus ont été prélevées et mises en culture.

La lignée cellulaire d'empaquetage écotrope, EcoPhoenix est dérivée de fibroblastes murins génétiquement modifiés afin de produire des éléments rétroviraux tels que les protéines d'enveloppe (*env*) reconnaissant spécifiquement les cellules murines.

Les cellules 3T3 sont des fibroblastes embryonnaires humains.

1.2. Génération de constructions chimériques : AdI et IdA

Les lignées chimériques ont été réalisées par un clonage dans des bactéries DH5 α . Ce clonage a permis d'obtenir les constructions Aiolos-DBD-Ikaros et Ikaros-DBD-Aiolos. La première étape du clonage a été de réaliser une insertion des séquences d'ADNc codant pour Aiolos ou Ikaros dans le vecteur pMig en amont de la séquence codant pour le domaine de liaison du récepteur humain des estrogènes (ER). Les séquences d'ADNc insérées ne comportaient pas de codon stop, ce qui permet l'obtention de protéines de fusion Aiolos-ER et Ikaros-ER (codon stop en aval de la séquence ER). Cette étape est réalisée par coupure avec les enzymes de restriction BglII et EcoRI qui permettent une insertion dirigée des séquences d'intérêt dans celle du vecteur (**Figure M2.b**). La séquence d'ADNc codant pour les domaines DBD d'Ikaros et d'Aiolos respectivement, est insérée au sein des séquences d'ADNc codant pour les protéines Aiolos et Ikaros grâce à une coupure par l'enzyme de restriction NsiI puis par ligation (**Figure M2.a**). Le vecteur possède un IRES (Internal Ribosomal Entry Site) suivi d'une séquence codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein). L'insertion se fait en amont de la séquence IRES (**Figure M2.b**).

a. Construction Aiolos DBD Ikaros - ER



Construction Ikaros DBD Aiolos - ER



b. Vecteur rétroviral pMig : pMSCV-Ires-eGFP

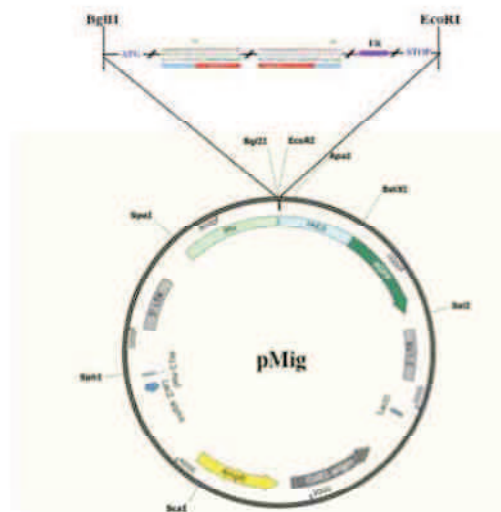


Figure M2 : Schéma de la construction des lignées chimériques ILC87-AdI-ER et ILC87-IdA-ER dans le vecteur rétroviral pMig.

1.3. Conditions de culture

Les lignées cellulaires ILC87 vides et transduites sont cultivées dans du milieu RPMI1640 supplémenté avec 25 mM d'HEPES, 10 % de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur, 1mM de pyruvate de sodium, 50 µg/ml gentamicine, 1 % pénicilline, 1 % gentamicine et 2mM de L-Glutamine.

Les cellules EcoPhoenix sont cultivées dans du milieu DMEM (4,5g/l glucose) complété avec 10 % de sérum de veau fœtal, 1mM de pyruvate de sodium, 1 % pénicilline et 1 % gentamicine.

Les cellules 3T3 sont cultivées dans du DMEM (1g/l glucose) complété avec 10 % de sérum de veau fœtal, 1mM de pyruvate de sodium et 50 µg/ml gentamicine.

1.4. Traitement des cellules au 4-hydroxytamoxifène

Le 4-hydroxytamoxifène (ou 4-OHT, H7904, Sigma-Aldrich) a été re-suspendu dans de l'éthanol à une concentration finale de 100 mM. Les cellules ILC87 ont été mises à une concentration de 10^6 cellules/ml et ont été traitées avec 100 nM de 4-OHT ou un volume équivalent d'EtOH pendant 12, 24 ou 48 heures.

2. Clonage et vecteurs utilisés.

2.1. Vecteurs rétroviraux.

J'ai utilisé le vecteur rétroviral pMig dont la séquence promotrice MSCV permet l'expression de gènes dans les cellules souches embryonnaires et hématopoïétiques murines. Le vecteur possède un IRES (Internal Ribosomic Entry Site) suivi d'une séquence codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein).

Les protéines de la famille Ikaros ont été fusionnées au domaine de liaison du ligand du récepteur humain des estrogènes afin de générer les protéines : Aiolos-ER, Eos-ER, Helios-ER et Ikaros-ER. Le domaine de liaison du ligand de ER humain est modifié afin de pouvoir se lier et être activé uniquement par un antagoniste appelé 4-hydroxytamoxifène (abrégée 4-OHT), et non pas par les œstrogènes naturels. Le 4-OHT étant un antagoniste partiel des oestrogènes, il ne permet pas les changements conformationnels induisant la fonction activatrice de la transcription associée au LBD (Ligand Binding Domain) du ER. Il permet d'induire la translocation de la protéine de fusion dans le noyau.

L'ajout de 4-OHT permet la translocation des protéines dans le noyau et permet leurs actions comme facteur de transcription. L'activité observée est donc uniquement le résultat des protéines d'intérêt. On peut ainsi provoquer l'activation des différentes protéines de façon inductible, au moment où on le souhaite. Le 4-OHT étant dilué dans de l'éthanol celui-ci sert de contrôle négatif lors des expériences. Les gènes codant pour les protéines de fusion Aiolos-ER, Helios-ER et Ikaros-ER sont insérés en amont de l'IRES en 5' du vecteur. L'expression du gène codant pour la GFP étant similaire à celle de la protéine d'intérêt, elle permet de suivre son expression au cours du temps, et de trier les populations cellulaires exprimant les protéines à un niveau souhaité. J'ai choisi de trier les populations cellulaires exprimant des niveaux de GFP équivalents afin d'avoir une expression similaire des différentes protéines.

2.2. Production des vecteurs

Les vecteurs sont amplifiés grâce à des bactéries DH5 α par un choc thermique qui va induire un stress, qui finira de fragiliser la membrane et facilitera l'entrée de l'ADN plasmidique dans les cellules. Les cellules sont ensuite mises dans du milieu de culture sans antibiotique à 37 °C durant 45 minutes environ, afin de permettre l'expression des gènes de résistance aux antibiotiques qui sont portés par le plasmide intégré. Cette étape est essentielle pour permettre les sélections des bactéries présentant les plasmides d'intérêt.

2.3. Production des virus

Afin de produire les rétrovirus nécessaires à la génération des différentes lignées cellulaires, les différents vecteurs rétroviraux ont été transfectés par la technique du phosphate de calcium dans des cellules d'emballage appelées EcoPhoenix. Les surnageants cellulaires récupérés contenant les virus produits sont ensuite récoltés, filtrés, aliquotés et congelés. Les surnageants viraux sont titrés sur des cellules 3T3, avant d'être utilisés pour transduire les cellules ILC87.

Pour certaines lignées cellulaires, on procède à la concentration du surnageant viral en réalisant une centrifugation des aliquots de 1ml pendant 1h à 13.000 rpm, puis en aspirant le surnageant et en reprenant le culot dans 100 μ l de milieu de culture. Cette étape permet d'obtenir un virus 10 fois plus concentré.

2.4. Obtention des lignées cellulaires stables par transduction rétrovirale.

Les cellules ILC87 sont mises à 10⁶ cellules/ml pendant 2 jours avant la réalisation de la transduction. 2.10⁶ cellules sont infectées avec 0,5 ml de surnageant viral par centrifugation pendant 90 min à 2600 rpm en présence de 4 μ g/ml de polybrène, et de même le lendemain. Les cellules sont remises en culture à 10⁶ cellules/ml le lendemain. Les cellules GFP⁺ sont triées par cytométrie en flux de manière stérile 48h après la première transduction et mises en culture à 10⁶ cellules/ml.

Les transductions avec des virus concentrés sont réalisées dans des plaques 12 puits avec 0,8.10⁶ cellules/ml infectées avec 100 μ l de virus concentré pendant 90 min à 2600 rpm en présence de 2 μ g/ml de polybrène. Après les deux transductions réalisées à 24h d'intervalle, les cellules sont triées et traitées de la même façon que précédemment.

3. Analyse par cytométrie en flux

3.1. Tri des cellules GFP+ pour la création des lignées stables.

Deux jours après la transduction virale par centrifugation, les différentes lignées cellulaires obtenues sont triées grâce à leur niveau d'expression de la GFP. Seules les cellules présentant une forte expression de la GFP sont triées par un FACS DIVA (BD Biosciences) ou un FACS ARIA II (BD Biosciences) à une pression de 40 p.s.i. avec une buse de 100 μ M, de manière stérile afin d'être remises en culture. Les différentes lignées sont triées avec un niveau d'expression de la GFP similaire afin d'obtenir des niveaux d'expression équivalents des différentes protéines de la famille Ikaros et de pouvoir comparer les différentes lignées.

3.2. Analyse de la différenciation.

L'analyse de la différenciation des cellules ILC87 est réalisée par cytométrie en flux. Les cellules sont récupérées dans le milieu de culture et sont lavées avec du PBS 1X BSA 0,5 %. Elles sont ensuite déposées dans des puits à fonds ronds de plaques 96 puits (200 μ L de PBS 1X BSA 0,5 % pour 5 millions de cellules). Les puits sont remplis de tampon puis centrifugés. Le surnageant est ôté par retournement d'un mouvement rapide et les cellules culottées re-suspendues à l'aide d'un vortex. Les cellules sont mises en contact avec les anticorps dilués dans la solution de PBS 1X- BSA 0,5 % pendant 15 minutes sur glace (pour préserver l'intégrité cellulaire et les interactions entre les anticorps et leurs cibles) dans l'obscurité (pour éviter le photo-bleaching), avant d'être lavées et remises en suspension dans 200 μ l de la même solution.

Les marquages réalisés sont les suivants :

Anticorps	Fluorochrome	Fournisseur
CD4	Pe	eBioscience
CD8	PerCP Cy5.5	BDPharmigen
CD25	APC	Biolegend
CD44	FITC	BDPharmigen

Dans d'autres puits sont déposées 5×10^6 cellules provenant de rate de souris WT, afin de servir de contrôles simples couleurs. Les contrôles simples couleurs sont des cellules de rate WT marquées par un seul anticorps couplé à un fluorochrome donné. Ils permettent alors de visualiser les différents fluorochromes indépendamment les uns des autres. Les valeurs enregistrées pour ces contrôles permettent d'effectuer les compensations entre les

fluorochromes. L'analyse est réalisée avec un cytomètre en flux LSRII Becton Dickinson (Mountain View, Ca).

3.3. Analyse du nombre de cellules.

Les cellules sont mises en culture à 1 million de cellules / mL en présence de 4-OHT ou d'EtOH. Toutes les 24 heures les cellules sont comptées par microscopie optique (lame de Malassez), et on mesure le pourcentage de cellules GFP⁺ au cytomètre en flux BD FACS Calibur. On pourra alors connaître le nombre de cellules GFP⁺ en culture. Les cellules sont alors remises en culture à raison de 1 million de cellules/ mL. Les cellules sont suivies ainsi pendant 4 jours.

3.4. Analyse de l'apoptose cellulaire.

Le processus apoptotique s'accompagne de différentes modifications morphologiques des cellules parmi lesquelles ; la formation de corps apoptotiques ou l'exposition des phosphatidylsérines (PS) de la membrane vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Il est possible de détecter spécifiquement cette externalisation par un marquage des cellules à l'annexine-V en présence de Ca²⁺. Ceci est réalisé grâce à l'utilisation du kit « Annexin V-APC Staining eBioscience ». Les cellules nécrotiques peuvent aussi exposer les PS suite à la perte de l'intégrité membranaire. On réalise un co-marquage au DAPI afin de visualiser les cellules en apoptose précoce ou tardive.

Les cellules sont remises en suspension dans du Binding Buffer 1X à raison de 1 million de cellules/mL. On ajoute 5 µL de Annexin-APC à 100 µL de cellules et on incube 15 minutes à température ambiante dans le noir. Les cellules sont ensuite lavées dans du Binding Buffer 1X et remises en suspension dans 200 µL de solution. Après avoir dilué le DAPI stock (10 mg/mL) au 1/1000, on ajoute 2 µL de cette dilution de DAPI dans les 200 µL de cellules en suspension. Elles sont ensuite analysées par cytométrie en flux avec un cytomètre LSRII Becton Dickinson (Mountain View, Ca).

3.5. Marquage intracellulaire

Un marquage extracellulaire pour les antigènes de surface est réalisé comme décrit précédemment. Les cellules sont ensuite fixées avec une solution de Perméabilisation/Fixation (eBioscience) afin de fixer les anticorps utilisés pour le marquage des antigènes de surface et la forme de la cellule pendant 30 minutes. La fixation est une étape

importante car elle permet d'éviter de perdre à la fois l'intégrité cellulaire et celle du couple anticorps/fluorochrome. Les cellules sont ensuite lavées avec du tampon de Perméabilisation qui permet de former des pores dans la membrane cellulaire et permettre l'entrée des anticorps utilisés pour le marquage intracellulaire. Les anticorps sont dilués dans la solution de Perméabilisation à raison de 50 µL par puits et mis sur les cellules pendant 30 minutes dans le noir sur glace. Le marquage est réalisé en deux étapes. D'abord, avec les anticorps primaires couplés à la biotine qui a une très forte affinité pour la streptavidine ($K_d=10^{-15}$). Puis dans un deuxième temps, avec un mélange d'anticorps secondaires composé d'anticorps directement couplés aux fluorochromes, qui inclut également la streptavidine couplée aux fluorochromes.

Les cellules sont lavées avec 200 µL de solution de Perméabilisation. Elles sont ensuite analysées par cytométrie en flux avec un cytomètre en flux LSRII Becton Dickinson (Mountain View, Ca).

Les anticorps intracellulaires utilisés sont les suivants :

Anticorps	Fluorochrome	Dilution	Fournisseur
FoxP3	PE-Cy7	1/100	eBioscience
Aiolos	Purifié	1/100	eBioscience
Eos	PE	1/25	eBioscience
Helios	APC	1/100	Biolegend
Ikaros	Purifié- Rabbit	1/100	Fait Maison
Rabbit	APC	1/200	BDPharmingen
Mouse	PE	1/200	Invitrogen

4. RT-qPCR

4.1. Extraction de l'ARN

Les ARN totaux extraits des cellules ont été réalisés en suivant les instructions du kit RNeasy de Qiagen, et en ajoutant l'étape de dégradation de l'ADN génomique par la DNase I.

Les ARN sont re-suspendus au final dans de l'eau RNase free et quantifiés au Nanodrop.

4.2. Transcription inverse

Les ARN sont rétro-transcrits en ADNc à raison de 400 ng d'ARN par échantillon, afin d'obtenir des quantités identiques d'ADNc.

La première étape de la rétro-transcription consiste en une fixation des amorces oligo-dT sur les queues polyA des ARN. Elle est réalisée par une incubation de 5 minutes à 65 °C avec le mix 1 :

Oligo dT (stock 500 ng/μL)	0,2 μL
dNTP (mélange équimolaire des 4 bases – stock 10 mM)	1 μL
H ₂ O	Qsp à 11,6 μL

Une fois l'incubation terminée, les tubes sont placés sur glace pendant 10 minutes.

La deuxième étape est une étape d'élongation des ADNc, à l'aide du mix 2

DTT (0,1 M)	2 μL
RNasine (20 U/μL)	0,2 μL
First Strand Buffer (Invitrogen – 5X concentrée)	4 μL
SuperScript II reverse Transcriptase (Invitrogen)	1 μL

On ajoute 6,2 μL du mix 2 par tube et on incube le tout à 42 °C pendant 1 heure.

On ajoute ensuite 180 μL d'eau RNase free au 20 μL de milieu réactionnel, pour avoir un volume final de 200 μL (dilution au 1/10), puis on congèle les tubes.

4.3. qPCR

Les ADNc sont ensuite analysés et amplifiés avec un Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche) dans une réaction de PCR en une étape.

Cette réaction est réalisée en utilisant deux kits de SYBR Green différents :

- LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche)
- SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix (Sigma).

Le mix utilisé est :

ADNc à la bonne dilution	5 μL
Primer (sens/antisens équimolaire)	5 μL
SYBR Green mix	10 μL

Les programmes pour la machine qPCR sont les suivants :

		H19 et Rhox9 primers	RoryT primers	
94 °C – 5 min	94 °C – 5 min	94 °C – 5 min	94 °C – 5 min	50 cycle
94 °C – 30 sec	94 °C – 30 sec	94 °C – 30 sec	94 °C – 30 sec	
58 °C - 30 sec	60 °C - 30 sec	62/64 °C - 30 sec	65 °C - 30 sec	
72 °C – 30 sec	72 °C – 30 sec	72 °C – 30 sec	72 °C – 30 sec	
72 ° – 5 min	72 ° – 5 min	72 ° – 5 min	72 ° – 5 min	

Toutes les amorces utilisées ont été synthétisées chez Sigma-Aldrich. Voici un tableau regroupant les amorces utilisées :

Gene	Primer Sens	Primer Anti-sens	Fournisseur	Kit SYBR Green	T°C Hybridation
Housekeeping Gene					
Ubiquitine	GCAAGTGGCTAGAGTGCAGAGTAA	TGGCTATTAATTATTCGGTCTGCAT	SIGMA	Roche	60
Genès cibles de Ikaros					
Ctnd1	ATGATGATAGCACTCTCCC	AGTGTCTGTGTGGTCTC	SIGMA	Roche	60
Hes1	GCACAGAAAGTCATCAAAGC	TTGATCTGGGTCATGCAGTTG	SIGMA	Roche	60
Mpz12	Inconnu - Quantitect	Inconnu - Quantitect	Qiagen	Qiagen	55
Rorc	TCACCTGTGAGGGGTGCAAG	GTTCGGTCAATGGGGCAGTT	SIGMA	Roche	65
Scn4b	CGAGAGAAGAAGAAGGAGTG	CAGATAGGACTTGGCATCAG	SIGMA	Roche	60
Cd8α	AAGGGGACCGATTGGACTT	CTAGCGGCCCTTGGGACATTTG	SIGMA	Roche	60
Cd4	CAGTGTTCCTGGCTTGCCTG	GCTGCCTGGCGCTGTTG	SIGMA	Roche	60
Genès cibles de Helios					
Tsnax	AAAGAAGGACCAGGAGGGTTCA	GCATCACCGGCGAAGACAAA	SIGMA	Roche	60
Plexd2	CTGCAATGCCGACTGGATGG	ATGAATCATGGGAGCCTGGGA	SIGMA	Roche	60
Cpe	GCGGTCCTAACAATCACCTGC	TCTCGGGGGCAAGCTTTGAA	SIGMA	Roche	60
CD7	CCCTGGATGCCCAAGACGTA	AGAGGCAATCGTGAGTCGGG	SIGMA	Roche	60
Gene	Primer Sens	Primer Anti-sens	Fournisseur	Kit SYBR Green	T°C Hybridation
Genès cibles de Ikaros et Aiolos					
Cdkn1a	CTGTCTTGCCTCTGGTGTCTGAG	TTTTCTTTCGAGAAGACCAATCTG	SIGMA	Roche	68
Med11	CGCTCAAATCCGCTACCTCA	CCTATCGCGTAAGAGGCAGT	SIGMA	Roche	60
Cdc23	ACCTTCTGGCCCTCTCTAA	TGACTCCACCTCTGGGTCAT	SIGMA	Roche	60
Cflar	TTCTGCCTCTGTCTGCTTGC	ATGCAGGCATACCCACAAA	SIGMA	Roche	60
Rhox9	GGCTGGGAACATCTGGCTC	ATCCCTCCTTACTCGCAAGC	SIGMA	Roche	60
H19	GGTCGGATAAAGGGGAGCTG	TATGTGCCATTCTGCTGCGA	SIGMA	Roche	60

4.4. Analyse des RT-qPCR

4.4.1. Au niveau du Light Cycler

Les courbes de fusion permettent de voir si tous les échantillons se comportent de la même manière et présentent un point de fusion identique. D'autres pics sur cette courbe indiquent des valeurs aberrantes (duplex de primer, eau, échantillons contaminés) et sont à éliminer.

Les gammes étalons permettent de déterminer les échantillons dont la valeur est extrapolée et qui sont à éliminer. On peut ainsi déterminer la différence en CP entre les points externes de la gamme et l'échantillon test. La gamme étalon utilisée est composée d'ADNc provenant des lignées ILC87-Aiolos-ER, ILC87-Eos-ER, ILC87-Helios-ER et ILC87-Ikaros-ER à part égale (1/4 de chaque), afin de minimiser les différences entre les lignées lors des analyses.

Il faut au minimum deux bons échantillons sur les trois réplicats pour pouvoir continuer l'analyse.

4.4.2. Au niveau d'Excel

Je commence par calculer la concentration moyenne à partir des deux ou trois échantillons sélectionnés ainsi que l'écart-type (qui doit être inférieur à 10 % de la moyenne).

Je fais ensuite une normalisation des résultats par rapport à la moyenne obtenue pour l'ubiquitine. Je divise chaque valeur obtenue pour un gène par la valeur moyenne pour l'ubiquitine et je calcule ensuite l'écart-type des valeurs normalisées ce qui me permet d'obtenir les barres d'erreurs.

5. Western Blot

5.1. Extractions protéiques

On a réalisé soit des extraits totaux ou des extraits cytoplasmiques et nucléaires.

- Les extraits totaux ont été réalisés par re-suspension des culots cellulaires dans une solution de bleu de charge protéique 1X concentrée (Tris HCl pH 6,8 50 mM, SDS 2 %, Glycerol 10 %, 2-mercapto-ethanol 100 mM, bleu de bromophénol) et bouillis pendant 10 minutes.
- Afin de séparer les protéines cytoplasmiques et les protéines nucléaires on réalise une extraction en deux étapes. D'abord un tampon A (HEPES 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 0,5 mM, inhibiteur de protéases (PIC 1X de Roche) qui permet l'extraction des protéines cytoplasmiques. On ajoute 200 μ L de tampon A à un culot de 5 M de

cellules pendant 10 minutes sur glace. Les tubes sont ensuite centrifugés à 11 000 rpm pendant 10 secondes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est récupéré (180 μ L), et on lui ajoute 90 μ L de solution de bleu de charge 3X (Tris HCl pH 6,8 150 mM, SDS 6 %, Glycerol 30 %, 2-mercapto-ethanol 100 mM, bleu de bromophénol) puis bouilli pendant 10 minutes. Le culot restant contient les noyaux et sera re-suspendu avec 200 μ L de solution de bleu de charge 1X.

On déposera des extraits équivalents à 4.105 cellules par puits (16 μ L d'extraits nucléaires ; 21,6 μ L d'extraits cytoplasmiques et 16 μ L d'extraits totaux) sur gel d'acrylamide.

5.2. Gels SDS-PAGE, transfert et incubation des anticorps

Le gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) est utilisé à une concentration de 10 % pour le gel de séparation (Tris HCl pH 8,8 1,5 M) et de 5 % pour le gel de concentration (Tris HCl pH 6,8 0,5 M). Après dépôt des échantillons et du marqueur de poids moléculaire (noté PM), on procède à la migration des échantillons dans du tampon de migration (Tris base 0,25 M, Glycine 2,5 M, SDS 0,5 % qsp H₂O milliQ).

Après un transfert en conditions humides à l'aide de tampon de transfert (Tris base 0,25 M, Glycine 1,9 M, ajout d'EtOH 100 à hauteur de 20 % du volume final, qsp H₂O milliQ), les membranes de PVDF (Immobilon-P, Millipore) sont saturées avec une solution de PBS-Tween 0,1 %-lait 5 % pendant 1 heure à température ambiante, puis seront incubées pendant la nuit avec les anticorps.

Anticorps	Dilution	Origine	Tampon dilution
Anti-ER α	1/1000	IGBMC – Souris IgG1k	PBS-Tween 0,1%- BSA 5%
Anti-Ikaros	1/ 1000	IGBMC – polyclonal rabbit	PBS-Tween 0,1%- BSA 5%
Anti-TBP	1/2000	IGBMC - Souris IgG1k	PBS-Tween 0,1%- BSA 5%
Anti- β actine	1/10.000	A1978 – Sigma Aldrich	PBS-Tween 0,1%- Lait 5%
Anti-GAPDH	1/2000	MAB374-Millipore	PBS-Tween 0,1%- Lait 5%
Anti-tubuline	1/20.000	IGBMC - Souris IgG1k	PBS-Tween 0,1%- Lait 5%

Les anticorps secondaires utilisés ensuite (anti-souris ou anti-lapin (pour anti-Ikaros)) sont couplés à la peroxydase et sont faits par la Plateforme Anticorps IGBMC. Ils sont utilisés à une dilution de 1/10.000 pour chacun des deux.

Les complexes sont révélés par les réactifs : SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo) ou Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

6. Puces à oligonucléotides Affymetrix

6.1. Hybridation des puces à oligonucléotides Affymetrix.

L'ARN total est isolé en utilisant le kit RNeasy (Qiagen), et les échantillons sont ensuite confiés à la plateforme BioPuces de l'IGBMC. Chaque échantillon a été réalisé en duplicat indépendant. La synthèse des ADN complémentaires des ARN, ainsi que l'hybridation sur les puces Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST ont été réalisées au sein de la plateforme selon les protocoles Affymetrix. Les données ont été normalisées afin de corriger les erreurs et les biais expérimentaux en utilisant l'algorithme RMA (Robust Multi-array Average) ; on obtient ainsi des valeurs en log2 qui peuvent être ensuite analysées.

6.2. Analyse des données générées par les puces Affymetrix.

Les valeurs en log2 obtenues ont été analysées par Excel afin de déterminer des gènes différentiellement exprimés. J'ai procédé au calcul des « Fold Change » ou FC entre les échantillons traités au EtOH et ceux traités au 4-OHT. Les FC ont été calculés pour les deux expériences indépendantes puis comparés entre eux afin d'éliminer les gènes dont les FC sont trop différents entre les expériences 1 et 2, ainsi que ceux dont le niveau de base entre les deux expériences est trop différent.

Après avoir réalisé un classement des gènes les plus exprimés et les moins exprimés, j'ai pu déterminer des gènes au profil d'expression différentiel entre les différentes lignées cellulaires testées. J'ai ensuite réalisé des Scatters plots par Excel afin de visualiser les niveaux d'expression des différents gènes.

Résultats

Préambule

La famille de facteurs de transcription Ikaros joue un rôle clef dans la différenciation lymphoïde. Les quatre membres de cette famille sont exprimés pendant les différents stades de la différenciation des cellules B et T, de façon ubiquitaire (Ikaros), ou plus restreinte (Aiolos, Eos et Helios).

Les différents membres de la famille présentent une très forte homologie en de nombreux points. Ils présentent une séquence protéique, dont l'organisation est fortement conservée entre eux avec deux motifs à doigts de zinc de type C_2H_2 . Il existe une forte identité de séquences protéiques entre les différents membres de la famille Ikaros. Cette homologie est encore plus forte au niveau des motifs à doigts de zinc et se situe entre 79 % et 99 % d'identités entre leurs séquences protéiques. Ces protéines ont une séquence de fixation sur l'ADN, dont le motif central homologue est la séquence nucléique : GGGAA. Malgré tout les différents membres présentent de nombreuses différences à la fois dans leurs localisations, expressions, fonctions ainsi que leurs gènes cibles.

Les membres de la famille et particulièrement son membre fondateur, Ikaros, sont apparentés à la protéine Hunchback présente chez la Drosophile, et qui est conservée au cours de l'évolution (Tautz D. et al., 1987 ; John L.B. et al., 2009). Cette conservation au cours de l'évolution montre l'importance des différents membres et pourrait laisser entendre que chaque protéine a un rôle spécifique au cours du développement. Ainsi, on peut se demander pourquoi il existe quatre protéines différentes ? Malgré leurs similitudes, elles présentent des rôles spécifiques et des profils d'expression indépendants. On peut ainsi se poser la question de ce qui fait la spécificité de chaque protéine. Mon travail de thèse est donc basé sur l'identification des spécificités et des différences fonctionnelles entre les protéines de la famille Ikaros.

Partie 1 :
Etablissement des lignées
cellulaires

Partie 1 : Etablissement des lignées cellulaires

Afin de pouvoir étudier les spécificités des différents membres, j'ai utilisé des lignées cellulaires issues de souris déficientes pour Ikaros. Ces lignées cellulaires n'expriment pas Ikaros, mais expriment les autres protéines de la famille de façon endogène. Afin de comparer les fonctions des différents membres de la famille sur les phénotypes observés ou la régulation de gènes, j'ai surexprimé les différentes protéines de la famille grâce à des vecteurs rétroviraux.

1. Génération des lignées

1.1. Caractéristiques de la lignée cellulaire ILC87

La lignée cellulaire ILC87 présente un phénotype de type DN et SP CD4⁺ (**Figure R1.b.**) et semble présenter une absence d'expression d'Ikaros au niveau protéique, qui est montrée par un Western Blot réalisé avec un anticorps dirigé contre l'épitope C-Terminal de Ikaros au sein des cellules ILC87 (**Figure R1.c et .d**) Une seconde analyse avec un anticorps anti-Ikaros dirigé contre l'épitope N-Terminal permettra de confirmer cette absence.

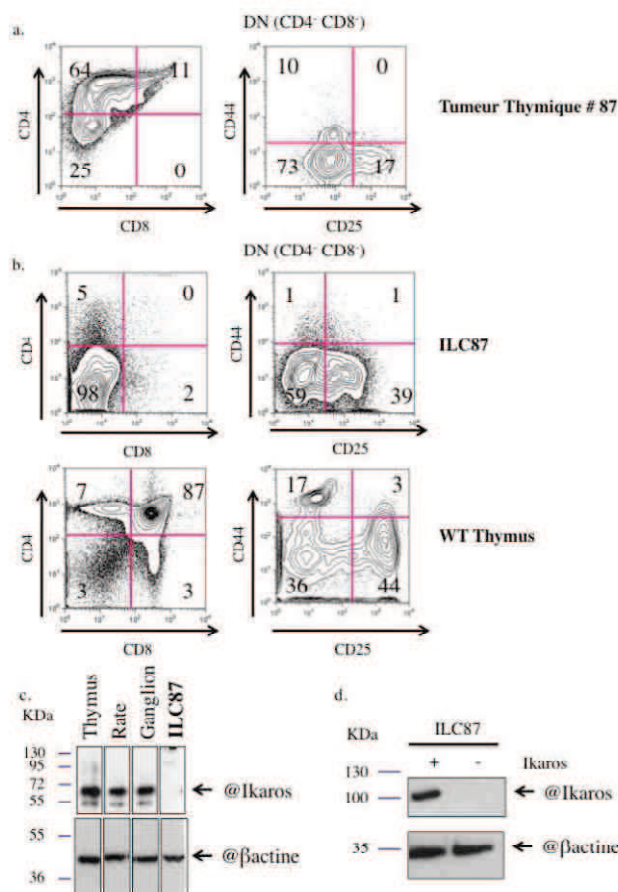


Figure R1 : Identification des caractéristiques de la lignée ILC87.

a : Analyse de l'expression des marqueurs CD4, CD8 α , CD25 et CD44 par cytométrie en flux de la tumeur thymique originale # 87 (données de Attila Oravecz).

b : Analyse de l'expression des marqueurs CD4, CD8 α , CD25 et CD44 par cytométrie en flux sur des cellules de la lignée ILC87 et des cellules de thymus de souris WT.

c : Analyse de l'expression de la protéine Ikaros dans des cellules issues du thymus, de la rate et des ganglions d'une souris WT, en comparaison avec des cellules de la lignée ILC87. Les anticorps utilisés sont un anti-Ikaros et un anticorps anti- β actine (données de Attila Oravecz).

d : Analyse de l'expression de la protéine de fusion Ikaros-ER dans les lignées ILC87 et ILC87-Ikaros-ER par Western Blot, en utilisant un anticorps primaire anti-Ikaros dirigé contre l'extrémité C-Terminale de la protéine. L'anticorps anti- β actine sert de contrôle.

1.2. Génération des lignées cellulaires dérivées de la lignée ILC87

La lignée cellulaire ILC87 est utilisée afin de ré-exprimer la protéine Ikaros et d'exprimer les autres membres de la famille (Aiolos et Helios). Le système utilisé pour ce faire est celui de la transduction virale. Les protéines de la famille Ikaros ont été fusionnées au domaine de liaison du récepteur humain des estrogènes (ER) afin de générer les protéines : Aiolos-ER, Helios-ER et Ikaros-ER. Ces constructions sont exprimées dans les cellules par l'intermédiaire d'un vecteur rétroviral.

L'activité des membres de la famille est inductible par l'ajout de 4-hydroxytamoxifen (noté 4-OHT). Le 4-OHT est un antagoniste partiel de l'oestradiol, qui permet de dissocier le domaine ER de la protéine HSP90 et permet ainsi d'induire la translocation de la protéine de fusion dans le noyau. Le ER utilisé a été modifié afin de ne pas présenter les changements conformationnels induisant l'activité de régulateur de la transcription associée au LBD (Ligand Binding Domain). Cette mutation permet ainsi d'empêcher la fixation aux estrogènes et d'éviter la régulation et l'expression des gènes spécifiquement régulés par les estrogènes en temps normal (Berry *et al.*, 1990 ; Feil *et al.*, 1996). J'utilise du 4-OHT qui est la forme métabolisée du Tamoxifen car cette étape ne peut être réalisée dans les lignées cellulaires.

Les lignées créées permettent l'expression des protéines Aiolos, Helios et Ikaros. Il y a aussi expression de protéines chimères : Aiolos-DBD-Ikaros et Ikaros-DBD-Aiolos. Afin d'étudier la spécificité des DBD de Aiolos et Ikaros, j'ai réalisé de nouvelles lignées cellulaires présentant un échange des deux domaines DBD. On obtient ainsi une lignée ILC87 exprimant Aiolos avec le DBD de Ikaros (notée Aiolos-DBD-Ikaros ou AdI), et une autre exprimant Ikaros avec la séquence du DBD de Aiolos (notée Ikaros-DBD-Aiolos ou IdA) (**Figure R2**).

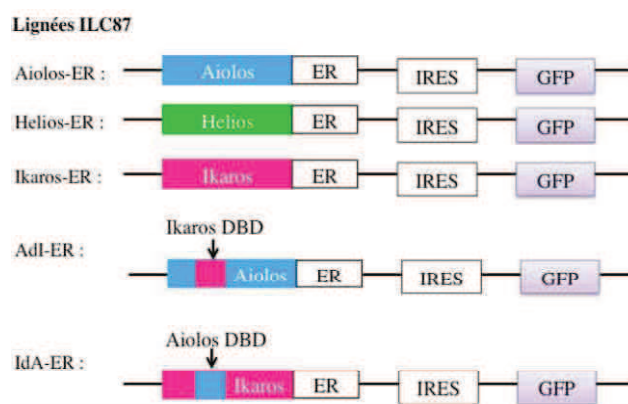


Figure R2 : Structure des différentes constructions insérées dans les différentes lignées cellulaires créées à partir de la lignée ILC87.

L'expression de la GFP permet le tri des populations cellulaires en indiquant le niveau d'expression des gènes d'intérêts, puis permet le suivi et la vérification des différentes lignées. Après transduction, j'ai trié les populations sur expression de la GFP afin d'obtenir des « lignées » cellulaires composées de populations hétérogènes et non pas de populations monoclonales. (**Figure R3**).

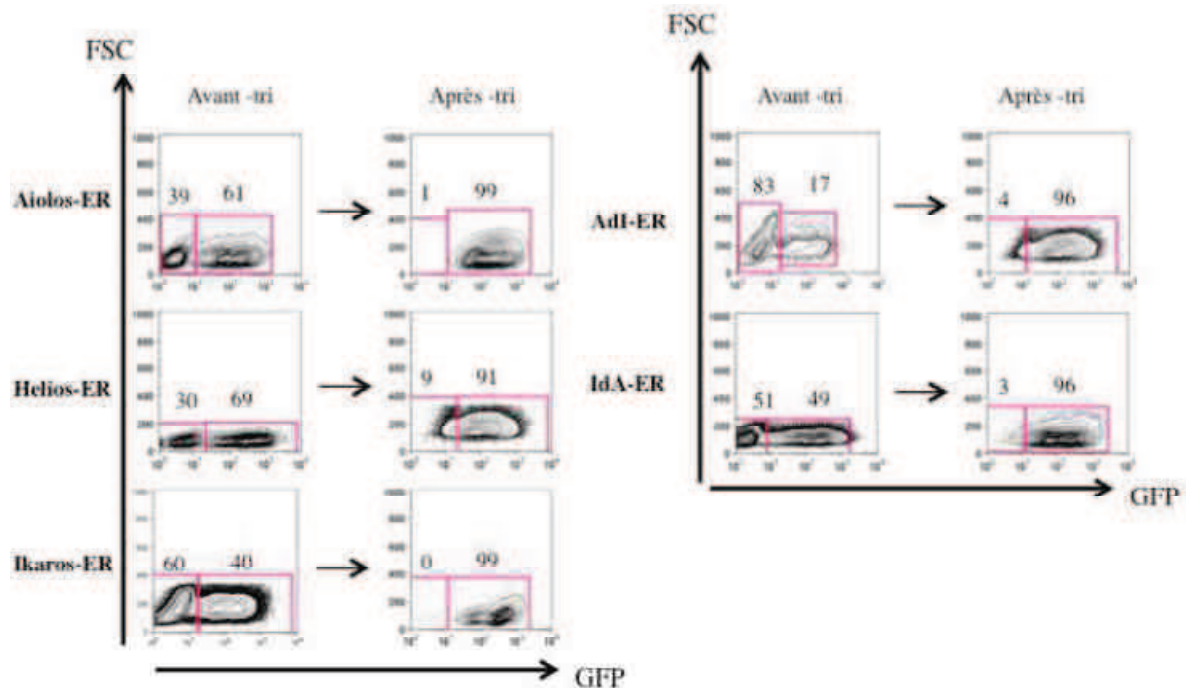


Figure R3 : Tri des populations cellulaires GFP+ formant les différentes lignées.

Le tri des populations cellulaires est réalisé par cytométrie en flux sur la base de l'expression de la GFP par les différentes lignes cellulaires. Les résultats sont présentés sous forme de dot plot et montrent le niveau d'expression de la GFP en fonction de la taille des cellules (FSC) avant et après tri.

2. Caractérisations des lignées cellulaires

2.1. Vérification des lignées cellulaires réalisées

La première étape après l'obtention des différentes lignées cellulaires a été de s'assurer de l'expression des protéines d'intérêt. Cette vérification peut se faire par l'analyse de la GFP par cytométrie en flux. Le cDNA codant pour la GFP est précédé par une séquence IRES permettant son expression dans la même proportion que celle du gène d'intérêt. J'ai pu donc vérifier le niveau d'expression de la GFP des différentes lignées, ce qui me donne à posteriori le niveau d'expression de chacune des protéines. On peut voir sur l'histogramme (**Figure R4**), que les différentes lignées cellulaires ont un taux de GFP à peu près similaire. Les lignées Aiolos-ER et Ikaros-ER présentent une expression de la GFP plus forte que celle des autres lignées. Toutes les lignées présentent des cellules qui sont GFP⁻ (en particulier la lignée

Ikaros-ER), ce qui peut provenir d'une perte de l'expression des protéines d'intérêt et de la GFP au cours du temps. Afin de limiter la perte d'expression de la GFP j'utilise des lots de cellules provenant du stock initial permettant ainsi d'avoir le même niveau d'expression des protéines pour les différentes expériences réalisées.

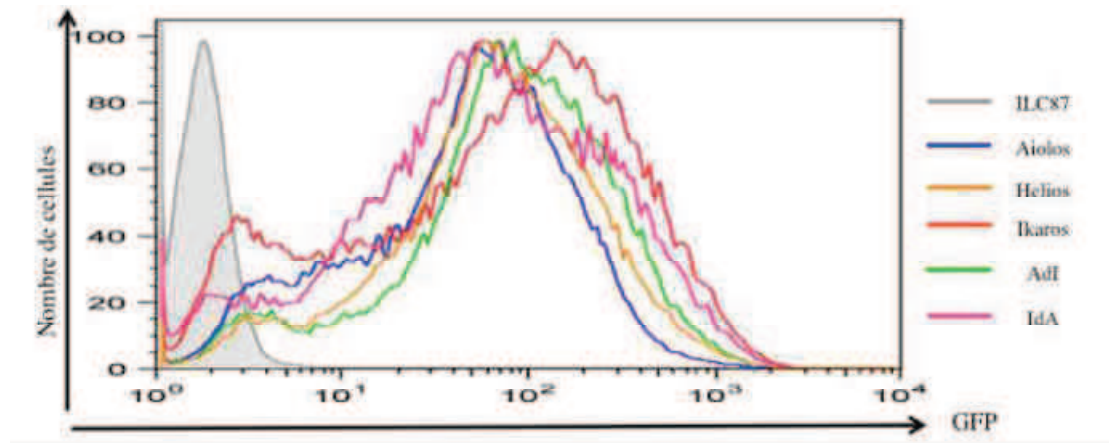


Figure R4 : Comparaison des niveaux d'expression de la GFP des différentes lignées.

Analyse de l'expression de la GFP observée par cytométrie en flux sans induction au 4-OHT pour les différentes lignées cellulaires : ILC87, ILC87-Aiolos-ER, ILC87-Helios-ER, ILC87-Ikaros-ER, ILC87-AdI-ER et ILC87-IdA-ER.

Afin de détecter l'expression des protéines sur-exprimées, j'ai réalisé des Western Blot sur des extraits totaux à l'aide d'anticorps dirigés contre la partie ER de la protéine de fusion. J'ai ainsi pu détecter de façon spécifique les protéines sur-exprimées et non les protéines endogènes.

On voit que les protéines Aiolos-ER, Helios-ER, Ikaros-ER, AdI-ER et IdA-ER sont exprimées à un niveau similaire (**Figure R5. a.**) J'ai réalisé une quantification des différentes bandes et j'ai normalisé leurs expressions à celle de la β -actine. On peut voir dans le graphique (**Figure R5.b.**) que les protéines Aiolos-ER, Ikaros-ER, IdA-ER sont exprimées au même niveau. La protéine AdI semble être moins bien exprimée que les autres membres de la famille, ce qui est aussi visible sur la membrane du Western Blot (**Figure R5.a.**).

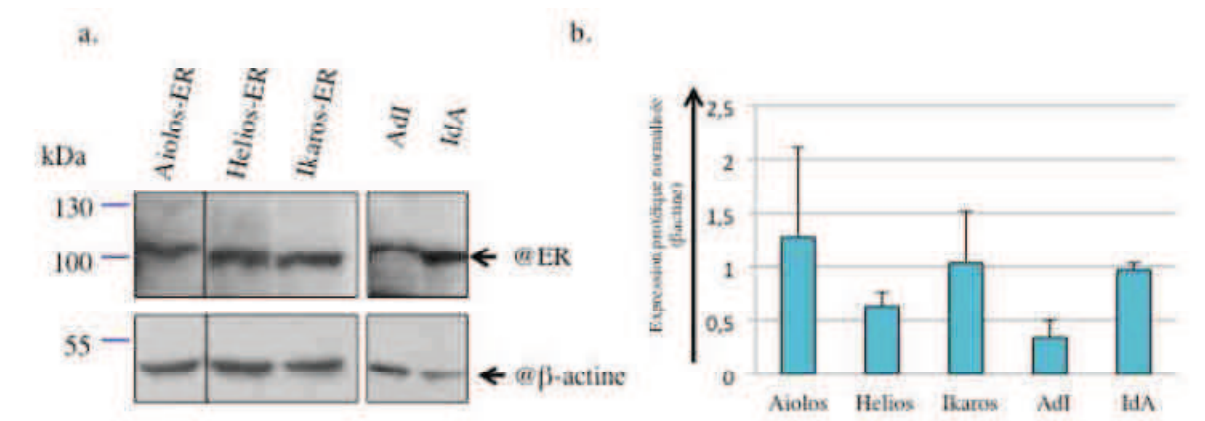


Figure R5 : Quantification protéines rétrovirales exprimées dans les différentes lignées cellulaires non induites par Western Blot totaux.

- Membrane de Western Blot pour les lignées ILC87-Aiolos-ER, Helios-ER, Ikaros-ER, AdI-ER, IdA-ER avec un dépôt de 500.000 cellules par puits. La révélation est faite en utilisant un anticorps anti-ER et un anticorps anti-βactine comme contrôle de dépôt. L'expérience a été réalisée sur deux membranes différentes, avec des migrations sur gel, des transferts et des hybridations réalisés en simultané pour les deux membranes à partir d'extraits réalisés en même temps, dans les mêmes conditions d'extractions et de cultures.
- Graphique représentant le niveau d'expression des différentes protéines détectées avec l'anti-ER, et normalisé par la quantité de β-actine détectée sur les mêmes Western Blot. La quantification a été réalisée sur trois membranes différentes à l'aide du logiciel ImageJ.

2.2. Vérification de l'induction des lignées cellulaires

Les protéines de la famille Ikaros ne sont pas fonctionnelles dans le cytosol, elles doivent être présentes dans le noyau pour agir comme facteur de transcription. Cette translocation est rendue possible par l'ajout de 4-OHT dans le milieu de culture.

J'ai procédé à la vérification de cette induction au 4-OHT par Western Blot. J'ai réalisé des extraits différentiels cytoplasmiques/nucléaires après induction pendant 24 heures au 4-OHT des différentes lignées cellulaires. Afin de contrôler la bonne séparation entre les deux compartiments (cytoplasme et noyau) j'ai détecté la protéine TBP à l'aide d'anticorps anti-TBP. Sa présence uniquement dans le noyau (bandes du milieu **Figure R6**) permet de confirmer l'efficacité de l'extraction différentielle. L'anticorps anti-βactine permet de contrôler les extraits cytoplasmiques (**Figure R6**, ligne du bas). La détection des protéines d'intérêt a été réalisée à l'aide d'un anticorps anti-ER.

Les différentes protéines de la famille présentent une localisation cytoplasmique en l'absence de 4-OHT (contrôle EtOH), ce qui correspond à leur séquestration dans le cytosol. En présence de 4-OHT une translocation a lieu pour les différentes protéines dans le noyau, ce qui est visualisé par la présence d'une bande épaisse sur le Western Blot. On voit aussi la

présence de fines bandes de plus haut poids moléculaire (bande noyau induit) qui représentent les protéines faisant l'objet de modifications post-traductionnelles. La translocation n'est cependant pas totale, car une fraction des protéines persiste dans le cytoplasme au bout de 24 heures de traitement.

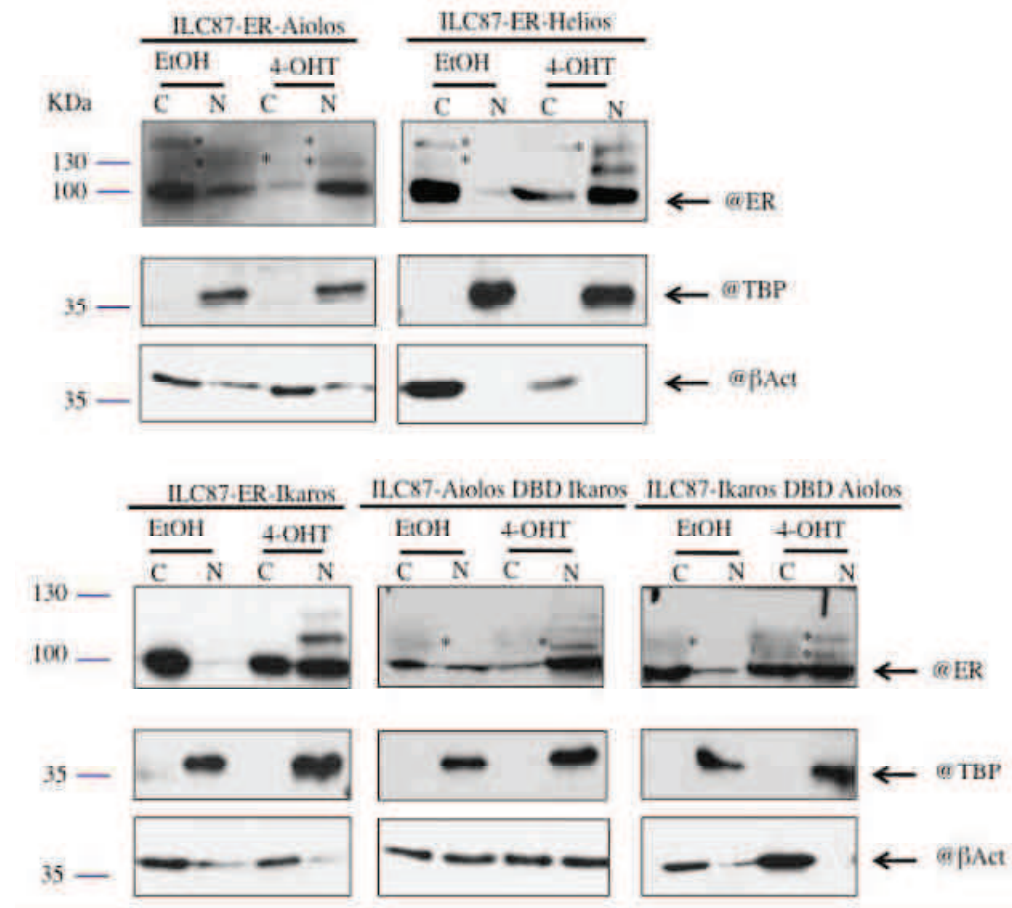


Figure R6 : Vérification de la localisation des protéines des différentes lignées cellulaires.

Analyse de la localisation protéique dans le noyau des différentes protéines de la famille après 24h de traitement au 4-OHT (contrôle au EtOH). Les protéines sont détectées dans ces extraits cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) par un anticorps anti-ER α . Les anticorps anti-TBP et anti- β actine servent de contrôles. L'expérience a été réalisée deux fois de façon indépendante. L'astérisque signifie les bandes aspécifiques.

La protéine Aiolos-ER semble être la protéine la moins bien exprimée dans les lignées cellulaires, mais sa translocation dans le noyau est équivalente à celle des autres protéines dans les différentes lignées cellulaires. La translocation des protéines d'intérêt du cytosol vers le noyau semble donc efficace, et permettra l'utilisation de ces lignées pour l'étude des différentes protéines de la famille Ikaros.

2.3. Caractérisation du profil de CD4/CD8 des lignées ILC87 non induites

Les lignées cellulaires obtenues proviennent d'une lignée cellulaire ILC87, qui est caractérisée par l'absence d'expression des marqueurs CD4, CD8 α , une expression faible de CD25 et une absence d'expression de CD44, ce qui correspond à un phénotype de type DN3-DN4 (**Figure R1.b.**)

J'ai réalisé un marquage des lignées cellulaires générées afin de voir leur profil de différenciation. Le marquage des cellules avec des anticorps anti-CD25 et anti-CD44 a permis de voir un profil similaire aux cellules ILC87, c'est à dire CD25^{low}, CD44⁻. J'ai ensuite réalisé un double marquage avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 α qui a permis de montrer que les lignées cellulaires créées présentent un profil de type DN (CD4⁻ CD8 α ⁻) (**Figure R7**). La lignée cellulaire Ikaros-ER présente un faible pourcentage de cellules CD4⁺, qui est cependant supérieur à celui observé pour les autres lignées cellulaires.

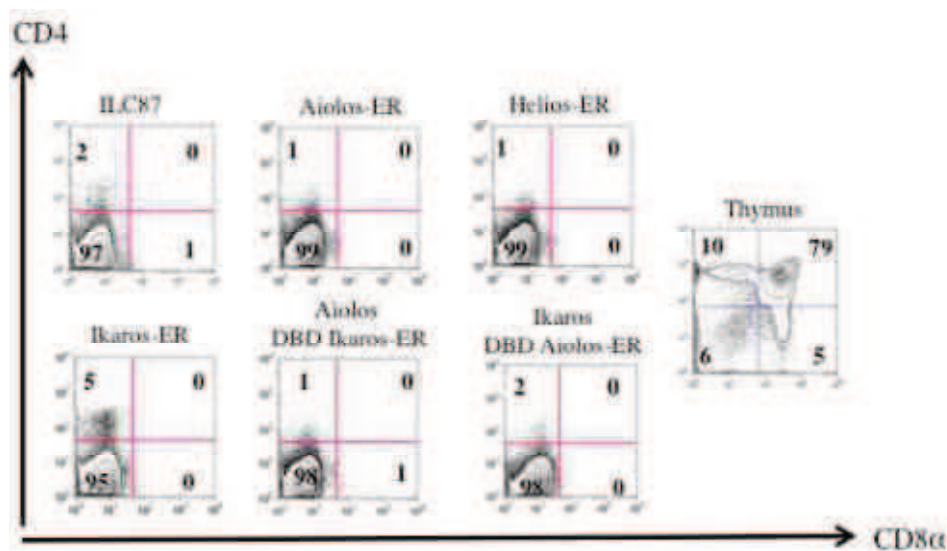


Figure R7 : Analyse de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 α par cytométrie en flux dans des lignées non induites.

Analyse de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 α par cytométrie en flux sur les cellules des lignées analysées sont : ILC87, ILC87-Aiolos-ER, ILC87-Helios-ER, ILC87-Ikaros-ER, ILC87-AdI-ER et ILC87-IdA-ER. Une analyse de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 α sur des cellules issues d'un thymus sauvage est utilisée comme contrôle de marquage.

En conclusion, j'ai pu générer différentes lignées cellulaires Ikaros déficientes dans lesquelles j'ai ré-exprimé les différentes protéines de la famille Ikaros, ainsi que deux protéines chimériques. Les différentes lignées ont été triées afin d'avoir des niveaux de GFP et donc des niveaux d'expression des différentes protéines similaires et donc permettre une analyse comparative des différents facteurs de transcription de la famille Ikaros.

Partie 2 :
Aiolos et Helios sont-ils capables de
réguler des gènes spécifiques ?

Partie 2 : Aiolos et Helios sont-ils capables de réguler des gènes spécifiques ?

Les différentes protéines de la famille présentent une très forte identité de séquences (60% de similarités nucléiques, et 52 % pour les séquences protéiques), qui est encore accentuée au niveau des doigts de zincs composant les domaines de liaison à l'ADN (DBD) et de dimérisation (entre 79 % et 99 % d'identités entre leurs séquences protéiques). Les protéines Aiolos et Ikaros sont les deux membres présentant la plus forte similarité de séquences entre les DBD, ainsi que de comportement au sein de la famille. Helios et Ikaros ont des comportements similaires dans les populations lymphocytaires T.

1. Aiolos et Helios semblent capables d'induire une régulation transcriptionnelle indépendante de celle d'Ikaros de manière limitée.

1.1. Identification d'une vingtaine de gènes spécifiquement régulés par Helios

Afin de déterminer la spécificité de Helios et d'Ikaros lors de la régulation génique, on a analysé le profil transcriptionnel des cellules issues des lignées ILC87-Helios-ER et ILC87-Ikaros-ER. Les cellules ont été traitées pendant 24 heures par du 4-OHT /EtOH puis l'expression des ARN a été analysée par puce Affymetrix. Les données ont été normalisées afin de corriger les erreurs et les biais expérimentaux en utilisant l'algorithme RMA (Robust Multi-array Average) ; on obtient ainsi des valeurs en log2 qui peuvent être ensuite analysées. Cette étape a été réalisée par la Plateforme Biopuces et séquençage de l'IGBMC qui m'a ensuite transmis les données normalisées.

Les valeurs obtenues ont été analysées afin d'identifier des gènes qui sont fortement réprimés ou fortement induits par l'un ou l'autre des facteurs de transcription analysés, ou des gènes qui semblent co-régulés. La représentation des résultats sous forme de Heat-map permet de visualiser des gènes spécifiques et des gènes communs à Helios et Ikaros (**Figure R8**).

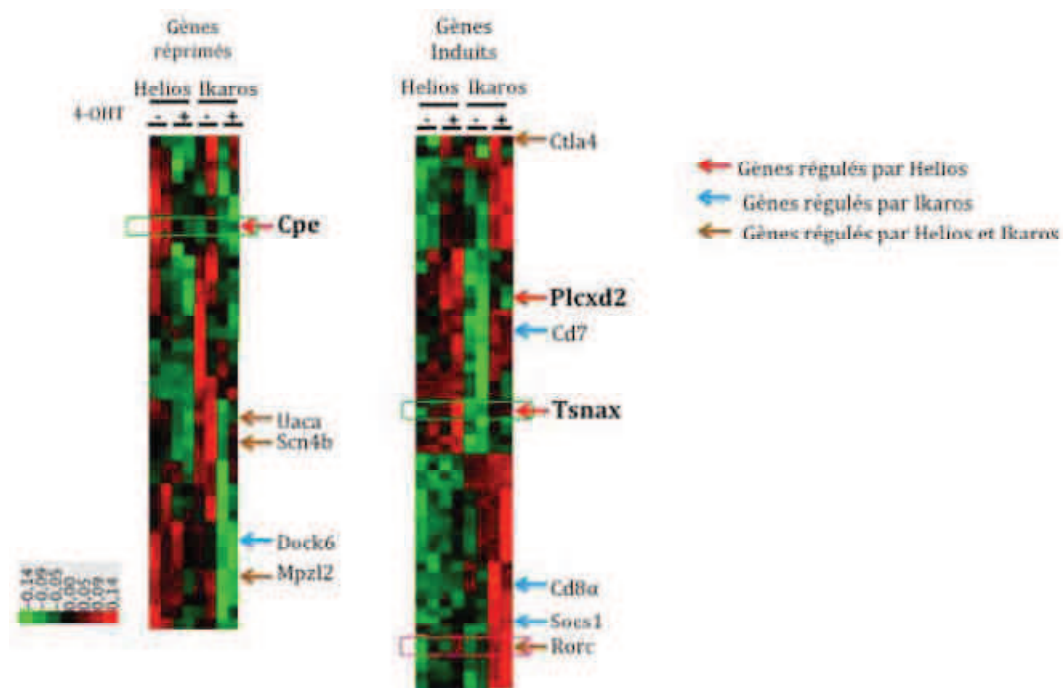


Figure R8 : Représentation graphique « Heatmap » comparant les résultats issus des analyses transcriptomiques des lignées ILC87-Helios-ER et ILC87-Ikaros-ER après 24 heures de traitement au 4-OHT. Les lignes correspondent à des Fold Change (FC) exprimés en Log2 représentant les niveaux des gènes dans les cellules contrôles et les cellules traitées au 4-OHT. Les gènes sur-exprimés sont colorés en rouge et les gènes sous-exprimés en vert .On a pu détecter 35 557 probsets. Certains gènes ont été précisés sur le graphique : *Rorc*, *Cd2*, *Plcxd2*, *Cd7*, *Tsnax*, *CpE*, *Rhox9*, *Hes1*, *Uaca*, *Scn4b*, *Mpzl2* et *Ctnd1*.

On observe 3 comportements distincts dans la régulation génique : les gènes spécifiques de Helios (induits ou réprimés uniquement par Helios), les gènes spécifiques d'Ikaros (induits ou réprimés uniquement par Ikaros) et des gènes co-régulés par Helios et Ikaros (induits ou réprimés). Parmi les gènes co-régulés on observe des gènes déjà identifiés comme étant spécifiques d'Ikaros : *Uaca*, *Mpzl2*, *Scn4b* et *Rorc*. Ces gènes sont ou co-réprimés ou co-induits. La régulation induite par Ikaros ou par Helios ne présente cependant pas la même amplitude. Helios semble réguler l'expression des gènes de façon moins importante qu'Ikaros.

De nombreux gènes sont régulés spécifiquement par Ikaros : *Cd8a*, *Socs1*, *Dock6* et *Cd7*. On peut aussi observer des gènes spécifiquement régulés par Helios, que cela soit de façon répressive comme *Cpe*, ou induite comme *Plcxd2* et *Tsnax*.

1.2. Aiolos ne semble pas pouvoir réguler spécifiquement des gènes cibles.

J'ai voulu voir si la translocation de Aiolos dans le noyau pouvait induire une expression génique similaire à celle d'Ikaros. Pour ce faire, j'ai réalisé une analyse de l'expression des ARN issus des cellules des lignées ILC87-Aiolos-ER, ILC87-Ikaros-ER, ILC87-AdI-ER et ILC87-IdA-ER traitées pendant 24 heures par du 4-OHT /EtOH par puce Affymetrix. Les données ont été normalisées afin de corriger les erreurs et les biais expérimentaux en utilisant l'algorithme RMA (Robust Multi-array Average) ; on obtient ainsi des valeurs en log2 qui peuvent être ensuite analysées. Cette étape a été réalisée par la Plateforme Biopuces et séquençage de l'IGBMC qui m'a ensuite transmis les données normalisées.

J'ai choisi de représenter les données sous forme de Scatter Plot. Les points correspondent à des Fold Change (FC) et sont exprimés en Log2 représentant la différence d'expression entre les cellules contrôles et les cellules traitées au 4-OHT. On peut visualiser 3 zones sur le diagramme qui permettent d'observer les gènes qui sont : des gènes Ikaros spécifiques (rose), Aiolos spécifiques (bleu) et la zone de gènes co-régulés par Aiolos et Ikaros (orange) qui est présente sur l'axe de corrélation absolue entre les gènes induits par Aiolos ou par Ikaros (rouge) (**Figure R9**).

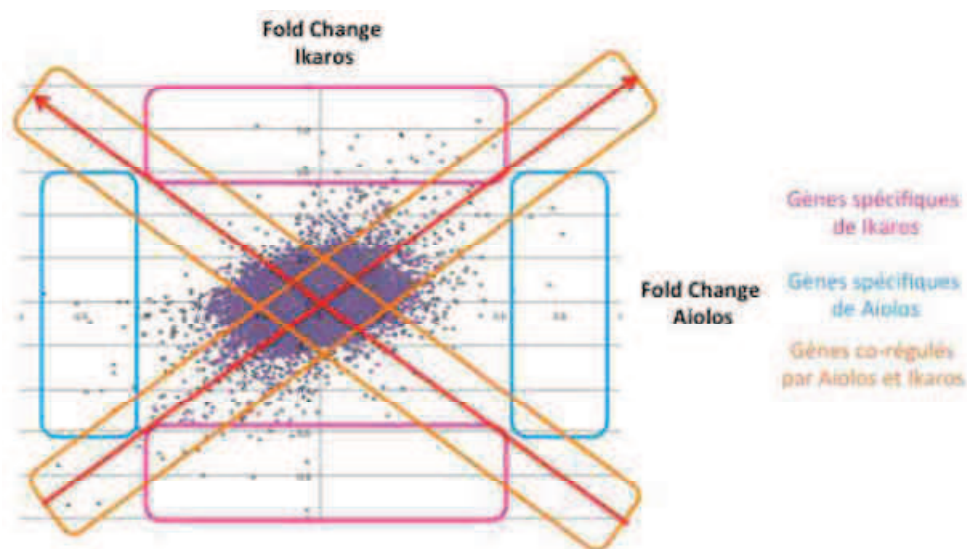


Figure R9 : Schéma de l'analyse d'une représentation graphique des données de transcriptomique sous forme de « Scatter plot ».

Les points correspondent à des Fold Change (FC) et sont exprimés en Log2, représentant la différence d'expression entre les cellules contrôles et les cellules traitées au 4-OHT. Cette représentation permet de visualiser les gènes co-régulés par Aiolos et Ikaros (orange), régulés spécifiquement par Aiolos (bleu) ou spécifiquement par Ikaros (rose).

J'ai ainsi pu confirmer dans un premier temps les résultats obtenus par les RT-qPCR pour la régulation des gènes *Mpzl2*, *Scn4b*, et *Rorc*, ce qui permet de valider les échantillons qui sont utilisés (noté en bleu) (**Figure R10**).

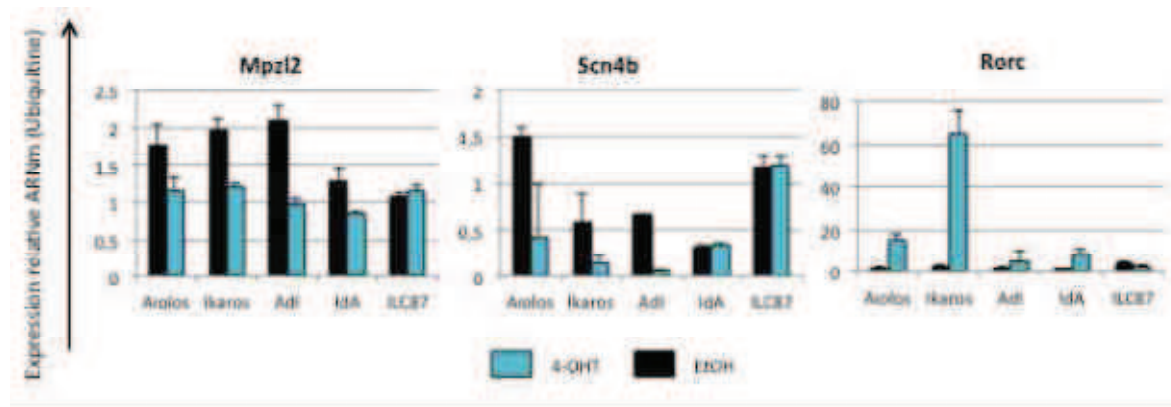


Figure R10 : Analyse de l'expression de gènes cibles de Ikaros.

Analyse de l'expression des gènes *Mpzl2*, *Scn4b* et *Rorc* par RT-qPCR dans les différentes lignées cellulaires après 24 heures de traitement au 4-OHT ou à l'éthanol. L'expression obtenue a été normalisée par rapport à l'expression de l'ubiquitine dans les différentes lignées cellulaires. Les graphiques obtenus sont le résultat d'un triplicat. L'expérience a été réalisée deux fois de façon indépendante.

On voit que certains gènes sont co-réprimés par Aiolos et Ikaros (*Scn4b*, *Mpzl2* et *Ctnd1*), alors que le gène *Rorc* est co-induit par les deux facteurs, bien que beaucoup plus fortement par Ikaros (FC 1,8 au lieu de FC 1,1). Cette étude transcriptomique m'a permis de découvrir des gènes qui semblent être régulés de façon différentielle (**Figure R11**). Parmi ces gènes certains pourraient être Aiolos spécifique (*Cdc6*, *Cflar*, *Med11* et *Cdkn1a*).

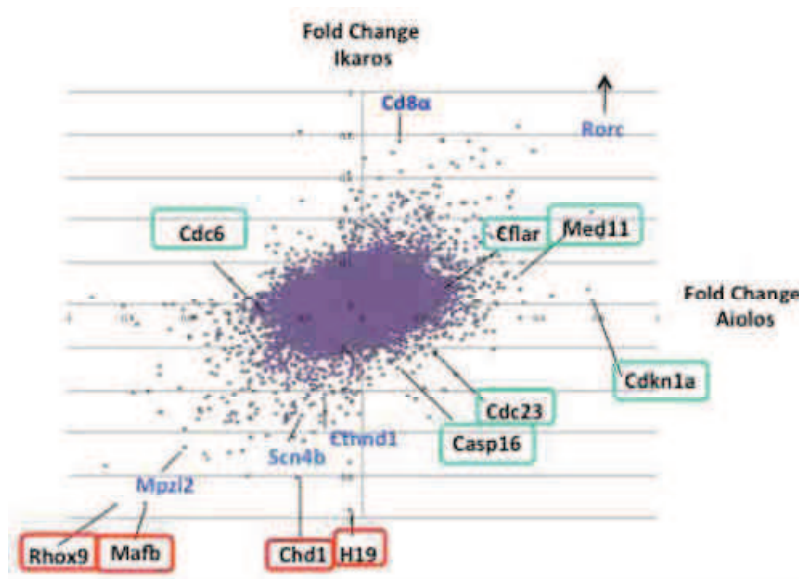


Figure R11 : Représentation graphique « Scatter plot » comparant les résultats issus des analyses transcriptomiques des lignées ILC87-Aiolos-ER et ILC87-Ikaros-ER après 24 heures de traitement au 4-OHT. Les points correspondent à des Fold Change (FC) et sont exprimés en Log2, représentant la différence d'expression entre les cellules contrôles et les cellules traitées au 4-OHT. On a pu détecter 35 557 probset. Certains gènes ont été précisés sur le graphique : *Rorc*, *Mpzl2*, *Scn4b*, *Ctnd1*, *Cd8a*, *Cdc6*, *Cflar*, *Med11*, *Cdkn1a*, *Cdc23*, *Casp16*, *H19*, *Chd1*, *Mafb* et *Rhox9*.

Parmi ceux-ci j'ai choisi de vérifier et de quantifier certains gènes réprimés (*H19*) ou induits (*Cdkn1a* et *Cdc23*) par RT-qPCR (**Figure R12**). Les gènes ont été choisis car ils présentaient des FC laissant sous-entendre une spécificité de régulation (entourés en rouge), ou bien les gènes étaient impliqués dans des voies de régulations faisant intervenir la protéine Aiolos (entourés en vert). J'ai analysé leur expression transcriptionnelle par RT-qPCR dans les différentes lignées (ILC87-Aiolos-ER, ILC87-Ikaros-ER, ILC87-AdI-ER et ILC87-IdA-ER) après 24h de traitement avec le 4-OHT, en comparaison avec leur expression dans les lignées ILC87 traitées à l'éthanol.

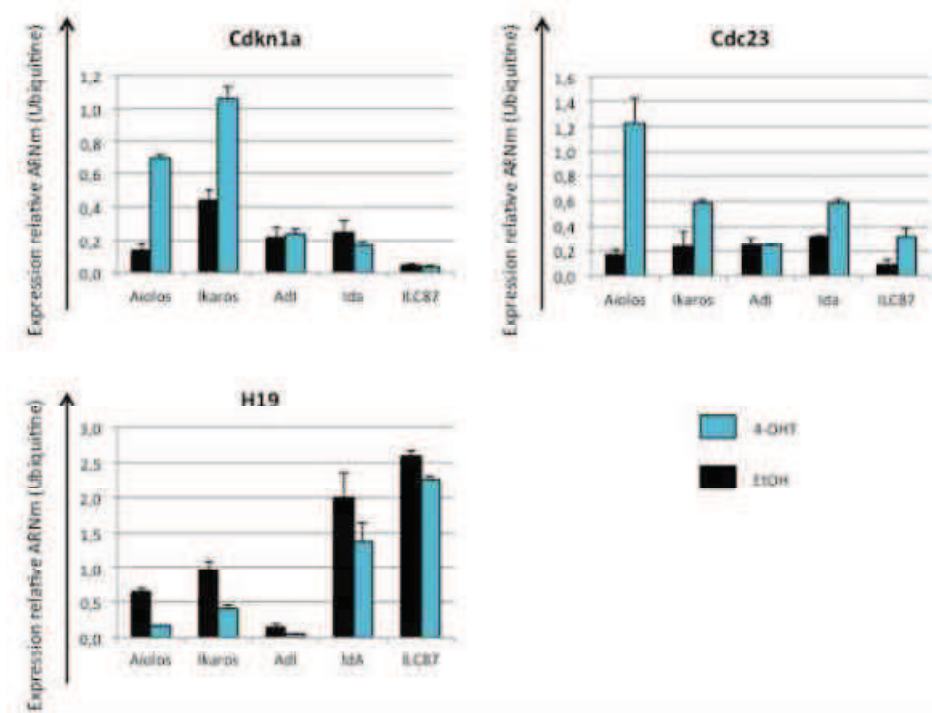


Figure R12 : Analyse de l'expression de potentiels gènes cibles de Aiolos.

Analyse de l'expression des gènes *Cdkn1a*, *Cdc23* et *H19* par RT-qPCR dans les différentes lignées cellulaires après 24 heures de traitement au 4-OHT ou à l'éthanol. L'expression obtenue a été normalisée par rapport à l'expression de l'ubiquitine dans les différentes lignées cellulaires. Les graphiques obtenus sont le résultat d'un triplicat. L'expérience a été réalisée deux fois de façon indépendante.

La translocation nucléaire de Aiolos va permettre une induction du gène *Cdc23* (1,2 au lieu de 0,18), et une forte induction des gènes *Cdkn1a* (0,7 au lieu de 0,15) et une forte répression de *H19* (0,2 au lieu de 0,7). La translocation de Ikaros permet une faible répression de l'expression de *H19* (0,4 au lieu de 0,9). On observe aussi une faible induction de l'expression de *Cdc23* (0,59 au lieu de 0,21) et *Cdkn1a* (1,02 au lieu de 0,42).

Dans le cas des lignées chimères, j'observe pour AdI une absence de la capacité d'induction de l'expression des différents gènes *Cdkn1a* et *Cdc23* et de répression de *H19*. L'autre lignée chimérique testée, IdA ne peut induire que faiblement *Cdc23* (0,59 au lieu de 0,32) et présente une absence de répression de *H19*.

L'étude des résultats de l'analyse transcriptionnelle entre Aiolos et Ikaros n'a permis d'identifier aucun gène spécifique mais des gènes régulés différemment d'une manière quantitative et cinétique par l'une ou l'autre des protéines, ainsi que des gènes dont l'expression est co-réglée à la fois par Aiolos et Ikaros. On peut ainsi voir une induction préférentielle de *Cdkn1a* et *Cdc23* par Aiolos plutôt que par Ikaros. La répression de *H19* et *Rhox9* présente un niveau différent entre Aiolos et Ikaros. Pour les lignées chimères on voit qu'AdI perd une grande partie de ses capacités inductrices, mais pas ses capacités répressives. L'absence du DBD de Ikaros dans le facteur IdA induit une absence de la capacité à induire les gènes testés et une très forte diminution des capacités de répression.

2. Identification de gènes spécifiquement régulés par Helios

Une autre forme de visualisation possible est présentée sous la forme d'un diagramme de Venn qui permet d'identifier des gènes spécifiquement exprimés par Helios et d'autres par Ikaros. Pour ce faire j'ai sélectionné les 73 gènes les plus exprimés et les 45 gènes les moins exprimés dans le cas des lignées cellulaires ILC87-Helios-ER et ILC87-Ikaros-ER traitées au 4-OHT (Figure R13). Comme précédemment lors de la sélection des gènes, j'ai tenu compte des différences entre les 2 répliquats biologiques afin d'avoir des données harmonieuses entre les deux. Cette analyse m'a permis d'identifier certains gènes qui semblent être spécifiquement régulés par Helios, d'autres par Ikaros et enfin une population de gènes qui semble être co-réglée par les deux facteurs de transcription. On peut voir que peu de gènes semblent spécifiques à Helios, que ceux-ci soient des gènes réprimés (15) ou induits (8), alors que beaucoup de gènes semblent être régulés par le facteur de transcription Ikaros (60 induits et 25 réprimés).



Figure R13 : Représentation graphique sous forme de diagramme de Venn et de graphique des gènes Induits (Up) et Réprimés (Down) dans les lignées cellulaires exprimant Helios ou Ikaros. Les 10 gènes les plus fortement induits ou réprimés ont été sélectionnés et on visualise leur FC (Traité au 4-OHT / traité à l'EtOH) par représentation sous forme de barre graphe.

J'ai pu identifier certains gènes spécifiques à Helios qui pourraient s'avérer être des gènes cibles de celui-ci. (**Figure R13**). Parmi ceux-ci j'ai choisi de vérifier et de quantifier certains gènes réprimés (*Cpe*) ou induits (*Plxcd2* ou *Tsnax*).

La translocation nucléaire de Helios va permettre une forte répression du gène *Cpe* (2,6 fois), une forte induction des gènes *Tsnax* (3 fois) et *Plxcd2* (14 fois) et une faible induction de *Cd7* (4,7 fois). La translocation de Ikaros permet une faible répression de l'expression de *Cpe* (2,3 fois), et une forte induction de l'expression de *Cd7* (1,8 fois). Elle n'a cependant aucun effet sur l'expression des gènes *Tsnax* et *Plxcd2* (**Figure R14**).

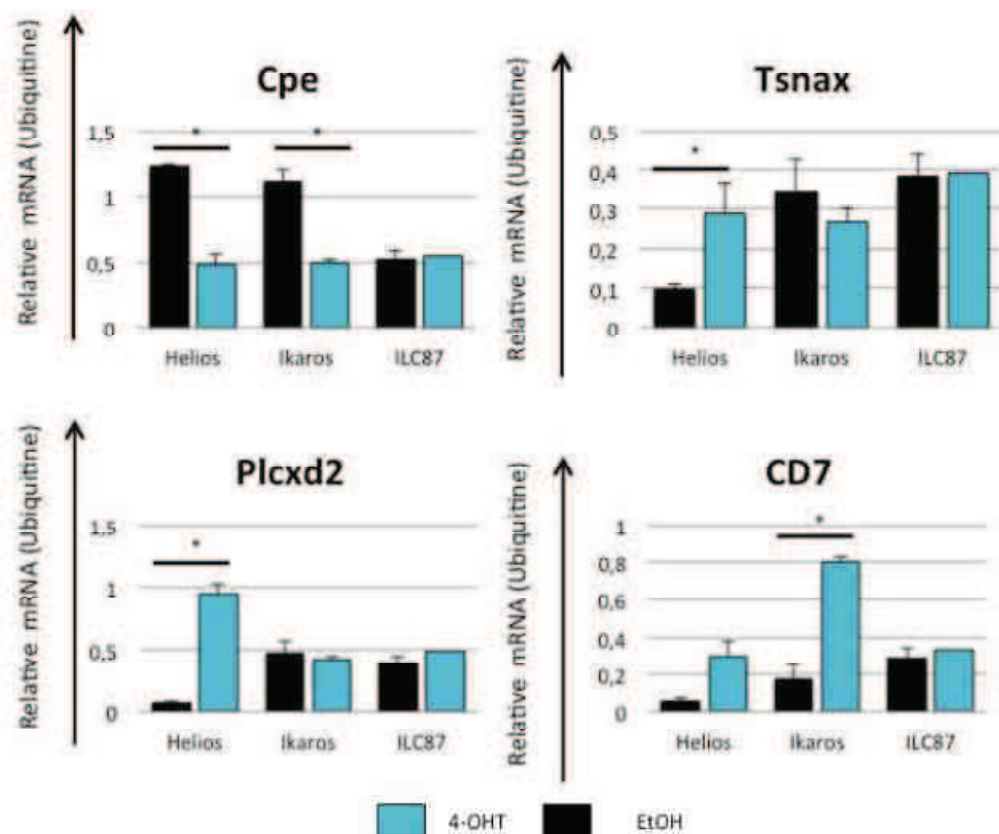


Figure R14 : Analyse de l'expression de potentiels gènes cibles de Helios.

Analyse de l'expression des gènes *Cpe*, *Tsnax*, *Plcxd2*, et *Cd7* par RT-qPCR dans les différentes lignées cellulaires après 24 heures de traitement au 4-OHT ou à l'éthanol. L'expression obtenue a été normalisée par rapport à l'expression de l'ubiquitine dans les différentes lignées cellulaires. Les graphiques obtenus sont le résultat d'un triplicat. L'expérience a été réalisée deux fois de façon indépendante.

L'étude des résultats de l'analyse transcriptionnelle entre Helios et Ikaros a permis d'identifier des gènes spécifiquement régulés par l'une ou l'autre des protéines, ainsi que des gènes dont l'expression est co-régulée à la fois par Helios et Ikaros. Elle a permis avec l'aide des expériences de RT-qPCR d'identifier de potentiels gènes cibles spécifiques de Helios, que sont les gènes *Tsnax* et *Plcxd2*.

3. La translocation d'Ikaros dans le noyau a un effet plus rapide que celle d'Aiolos

3.1. Vérification de l'induction des lignées cellulaires

L'expression des marqueurs CD4 et CD8 α est détectée au bout d'un jour de traitement au 4-OHT (par cytométrie en flux et RT-qPCR). Je me suis demandée si l'expression des gènes cibles était induite rapidement après la translocation de Ikaros ou Aiolos dans le noyau.

La première étape est de vérifier si l'induction au 4-OHT a fonctionné aux différents temps testés. Pour ce faire j'ai réalisé des extraits différentiels cytoplasmiques/nucléaires après induction pendant 12, 24 et 48 heures au 4-OHT des différentes lignées cellulaires. Afin de contrôler la bonne séparation entre les deux compartiments (cytoplasme et noyaux), j'ai détecté la protéine TBP à l'aide d'anticorps anti-TBP, et la protéine d' α -Tubuline grâce à un anticorps anti- α Tubuline. La détection des protéines d'intérêt a été réalisée à l'aide d'un anticorps anti-ER (**Figure R15**).

Les différentes protéines de la famille présentent une localisation cytoplasmique en l'absence de 4-OHT (contrôle EtOH), ce qui correspond à leur séquestration dans le cytosol. En présence de 4-OHT une translocation a lieu pour les différentes protéines dans le noyau, ce qui est visualisé par la présence d'une bande épaisse sur le Western Blot. Cette translocation est relativement faible après 12 heures d'induction, puis augmente aux temps 24 heures et 48 heures. On voit aussi la présence de fines bandes de plus haut poids moléculaire (bande noyau induit) qui représentent les protéines ayant subi des modifications post-traductionnelles (noyaux traités au 4-OHT). Les lignées chimériques présentent aussi une translocation visualisable à partir de 12 heures d'induction.

La translocation des protéines d'intérêt du cytosol vers le noyau semble donc efficace, et permettra l'utilisation des lignées pour l'étude des différentes protéines de la famille Ikaros dans cette expérience de cinétique.

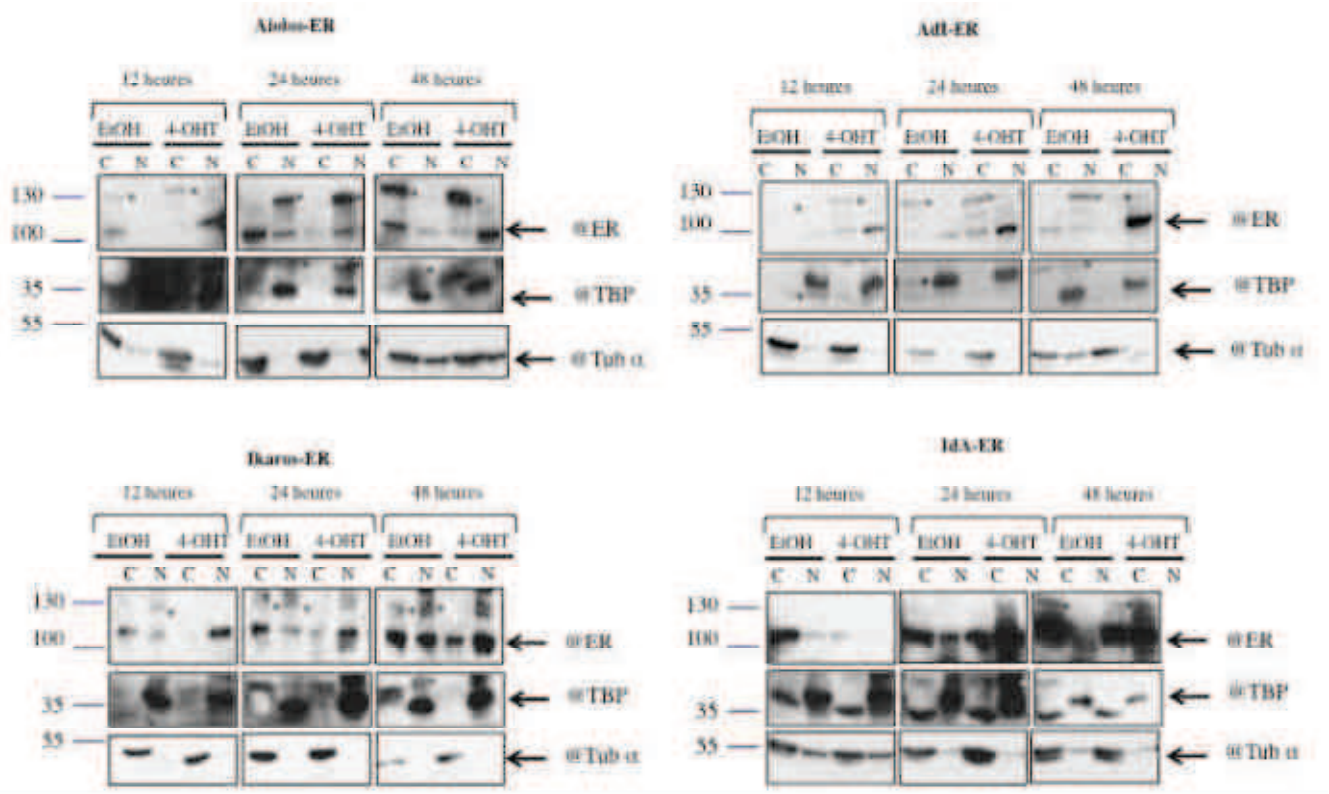


Figure R15 : Vérification de la localisation des protéines des différentes lignées cellulaires.

Analyse de la translocation protéique dans le noyau des différentes protéines de la famille, après 24h de traitement au 4-OHT (contrôle au EtOH). Les protéines sont détectées dans des extraits cytoplasmiques (C) et nucléaires (N) par un anticorps anti-ERα. Les anticorps anti-TBP et anti-Tubulineα servent de contrôles. L'expérience a été réalisée deux fois de façon indépendante. L'astérisque signifie les bandes aspécifiques.

3.2. Analyse de l'effet temporel de Aiolos sur les gènes cibles d'Ikaros

Après avoir vérifié la translocation nucléaire des différentes protéines aux temps souhaités, j'ai voulu voir l'impact de l'expression nucléaire d'Aiolos, Ikaros et les facteurs chimères sur l'expression des gènes *Cd8a*, *Cd4* et *Rorc*, impliqués dans la différenciation et la spéciation des lymphocytes T.

Pour ce faire j'ai analysé leur expression par RT-qPCR dans les différentes lignées ILC87, ILC87-Aiolos-ER, ILC87-Ikaros-ER ; ILC87-AdI-ER et ILC87-IdA-ER après 12h, 24h ou 48h de traitement avec le 4-OHT, en comparaison avec leur expression dans les lignées ILC87

traitées à l'éthanol (contrôle négatif). Les résultats obtenus ont été normalisés grâce à l'expression de l'ubiquitine et présentés sous forme de graphique (**Figure R16**).

La protéine Ikaros a été montrée comme étant capable d'induire fortement l'expression des deux gènes testés après translocation de celle-ci dans le noyau. On peut observer que l'expression de *Cd8α* est amorcée dès 12h d'induction, augmente à 24h et devient maximale à 48h. L'expression de *Rorc* augmente à 12h de traitement puis encore 12 heures plus tard. Elle diminue après 48h à un niveau plus faible que celui détecté au point 12 heures.

Le facteur Aiolos réalise une induction de *Cd8α* comparable à celle observée pour Ikaros, mais avec une expression majoritaire à 48 heures et non à 24 heures. Il est capable que d'une très faible induction du gène *Rorc* à 12h et 24h.

Dans le cas des lignées chimériques j'observe dans un premier temps, l'incapacité des deux lignées de pouvoir induire de façon significative l'expression du gène *Rorc*, même au bout de 48 heures de traitement. L'expression de *Cd8α*, est plus faiblement induite dans le cas de AdI (environ 50 % du niveau maximal obtenu avec Ikaros), et IdA permet une induction d'abord faible (12h et 24h) puis égale à celle observée pour Ikaros à 48h.

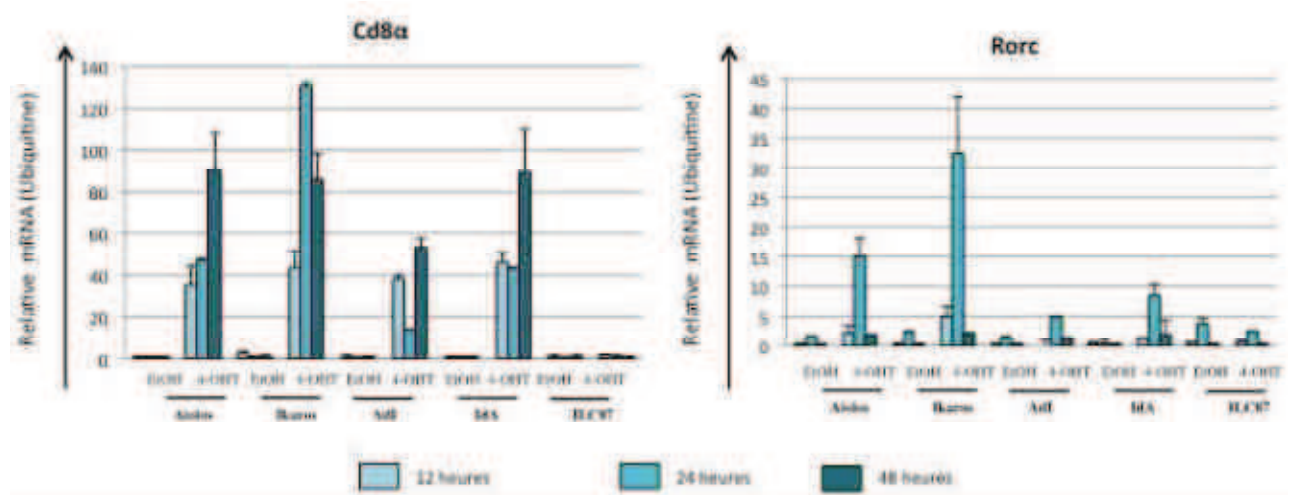


Figure R16 : Analyse de l'expression de gènes cibles de Ikaros.

Analyse de l'expression des gènes *Cd8α* et *Rorc* par RT-qPCR dans les différentes lignées cellulaires après 12, 24 ou 48 heures de traitement au 4-OHT ou à l'éthanol. L'expression obtenue a été normalisée par rapport à l'expression de l'ubiquitine dans les différentes lignées cellulaires. Les graphiques obtenus sont le résultat d'un triplicat. L'expérience a été réalisée deux fois de façon indépendante.

J'ai pu observer que l'expression des différentes protéines (Aiolos, Ikaros, AdI et IdA) dans les cellules ILC87 induit des cinétiques d'expression spécifiques. On peut voir que les deux gènes testés sont régulés de façon plutôt précoce après 12 heures de traitement, alors que d'autres sont exprimés de façon plus tardive, après 24 heures voir 48 heures de traitement. Cette différence de régulation semble être liée au facteur de transcription sur-exprimé : Aiolos ou IdA semblent liés à un phénotype plus tardif (comme pour *Cd8a*), alors que Ikaros semble permettre l'expression de gènes plus précoces (comme dans le cas de *Cd8a*).

3.3. Analyse de l'action cinétique d'Aiolos sur ses gènes cibles

Les résultats présentés dans la figure R25 suggèrent que les facteurs Aiolos et Ikaros ont un rôle spécifique et unique en tant que facteur de transcription, notamment sur le plan temporel. J'ai voulu confirmer les résultats obtenus en réalisant une nouvelle expérience de cinétique sur des gènes identifiés par l'analyse de transcriptomique : *Cdkn1a*, *Med11*, *Cdc23* et *Cflar*. J'ai analysé leur expression par RT-qPCR dans les différentes lignées ILC87, ILC87-Aiolos-ER, ILC87-Ikaros-ER ; ILC87-AdI-ER et ILC87-IdA-ER après 0h, 12h, 24h ou 48h de traitement avec le 4-OHT, en comparaison avec leur expression dans les lignées ILC87 traitées à l'éthanol (**Figure R17**).

La protéine Ikaros permet d'induire l'expression de *Cdkn1a* dès 12h d'induction. Celle-ci augmente à 24h et puis diminue à 48h. L'expression de *Med11* augmente très faiblement à partir de 12h, un peu plus à 24h puis diminue après 48h de traitement. L'induction observée pour *Cdc23* et *Cflar* est toujours relativement faible et arrive à des temps précoces. L'expression des gènes induits par Aiolos est importante, et principalement tardive pour *Med11*, *Cdc23* et *Cflar* (le maximum est atteint après 48h de traitement), bien qu'elle soit précoce pour *Cdkn1a*.

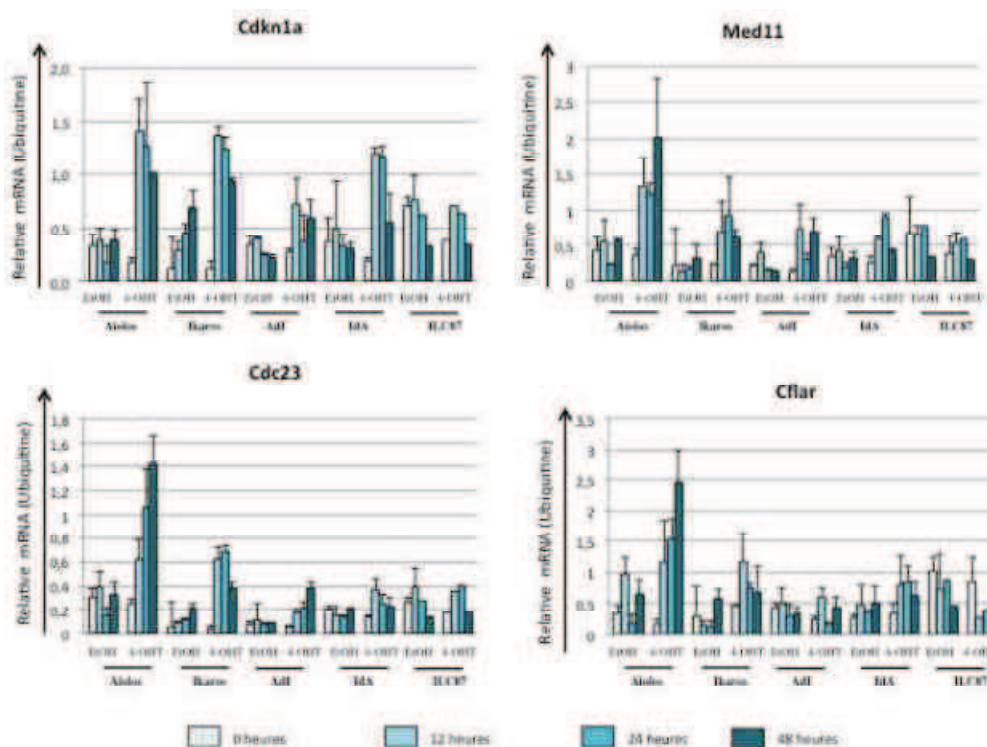


Figure R17 : Analyse de l'expression de gènes cibles de Aiolos.

Analyse de l'expression des gènes *Cdkn1a*, *Med11*, *Cdc23* et *Cflar* par RT-qPCR dans les différentes lignées cellulaires après 0,12, 24 ou 48 heures de traitement au 4-OHT ou à l'éthanol. L'expression obtenue a été normalisée par rapport à l'expression de l'ubiquitine dans les différentes lignées cellulaires. Les graphiques obtenus sont le résultat d'un triplicat. L'expérience a été réalisée deux fois.

Les protéines chimériques présentent une absence d'induction des gènes *Med11*, *Cdc23* et *Cflar*. Le facteur AdI induit une très faible expression de *Cdkn1a*, alors que celle induite par IdA est plus proche de celle observée pour Ikaros.

Cette expérience a permis de confirmer les résultats obtenus pour *Cd8a* et *Rorc*. La protéine Ikaros semble être capable d'induire l'expression de gènes « précoces », à contrario le facteur Aiolos est impliqué dans une expression tardive de ces gènes cibles. Les protéines chimères présentent un profil similaire : le facteur AdI paraît être plus impliqué dans les phases tardives de transcription (comme Aiolos), alors que IdA est plus impliqué dans la phase précoce (comme Ikaros).

4. Quelle est l'implication du DBD dans la régulation génique ?

J'ai souhaité voir quelle est l'implication du domaine de dimérisation de l'ADN (DBD) dans la régulation des gènes. Pour ce faire j'ai utilisé les deux lignées chimériques que j'ai créées et j'ai réalisé une analyse de l'expression des ARN issus des cellules des lignées ILC87-Aiolos-ER, ILC87-Ikaros-ER, ILC87-AdI-ER et ILC87-IdA-ER traitées pendant 24 heures avec du 4-OHT /EtOH par puce Affymetrix.

Comme précédemment les représentations graphiques utilisées sont des Scatter Plot, qui permettent de représenter des Fold Change (FC) qui sont exprimés en Log2, représentant la différence d'expression entre les cellules contrôles et les cellules traitées au 4-OHT.

J'ai choisi de comparer l'expression des gènes régulés par le facteur chimérique AdI contre l'expression des gènes régulés par le facteur chimérique Aiolos puis Ikaros dans la première colonne. Dans la seconde colonne c'est l'expression des gènes régulés par le facteur chimérique IdA contre l'expression des gènes régulés par le facteur chimérique Aiolos puis Ikaros. J'ai choisi de représenter trois gènes (*H19*, *Cd8a*, *Cdkn1a*), et de voir leur expression en fonction du facteur de transcription exprimé dans la lignée cellulaire (**Figure R18**).

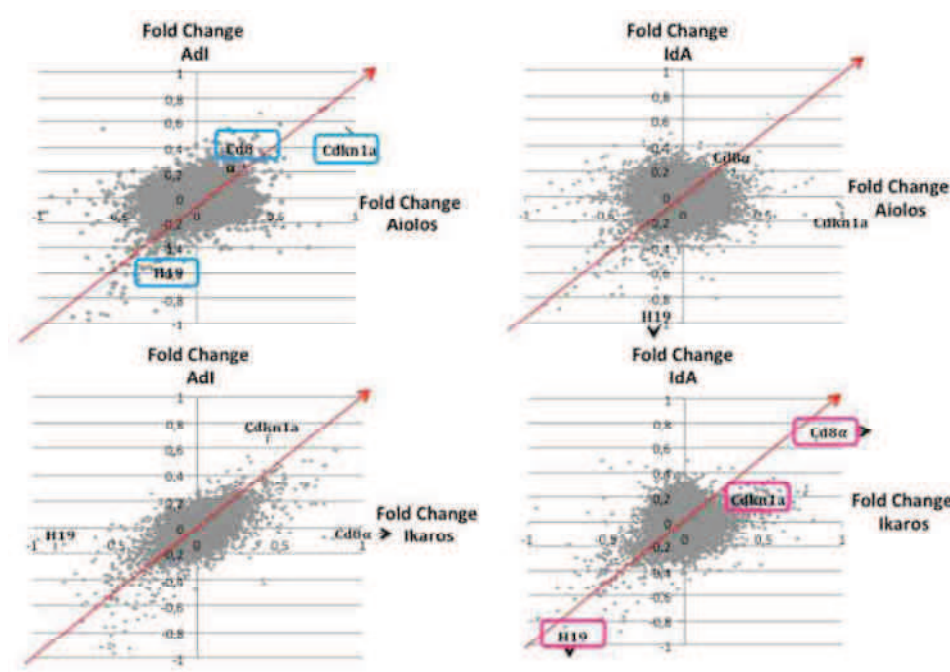


Figure R18 : Représentation graphique « Scatter plot » comparant les résultats issus des analyses transcriptomiques des lignées ILC87-Aiolos-ER, ILC87-Ikaros-ER, ILC87-AdI-ER et ILC87-IdA-ER après 24 heures de traitement au 4-OHT.

Les points correspondent à des Fold Change (FC) et sont exprimés en Log2, représentant la différence d'expression entre les cellules contrôles et les cellules traitées au 4-OHT. On a pu détecter 35 557 probsets. Certains gènes ont été précisés sur le graphique : *Rorc*, *Mpz12*, *Scn4b*, *Cd8a*, *Cflar*, *Med11*, *Cdkn1a*, *Cdc23*, *H19*, *Mafk* et *Rhox9*. Les noms en bleu représentent les gènes testés par qPCR dans l'étape précédente.

On peut voir quand on compare Aiolos avec AdI que les trois gènes testés sont co-régulés par les deux facteurs de transcription (encadré en rose) et se trouvent donc très proches de l'axe de corrélation absolue (flèche rouge). Au contraire dans le graphique comparant l'expression génique entre les lignées Aiolos et IdA, les trois gènes ne sont pas co-régulés : *H19* et *Cd8a* sont dans les zones de gènes spécifiquement régulés par IdA, alors que *Cdkn1a* est dans la zone de co-régulation. Il est intéressant de noter que lors de la comparaison de l'expression de ces trois gènes entre les lignées IdA et Aiolos, le gène *H19* est dans la zone de régulation spécifique par IdA, *Cdkn1a* est dans celle spécifique pour Aiolos, et *Cd8a* qui semble être co-régulé par les deux facteurs de transcriptions. Lorsque l'on compare la régulation engendrée par IdA et Ikaros on retrouve une co-régulation des trois gènes, qui sont très proches de l'axe de corrélation absolue (encadrés en bleu).

Ces résultats suggèrent que le domaine DBD ne serait pas impliqué dans la spécificité de régulation des gènes, puisqu'on observe une régulation similaire des gènes en son absence ou en sa présence (Adi comparé à Aiolos et IdA comparé à Ikaros). De plus la présence du DBD dans la séquence d'un autre facteur de transcription ne semble pas suffisant pour changer sa cible de régulation (AdI comparé à Ikaros, et IdA comparé à Aiolos).

Afin d'aller plus loin, j'ai réalisé la même analyse sur d'autres gènes identifiés lors de l'expérience de transcriptomique : *Rorc*, *Idi2*, *Cdc23*, *Cflar*, *Med11*, *Lsm5*, *MafB* et *Rhox9*). L'analyse est représentée sous forme de tableau, dans lequel les plages de couleurs observées représentent les gènes réprimés (en rouge), les gènes induits (vert). L'intensité de la coloration est fonction du niveau de répression ou d'induction des différents gènes (Figure R19).

	Aiolos	AdI	Ikaros	IdA
<i>Rorc</i>				
<i>Idi2</i>		/		
<i>Cd8a</i>	/			
<i>Cdkn1a</i>				
<i>Cdc23</i>		/		/
<i>Cflar</i>		/	/	/
<i>Med11</i>		/		/
<i>Lsm5</i>				
<i>MafB</i>				
<i>H19</i>		/		
<i>Rhox9</i>				/

Figure R19 : Représentation graphique de l'analyse de l'expression des différents gènes issus des lignées cellulaires exprimant les facteurs de transcription. Les résultats sont issus de l'expérience de transcriptomique, les gènes choisis sont *Rorc*, *Idi2*, *Cd8a*, *Cdkn1a*, *Cdc23*, *Cflar*, *Med11*, *Lsm5*, *MafB*, *H19* et *Rhox9*, dans le cas des lignées exprimant les facteurs Aiolos, Ikaros, Adi et IdA. Les résultats sont représentés sous forme de plages de couleurs : rouge pour les gènes réprimés, vert pour les gènes induits. L'intensité de la coloration est fonction du niveau de répression ou d'induction des différents gènes.

On peut observer comme dans la figure R18, qu'il semble y avoir une régulation similaire réalisée par Aiolos et Adi d'une part et Ikaros et IdA d'une autre part, que cela soit pour des gènes induits (*Rorc*, *CdkN1a*) ou bien pour des gènes dont l'expression est réprimée (*H19*, *Rhox9*). On constate que bien que la régulation soit similaire, celle-ci ne se fait pas avec la même intensité entre Aiolos et Adi, ainsi qu'entre Ikaros et IdA. Le facteur chimérique semble dans les deux cas capable d'une régulation mais avec une intensité moindre comparée à la régulation observée pour Aiolos ou pour Ikaros. Il y aurait donc un maintien partiel de la spécificité des gènes régulés en absence des DBD. Ce serait donc l'intégrité de la séquence des protéines Aiolos et Ikaros qui est importante. Il semble y avoir une action conjointe des DBD avec les autres domaines de leurs séquences respectives, qui permettrait une régulation spécifique et efficace des gènes cibles.

Partie 3 :

**Aiolos et Helios ont-ils un rôle dans
la différenciation cellulaire ?**

Partie 3 : Aiolos et Helios ont-ils un rôle dans la différenciation cellulaire ?

Les résultats issus de l'étude transcriptomique suggèrent une implication de Aiolos, Helios et Ikaros dans la régulation de gènes spécifiques de la différenciation des cellules T. J'ai ainsi choisi de voir cette implication par une étude phénotypique de la différenciation cellulaire.

1. Aiolos et Helios permettent une expression faible des marqueurs cellulaires CD4 et CD8 α .

J'ai voulu voir l'expression des gènes *Cd4* et *Cd8 α* par RT-qPCR au bout de 24 heures d'induction au 4-OHT (ou à l'EtOH comme contrôle négatif). La mesure dans les cellules ILC87 a permis de déterminer le niveau de base d'expression des différentes molécules.

On peut voir sur les graphiques (**Figure R20**) que la lignée cellulaire Ikaros comme pressentie, exprime fortement les gènes *Cd4* et *Cd8 α* . En l'absence de traitement au 4-OHT, il y a une faible expression de *Cd4* et l'expression de *Cd8 α* est indétectable. Le gène *Cd4* est faiblement induit (x4), alors que l'expression de *Cd8 α* augmente fortement (x 100). L'expression de la protéine Aiolos dans la lignée ILC87 permet de restaurer faiblement l'expression de *Cd4*, mais elle permet que de restaurer l'expression de *Cd8 α* de moitié. Cette expression des marqueurs est limitée comparée à celle induite par la présence d'Ikaros. Les lignées chimères qui permettront de voir l'importance du domaine de liaison à l'ADN (DBD) dans la spécificité et la fonction induisent aussi l'expression de *Cd8 α* de façon très limitée et plus faiblement encore celle de *Cd4*.

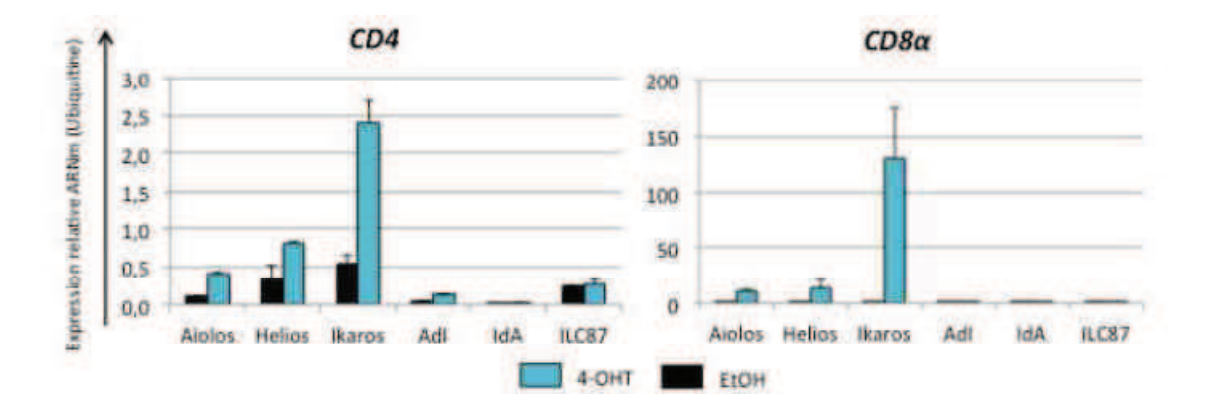


Figure R20: Quantification des marqueurs CD4 et CD8 α par qPCR.

Analyse de l'expression des gènes *Cd4* et *Cd8 α* par RT-qPCR dans les différentes lignées cellulaires après 24 heures de traitement au 4-OHT ou à l'éthanol. L'expression obtenue a été normalisée par rapport à l'expression de l'ubiquitine dans les différentes lignées cellulaires. Les graphiques obtenus sont le résultat d'un triplicat. L'expérience a été réalisée deux fois de façon indépendante.

On peut conclure que l'expression nucléaire de Ikaros permet l'expression des gènes *Cd4* et *Cd8α*, ce qui est aussi le cas pour Aiolos, Helios, AdI et IdA. La présence du DBD d'Ikaros dans la séquence d'Aiolos (AdI) ne semble pas suffisante pour induire une forte expression des deux marqueurs. A l'inverse, la lignée IdA qui présente une absence du DBD spécifique d'Ikaros montre qu'en l'absence de ce domaine, il y a de fortes difficultés pour l'expression de ces deux molécules. On peut voir sur les graphiques (**Figure R20**) que toutes les lignées expriment le marqueur CD4. L'expression de la protéine Helios dans la lignée ILC87 permet de restaurer une partie de l'expression de *Cd4* (0,75 au lieu de 0,4) et *Cd8α* par rapport à la ré-expression d'Ikaros. Cette expression des marqueurs est limitée comparée à celle induite par la présence d'Ikaros.

2. Aiolos et Helios entraînent une différenciation partielle des cellules T immatures.

La lignée ILC87 est une lignée cellulaire T déficiente pour Ikaros qui présente un blocage lors des phases immatures DN3-DN4 du développement des lymphocytes T, avec un phénotype $CD4^- CD8^- CD25^+ CD44^-$. Je me suis demandée si l'expression d'un des différents membres de la famille permet de compenser l'absence de Ikaros au cours de la différenciation.

J'ai analysé la différenciation des lignées ILC87, ILC87-Aiolos-ER, ILC87-Helios-ER, ILC87-Ikaros-ER, ILC87-AdI-ER et ILC87-IdA-ER en suivant l'expression des marqueurs CD4 et CD8 par cytométrie en flux après traitement des cellules au 4-OHT (et à l'éthanol comme contrôle). Les cellules ILC87 n'expriment ni CD4, ni CD8α au cours du traitement au 4-OHT. La translocation de Ikaros dans le noyau à partir du deuxième jour restaure l'expression des marqueurs CD4 et CD8, générant ainsi des cellules T DP (6 %) et à partir du quatrième jour des cellules DP (7 %), T SP $CD4^+$ (11 %) et SP $CD8^+$ (5 %) (**Figure R21**).

La lignée exprimant Aiolos exprime les marqueurs CD4/CD8α à partir du jour 2 (4 %) ce qui s'accroît encore à jour 4 (8 %). Elle exprime les marqueurs CD4 et CD8 de façon réduite, comme ce qui a été déterminé par RT-qPCR après 24 heures de traitement (**Figure R20**). La lignée exprimant Helios va exprimer le marqueur CD4 (3 % cellules SP $CD4^+$) et faiblement le marqueur CD8 (1 %) à partir de jour 2. Puis à jour 4, on observe l'apparition de cellules DP (2 %) et un accroissement de la population des cellules SP $CD4^+$ (7 %) et de cellules SP $CD8^+$ (2 %).

La lignée AdI exprime le marqueur CD4 (5 % cellules SP CD4⁺) et faiblement le marqueur CD8 (4 %) à partir de jour 2. Puis à jour 4, on observe l'apparition de cellules DP (2 %) et un accroissement de la population des cellules SP CD4⁺ (8%). La lignée IdA présente un comportement plus proche de celui de la lignée Ikaros-ER. Au bout de 48 heures de traitement on observe des cellules ayant un phénotype de type DP (3 %), SP CD4⁺ (3 %) et même CD8⁺ (8 %). Au bout de 4 jours de traitement, le phénotype observé s'intensifie avec 10 % de cellules SP CD4⁺, 5 % de cellules SP CD8⁺ et 8 % de cellules de type DP.

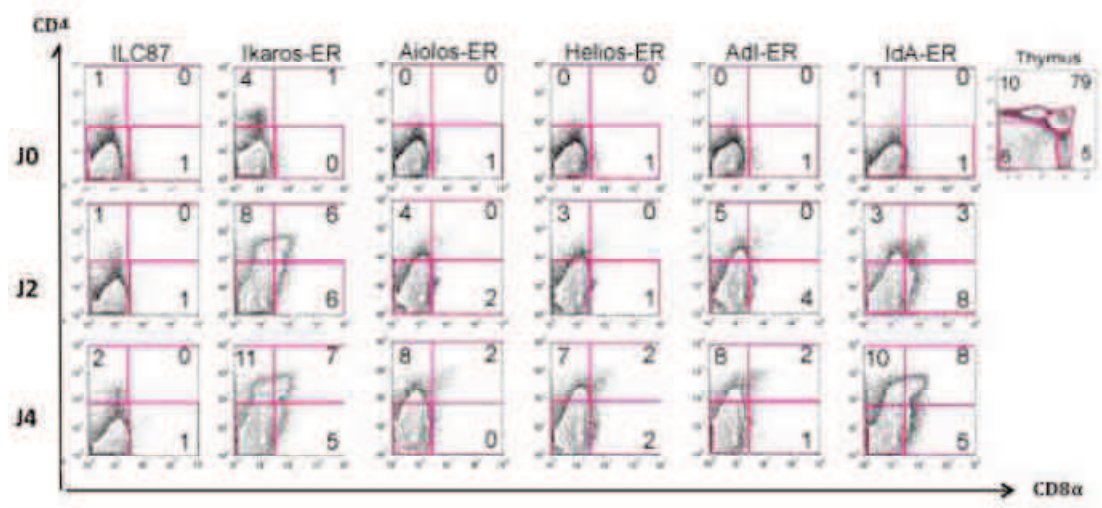


Figure R21 : Différenciation des lignées cellulaires ILC87.

Analyse de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 par cytométrie en flux. Les cellules des différentes lignées ont été marquées à l'aide des marqueurs de surface CD4, CD8 après 0, 2 et 4 jours de traitement au 4-OHT. Les lignées analysées sont : ILC87, ILC87-Aiolos-ER, ILC87-Helios*ER, ILC87-Ikaros-ER, ILC87-AdI-ER et ILC87-IdA-ER. Une analyse de l'expression sur des cellules issues d'un thymus sauvage est utilisée comme contrôle de marquage.

La translocation d'Aiolos dans le noyau induit la différenciation des cellules ILC87 en cellules T DP et en SP CD4⁺ à partir du deuxième jour, puis plus nettement au quatrième jour. Ce phénotype est cependant particulièrement réduit par rapport à celui observé lors de la translocation de Ikaros dans le noyau. L'expression de la protéine Aiolos ne semble pas capable de se substituer à la protéine Ikaros pour induire un phénotype de différenciation de la lignée cellulaire immature ILC87. La translocation de Helios dans le noyau induit la différenciation des cellules ILC87 en cellules T DP, en SP CD4⁺ et en SP CD8⁺ à partir du deuxième jour, puis plus nettement à partir du quatrième jour. Ce phénotype est cependant particulièrement réduit par rapport à celui observé lors de la translocation de Ikaros dans le noyau.

La lignée chimérique AdI présente un phénotype proche de celui de Aiolos, avec une faible expression de CD4. Malgré la présence du DBD de Ikaros, la protéine AdI n'est pas suffisante pour induire un changement phénotypique. La lignée IdA présente un phénotype similaire à celui d'Ikaros avec l'apparition des cellules DP et SP. Cependant cette apparition se fait au bout de 96 heures de traitement au 4-OHT et non pas au bout de 48 heures comme observé dans le cas de la translocation de Ikaros. L'absence du DBD de Ikaros dans la protéine semble induire une déficience pour l'apparition du phénotype attendu. Cependant, le phénotype attendu apparaît ce qui suggère que le DBD ne semble pas être à l'origine de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 α .

3. Le taux de CD4/CD8 α est fonction du niveau d'expression des protéines de la famille.

Le niveau d'expression est visualisable par mesure de la GFP par cytométrie en flux. On peut voir que cette fluorescence n'est pas homogène mais présente différents « niveaux » de GFP, visualisés par un histogramme (**Figure R22**). Cette population hétérogène est séparable en plusieurs catégories : GFP^{négative}, GFP^{low}, GFP^{medium}, GFP^{high}. Le marquage CD4/CD8 α réalisé précédemment a permis de déterminer le profil de différenciation des populations totales des différentes lignées cellulaires. Il peut aussi être utilisé afin de préciser l'expression de ces marqueurs selon le niveau de GFP des différentes sous-populations.

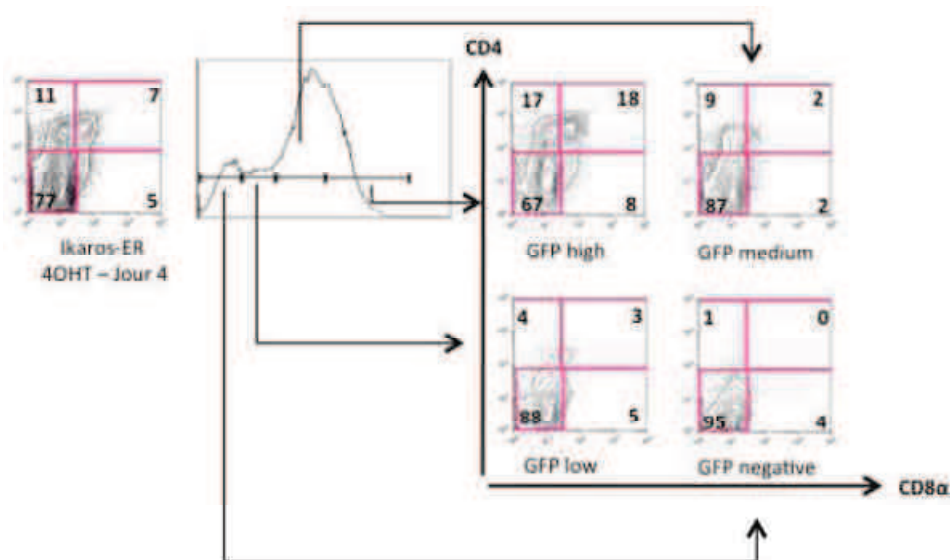


Figure R22 : Analyse de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 en fonction du niveau d'expression de la GFP.

Analyse de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 par cytométrie en flux. Les cellules des différentes lignées ont été marquées à l'aide des marqueurs de surface CD4, CD8 après 4 jours de traitement au 4-OHT.

Dans la figure R22, j'ai analysé l'expression des marqueurs CD4 et CD8 α par cytométrie en flux dans le cas de la lignée Ikaros-ER après 4 jours de traitement au 4-OHT. J'ai d'abord déterminé les niveaux d'expression de la GFP (histogramme) puis j'ai déterminé les 4 zones d'expression de la GFP pour définir les différentes sous-populations. Le niveau d'expression de la GFP est corrélé au niveau d'expression de la protéine d'intérêt. A partir de là, j'ai analysé pour chaque sous-populations le niveau d'expression des marqueurs CD4 et CD8 α . Dans cette lignée cellulaire, on voit que dans la sous-population GFP^{négative} aucune cellule n'exprime CD4 ou CD8 α . Le taux d'expression de CD4 et CD8 α dans les populations GFP^{low} et GFP^{medium} augmente, mais ne dépasse pas 9 % de cellules CD4⁺ dans les GFP^{medium}. Dans la population GFP^{high}, seules 67 % des cellules n'expriment aucun des deux marqueurs. Les cellules sont à 17 % CD4⁺, 8 % CD8 α ⁺ et à 18 % DP.

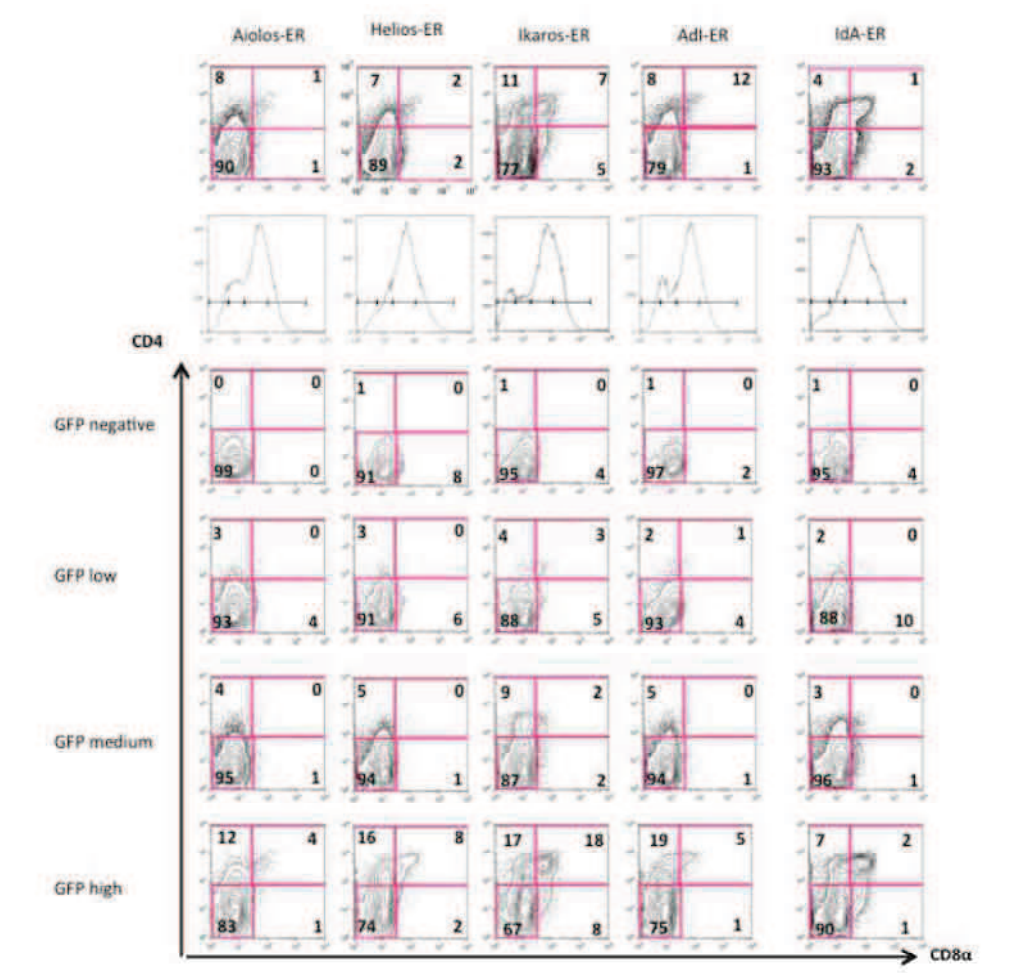


Figure R23 : Analyse de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 en fonction du niveau d'expression de la GFP.

Analyse de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 par cytométrie en flux Les cellules des différentes lignées ont été marquées à l'aide des marqueurs de surface CD4, CD8 après 4 jours de traitement au 4-OHT. Les lignées analysées sont : ILC87, ILC87-Aiolos-ER, ILC87-Ikaros-ER, ILC87-adI-ER et ILC87-IdA-ER.

J'ai réalisé la même expérience avec les autres lignées d'intérêt, exprimant Aiolos-ER, Helios-ER AdI-ER et IdA-ER. J'ai obtenu des résultats similaires (**Figure R23**). Comme dans le cas de la lignée ILC87-Ikaros-ER, les trois autres lignées présentent une absence d'expression des marqueurs CD4 et CD8 α dans le cas des cellules GFP^{négative}.

Les cellules sur-exprimant Aiolos présentent une légère augmentation de CD4 (12 %) dans le cas de la population GFP^{high}, alors que les autres sous-populations ne présentent pas de changement significatif de phénotype. On observe une légère augmentation de CD4 (3 %) et de CD8 (6 %) dans le cas de la population GFP^{low}. Dans le cas des cellules GFP^{médium}, il y a des cellules CD4⁺ (5 %) et CD8⁺ (1 %). Puis pour les cellules GFP^{high}, on observe 16 % de cellules SP CD4⁺, 2 % de cellules CD8⁺ et au final 8 % de cellules de type DP.

Dans le cas de la translocation d'AdI-ER, j'ai observé une faible proportion de cellules CD4⁺ (5 %) dans le cas des cellules GFP^{médium}, puis des cellules CD4⁺ (19 %) et DP (5 %) pour les cellules GFP^{high}. La dernière lignée testée IdA-ER, présente le phénotype suivant : légère expression de CD4 (3 %) dans les cellules GFP^{médium}, puis pour les cellules GFP^{high} on observe 7 % de cellules SP CD4⁺, 1 % de cellules CD8⁺ et 2 % de cellules de type DP. Ainsi en conclusion, je peux dire que le taux d'expression des marqueurs CD4 et CD8 α semble être fonction du niveau d'expression de la GFP. Ce principe est valable pour la protéine Ikaros et la protéine IdA dans une moindre mesure. En effet le phénotype observé pour le facteur IdA au bout de 4 jours de traitement, est apparenté à celui observé pour la protéine Ikaros, mais de façon plus réduite. En effet le phénotype est réduit dans le cas des populations GFP^{médium} et GFP^{high}.

4. Helios n'entraîne pas la spécification des cellules en cellules Treg

Le facteur de transcription Helios a été montré comme étant impliqué dans la différenciation des cellules T régulatrices. Les cellules Treg naturelles et induites sont caractérisées par l'expression des marqueurs de surface CD4 et CD25 ainsi que le facteur de transcription FoxP3 (forkhead box P3). Ce facteur de transcription est essentiel pour l'acquisition des propriétés régulatrices de ces cellules immuno-régulatrices.

J'ai ainsi voulu voir si l'expression de Helios au sein de la lignée cellulaire ILC87 est suffisante pour induire l'expression du facteur Foxp3 et in fine pour induire la différenciation des cellules en cellules de types Treg. Afin de vérifier mon hypothèse, j'ai réalisé un marquage par cytométrie en flux des marqueurs CD8, CD4, CD25 et FoxP3, sur les lignées cellulaires ILC87, ILC87-Helios-ER et ILC87-Ikaros-ER traitées pendant 0 jour, 2

jours et 4 jours au 4-OHT. J'ai ensuite mesuré qu'elle est la proportion de cellules $\text{GFP}^+\text{CD8}^-$ $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ présentes dans les cultures (**Figure R24**).

J'ai réalisé un marquage contrôle dans des cellules issues d'un thymus sauvage qui a permis de mettre en évidence une population (3 %) de cellules Treg ($\text{CD8}^-\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$). Quand j'ai analysé les cellules de la lignée ILC87, je n'ai pas détecté de cellule capable d'exprimer le marqueur FoxP3. Les lignées cellulaires ILC87-Ikaros-ER et ILC87-Helios-ER n'expriment pas le marqueur FoxP3, même au bout de 4 jours de traitement.

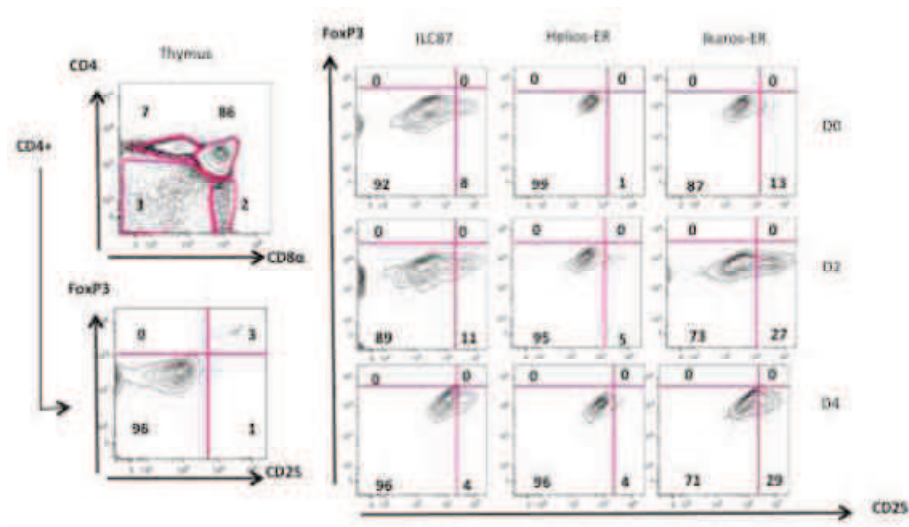


Figure R24 : Analyse de l'expression du facteur FoxP3 dans les cellules ILC87.

Analyse de l'expression intracellulaire du facteur de transcription FoxP3 après 0, 2 ou 4 jours de traitement des différentes lignées au 4-OHT. Les cellules sont marquées avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8 et anti-CD25, puis sont fixées et perméabilisées. Puis les cellules sont marquées intracellulairement avec un anticorps anti-FoxP3. Les cellules analysées par cytométrie en flux sont $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$. Un thymus sauvage a été utilisé comme contrôle.

Il semble donc que le facteur Helios ne permet pas la différenciation des cellules en cellules Tregs. Aucune des autres protéines de la famille ne semble avoir d'action sur les gènes régulant la différenciation en cellules T régulatrices, tels que FoxP3.

En conclusion de cette partie, j'ai pu démontrer que la translocation de Ikaros dans le noyau de cellules Ikaros déficientes induit une expression des marqueurs CD4 et CD8 α . Cette expression est couplée à un phénotype de différenciation des cellules, qui deviennent de type SP CD4⁺, SP CD8⁺ et DP. La différenciation observée est fonction du niveau d'expression de la GFP et donc à fortiori du niveau d'expression de Ikaros. Plus le taux d'expression d'Ikaros est important, plus la différenciation observée est intensifiée. Au contraire dans le cas d'Aiolos et Helios, on voit qu'il y a une expression des marqueurs CD4 et CD8 α , bien que modérée, mais cela n'implique pas de phénotype de différenciation cellulaire, qui reste principalement de type DN même au bout de 4 jours de traitement.

Le facteur AdI entraîne une très faible expression des marqueurs CD4 et CD8 α , soit un comportement proche de celui engendré par Aiolos. On peut cependant voir que la présence du DBD d'Ikaros semble engendrer une proportion légèrement plus forte de cellules SP CD4⁺ au sein des cellules GFP^{high}. Les cellules sur-exprimant IdA présentent en plus une expression moyenne des marqueurs CD4 et CD8 α et une différenciation semblable à celle de Ikaros à partir du jour 4 principalement. Comme pour Ikaros, son action sur les niveaux d'expression de CD4 et CD8 α est fonction du niveau de GFP, c'est à dire du niveau de la protéine IdA. La présence de Ikaros ou IdA induit une différenciation des ILC87 en cellules de type DP. Le DBD ne semble pas être impliqué dans le maintien du phénotype.

Partie 4 :

**Aiolos et Helios ont-ils un rôle dans
la prolifération cellulaire ?**

Partie 4 : Aiolos et Helios ont-ils un rôle dans la prolifération cellulaire ?

Au cours du développement des lymphocytes T dans le thymus, différentes phases de différenciation et de prolifération ont lieu (Germain, 2002). La différenciation induit une diminution de la prolifération cellulaire des cellules, en particulier au stade DN, DP et SP.

1. Aiolos et Helios entraînent une diminution de la croissance cellulaire.

La première étape a été de voir si la translocation des protéines dans le noyau pouvait induire une diminution de la croissance cellulaire. Ceci a été réalisé par un comptage quotidien des cellules GFP⁺ pendant 4 jours de traitement au 4-OHT.

On peut noter que la lignée cellulaire ILC87-NLS déficiente pour Ikaros dans laquelle, on n'a pas re-exprimé un des membres de la famille Ikaros, ne présente pas de diminution de la croissance. On voit que la différence observée dans la courbe pour le jour 3 et 4, ou bien dans l'histogramme au jour 4 n'est pas significative (**Figure R25**). La lignée cellulaire sur-exprimant Ikaros-ER présente une diminution significative de la croissance cellulaire à partir du jour 3, et qui s'intensifie au jour 4, avec 50 % de diminution. Les autres lignées cellulaires présentent une diminution importante de la croissance cellulaire. Les quatre lignées analysées (Aiolos-ER, Helios-ER, AdI-ER et IdA-ER), présentent toutes une diminution de près de 50 % de la croissance cellulaire.

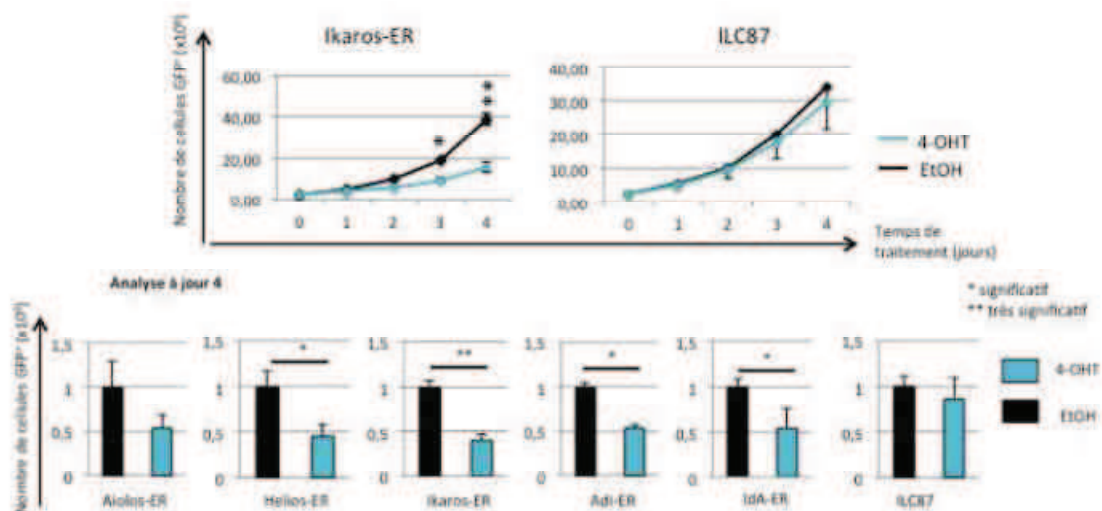


Figure R25 : Analyse de la croissance cellulaire des cellules ILC87.

Analyse de la croissance cellulaire des différentes lignées après 24, 48, 72 et 96 heures de traitement au 4-OHT. La prolifération est obtenue en suivant le nombre de cellules GFP⁺ observées par cytométrie en flux. Les graphiques obtenus sont le résultat de quatre expériences indépendantes, ce qui a permis de générer des barres d'erreur. Les graphiques obtenus sont le résultat d'un triplicat. L'expérience a été réalisée deux fois de façon indépendante. Les résultats ont été soumis à un t-Test avec P-value $\leq 0,05$. Si P-value $\leq 0,05$ on a *, si P-value $\leq 0,01$ alors on a **.

On peut donc voir que la translocation d'Aiolos, Helios et Ikaros ou bien d'un des membres chimères a les mêmes conséquences sur la croissance cellulaire. Ce comportement des cellules va de pair avec le début de différenciation observée dans la partie précédente.

2. Aiolos ne semble pas induire de mort cellulaire par apoptose.

Une des hypothèses permettant d'expliquer la diminution du nombre de cellules dans la culture cellulaire serait une mort des cellules par apoptose ou nécrose. J'ai voulu tester cette hypothèse en réalisant une analyse de la proportion de cellules mortes dans les différentes lignées cellulaires, puis une analyse de la proportion de cellules en apoptose.

J'ai mesuré la proportion de cellules vivantes dans les cultures cellulaires par rapport aux cellules mortes observables. J'ai réalisé cette analyse en traitant les différentes lignées cellulaires au 4-OHT et en mesurant la viabilité cellulaire par incorporation du TOPRO-3 dans les cellules par cytométrie en flux. Le TOPRO-3 est un marqueur des acides nucléiques se liant à l'ADN, ce qui permet de marquer le noyau et de distinguer les cellules vivantes et mortes. Ce marqueur ne peut entrer que dans les cellules mortes, dont la perméabilité a été altérée.

On peut voir au jour 0 de traitement que la proportion de cellules vivantes est supérieure à 80 %, puis elle diminue au sein de toutes les lignées traitées (**Figure R26.a**). Dans le cas des cellules ILC87 non transduites, on note que la proportion de cellules vivantes diminue légèrement après traitement au 4-OHT, et de façon plus importante après traitement à l'EtOH. Cette diminution est inversée dans le cas des autres lignées cellulaires, où la proportion de cellules vivantes semble diminuer légèrement plus dans le cas du traitement au 4-OHT que dans le cas du traitement à l'EtOH. Cette réduction est déjà présente au bout de deux jours de traitement, mais s'intensifie fortement à jour 4 (**Figure R26.b**)

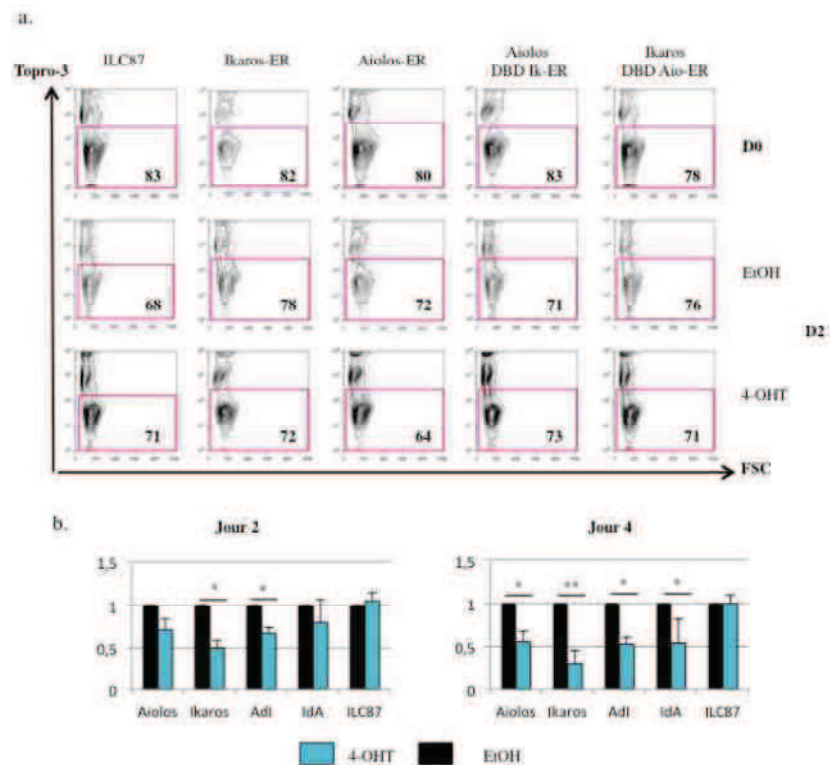


Figure R26 : Analyse du nombre de cellules vivantes au cours du temps après traitement au 4-OHT.

L'analyse de la proportion de cellules vivantes a été réalisée après 24 heures de traitement au 4-OHT. La viabilité cellulaire a été obtenue par marquage au TOPRO-3 (intercalant à l'ADN) et mesure par cytométrie en flux. **(a)** La visualisation de la viabilité est réalisée sous forme de dot plot montrant l'incorporation du TOPRO-3 présent dans les cellules en fonction de la taille de celles-ci (FSC). **(b)** Les graphiques obtenus représentent la proportion de cellules vivantes dans chaque cas de figure, les données ont été normalisées par rapport au niveau observé dans les cellules traitées au 4-OHT ou au EtOH à jour 2 et 4. Les graphiques sont le résultat de quatre expériences indépendantes, ce qui a permis de générer des barres d'erreur. L'expérience a été réalisée deux fois de façon indépendante. Les résultats ont été soumis à un t-Test avec $P\text{-value} \leq 0,05$. Si $P\text{-value} \leq 0,05$ on a *, si $P\text{-value} \leq 0,01$ alors on a **.

L'étape suivante a été de déterminer l'origine des cellules mortes observées après le traitement des cellules au 4-OHT ou au EtOH. Une des possibilités de ce phénotype est la mort cellulaire programmée des cellules des différentes lignées. Ce processus appelé apoptose, est une mort cellulaire programmée des cellules de l'organisme en réponse à un signal interne. L'apoptose s'accompagne de différentes modifications morphologiques des cellules parmi lesquelles la formation de corps apoptotiques ou l'exposition des phosphatidylsérines (PS) de la membrane vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Elle peut être visualisée par un marquage à l'Annexine V qui se fixe aux molécules de PS externalisées et permet de différencier la phase d'apoptose tardive et les cellules nécrotiques. J'ai réalisé un co-marquage au DAPI afin de visualiser les cellules en apoptose précoce, et les cellules vivantes.

Grace à ce double marquage, on peut distinguer 4 types de cellules : cellules vivantes (DAPI⁻/AnnexinV⁻), cellules nécrotiques (DAPI⁺/AnnexinV⁻), cellules apoptotiques précoces (DAPI⁻/AnnexinV⁺), cellules apoptotiques tardives (DAPI⁺/AnnexinV⁺). Le marquage a été réalisé pour les différentes lignées cellulaires au bout de 24 heures de traitement au 4-OHT, et sur des cellules de rate issues d'une souris sauvage comme contrôle de marquage (**Figure R27**).

On peut voir que les cellules présentes dans la rate sont en majorité vivantes (85 %) ou en apoptose précoce (11 %) et que très peu de cellules nécrotiques sont présentes (1 %). La lignée ILC87 vide présente une plus forte proportion de cellules en apoptose tardive dans le cas du traitement à l'EtOH (34 %) que dans le cas du traitement au 4-OHT (29 %). Les cellules exprimant Ikaros-ER, Aiolos-ER, AdI-ER et IdA-ER présentent le même phénotype lors du traitement à l'EtOH et au 4-OHT.

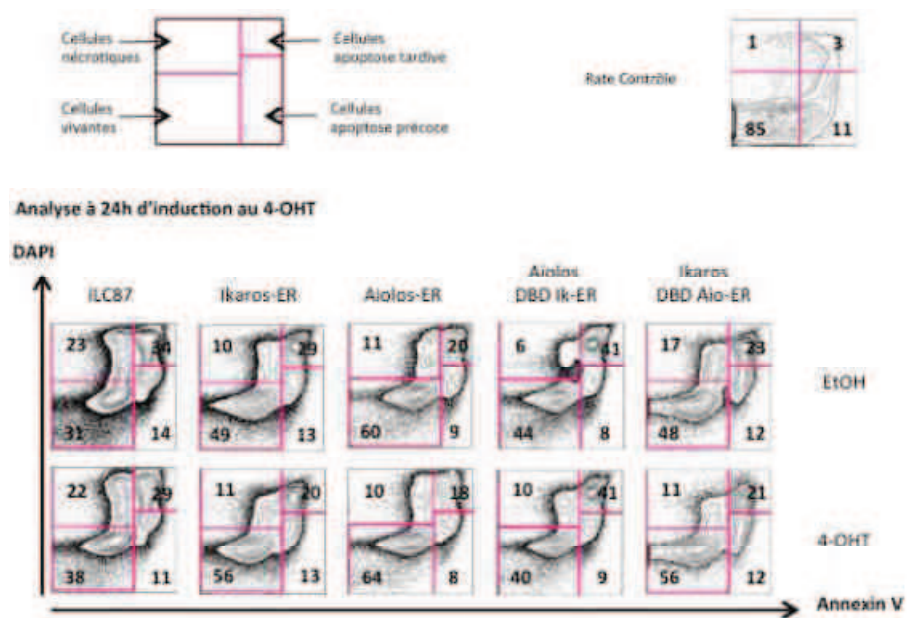


Figure R27: Analyse de l'apoptose des cellules au bout de 24 heures de traitement au 4-OHT.

Analyse de l'apoptose des cellules a été réalisée après 24 heures de traitement au 4-OHT. Elle est obtenue par un double marquage à l'AnnexineV et au DAPI (intercalant à l'ADN) et mesure par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés sous forme de dot blot. Le marquage de la rate sauvage sert de contrôle de marquage. Le schéma permet de comprendre les différentes populations cellulaires observées.

En conclusion, on voit que la translocation nucléaire des protéines Ikaros-ER, Aiolos-ER, AdI-ER et IdA-ER permet une diminution de la croissance cellulaire. Cette diminution est relativement similaire entre les différentes lignées cellulaires et mais ne semble pas réellement être la résultante d'une augmentation de la proportion de cellules mortes au cours du temps au cours du traitement au 4-OHT. Un marquage de l'apoptose (Annexine V/DAPI) a permis d'exclure cette possibilité comme cause de la diminution des cellules vivantes.

Une seconde hypothèse pouvant expliquer cette diminution de la croissance cellulaire serait un blocage du cycle cellulaire. Ce phénomène peut être analysé par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage du cycle cellulaire (Iodure de Propidium, Ki67, VybrantDye). Due à l'expression de la GFP par les différentes lignées cellulaires, cette analyse n'a pu être réalisée. A ce jour, il m'a été impossible de contourner cet obstacle, ce qui rend l'analyse du cycle cellulaire difficile par FACS.

Discussion
Et
Perspectives

Partie 1 :

**Implication des facteurs de la
famille Ikaros dans la
différenciation et la spéciation des
lymphocytes T**

Partie 1 : Implication des facteurs de la famille Ikaros dans la différenciation et la spéciation des lymphocytes T

Les facteurs de transcription de la famille Ikaros ont été montrés comme étant impliqués dans la différenciation et la polarisation des lymphocytes T dans des modèles de cellules *in vivo* et *in vitro*. L'étude réalisée lors de ma thèse a permis une comparaison des effets des différents membres de la famille Ikaros dans un contexte identique, grâce à l'utilisation de lignées cellulaires.

1. Aiolos et Helios semblent être capables de remplacer Ikaros de façon limitée lors de la différenciation des lymphocytes T

La lignée cellulaire utilisée, nommée ILC87 présente un phénotype de cellules T immatures de stade DN3 (CD44⁺CD25⁺) et DN4 (CD44⁺CD25⁻). Les cellules immatures doivent se différencier par l'expression de certains marqueurs cellulaires spécifiques afin de devenir des cellules T matures et fonctionnelles. Parmi ces marqueurs, les molécules co-réceptrices CD4 et CD8 α sont liées à la maturation des cellules T ainsi qu'à leurs fonctions effectrices en tant que cellules T matures (Koretzky, 2010). Leurs expressions permettent également de suivre les étapes de cette différenciation : thymocytes CD4⁺CD8⁺CD3^{low} (double positive ou DP), puis les stades CD4⁺CD8⁻CD3⁺ ou CD4⁻CD8⁺CD3⁺ (simple positive ou SP).

J'ai analysé l'expression de ces marqueurs après avoir ré-exprimé les facteurs Aiolos, Helios et Ikaros dans cette lignée cellulaire immature. J'ai pu observer une induction de l'expression des marqueurs CD4 et CD8 α à partir de 24h d'expression que cela soit par RT-qPCR ou bien par cytométrie en flux. Cette expression augmente à 48h et 96h de traitement. La translocation nucléaire de Ikaros permet d'observer l'apparition de cellules ayant un phénotype de type DP, ainsi que de cellules de types SP CD4⁺ et SP CD8⁺. Le résultat de la translocation de Aiolos est nettement plus limité puisque seule une faible proportion de cellules peut exprimer le marqueur CD4 et une proportion encore plus faible peut co-exprimer les deux molécules. Le facteur Helios présente un comportement similaire à Aiolos, avec cependant une plus forte propension à exprimer CD4 que CD8 α . L'activation de l'expression de ces deux marqueurs est fonction du taux d'expression des protéines d'intérêt. Ainsi l'apparition des cellules types DP ou SP est maximisée dans le cas des cellules exprimant les plus forts taux de Aiolos, Helios ou Ikaros.

La raison de l'apparition de ces marqueurs peut être due à deux hypothèses :

- La première hypothèse est que le phénotype de type T mature peut être réellement dû à une différenciation cellulaire. Elle peut être soutenue par le fait que la fixation d'Ikaros sur la séquence silencer de Cd4 contribue à sa répression. Au stade DP c'est le contraire, le facteur Mi-2 β se fixe aussi sur cette séquence, permettant d'induire l'expression de ce marqueur (Naito *et al.*, 2007). Le facteur Ikaros est aussi impliqué dans la régulation positive du gène CD8b, car il est associé aux séquences activatrices de *Cd8* (e8I et e8v). Le facteur Aiolos est aussi lié à la régulation de *Cd8*, en effet des souris Ikaros^{+/-}Aiolos^{-/-} semblent présenter une altération de l'activation du complexe CD8 $\alpha\beta$ résultant dans le développement des thymocytes DN CD8⁺ (Harker *et al.*, 2002).
- La seconde hypothèse à l'origine de cette dérégulation de l'expression de CD4 et CD8 α serait la sur-expression des différents facteurs. La résultante de l'induction au 4-OHT serait une expression forcée de CD4 et CD8 α sans lien physiologique avec une différenciation cellulaire. Cette expression serait de nouveau liée aux fonctions régulatrices de Ikaros, Aiolos et Helios présentées dans l'introduction, notamment celles de Aiolos et Ikaros. Cette hypothèse est soutenue par l'absence de modification de l'expression des gènes *ptcra*, *il2ra*, *tcrb* et *cd3*, liés aux phases de différenciation.

Cette théorie peut être testée en vérifiant d'autres marqueurs associés aux phases des différenciations des lymphocytes T : la dérégulation du pTCR α au niveau du stade DN4, la dérégulation du marqueur CD25 à partir du stade DN4, ainsi que l'apparition du TCR $\alpha\beta$ mature à partir du stade DP.

2. Helios semble incapable de permettre l'apparition de cellules de type Treg

Le facteur de différenciation FoxP3 est considéré comme le « master regulator » responsable de l'apparition et du maintien des cellules Treg (Zhang et Zhao, 2007). Ce facteur se fixe sur les séquences promotrices de gènes impliqués dans les fonctions de régulation des cellules T (Marson *et al.*, 2007). Il a été décrit que Helios se fixe sur les séquences régulatrices du gène FoxP3 et que son absence induit une répression de l'expression de FoxP3 (Getnet *et al.*, 2010). De façon indirecte Helios permettrait donc de réguler l'apparition et les fonctions des cellules Tregs. Le facteur Helios se lie au promoteur du gène de l'IL-2, et réprime son expression en désacétylant les histones à ce niveau, contribuant à la nature anergique des cellules T (Baine *et al.*, 2013 ; Zabransky *et al.*, 2012). Il a été caractérisé comme étant un marqueur des cellules nTreg (Sugimoto *et al.*, 2006, Thornton *et al.*, 2010).

J'ai analysé l'expression de FoxP3 dans les cellules des lignées ILC87, ILC87-Helios-ER et ILC87-Ikaros-ER, ainsi que celle du marqueur CD25 afin de détecter des cellules de type Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). Au bout de 4 jours de traitement, aucune cellule ne présente l'expression des marqueurs FoxP3 ou CD25, ce qui montre l'absence de cellule de type Treg dans les cultures, même après translocation de Helios dans le noyau.

La translocation de Helios semble donc insuffisante pour induire l'apparition du marqueur FoxP3. Cette donnée semble soutenir que la sur-expression de Helios est à l'origine de l'expression de CD4 et CD8 α , en dehors d'une différenciation réelle. Une analyse de l'expression du facteur FoxP3 par RT-qPCR, ainsi que d'autres marqueurs des cellules Tregs (comme Il-10), permettrait de confirmer cette absence d'expression et donc l'impossibilité de Helios à générer des cellules FoxP3⁺.

3. Aiolos pourrait être à l'origine de l'apparition de cellules de type Th17

Aiolos a été montré comme étant largement impliqué dans le contrôle de la différenciation et de la maturation des lymphocytes B, mais peu d'études ont pu montrer son rôle dans les lymphocytes T. Parmi les études réalisées, celle de l'équipe de V.K. Kuchroo a pu montrer son implication dans la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ de sous-type Th17 (Quintana *et al.*, 2012). Une étude sortie l'année d'après a permis de montrer que Ikaros semble aussi permettre l'apparition de cellules Th17, grâce à sa capacité à moduler la chromatine et ses marques épigénétiques. Ikaros permettrait ainsi de réprimer l'expression de gène au potentiel limitant pour le développement des cellules Th17, comme FoxP3, et Tbx21 (Wong *et al.*, 2013).

Une implication possible de Aiolos dans l'apparition de cellules de type Th17 à partir de ma lignée cellulaire a pu être montrée. En effet dans des cellules sur-exprimant le facteur Aiolos et Ikaros, j'ai pu détecter une très forte induction du facteur de transcription Ror γ T, que cela soit par micro-array ou bien par RT-qPCR. Une expérience de cinétique a permis de montrer que son expression était relativement précoce (24h de traitement), ce qui suggérerait un rôle initiateur pour Aiolos et Ikaros dans l'expression de Ror γ T.

Ce facteur de transcription a été montré comme étant un facteur initiateur de la polarisation des cellules Th0 en cellules de type Th17 (Ivanov *et al.*, 2006). Le développement des cellules Th17 est rendu possible par un environnement cytokinique polarisant (TGF- β , IL-1 β , IL-6 et IL-23), ainsi que par d'autres facteurs de transcription comme STAT-3 responsables de l'expression de Ror γ T et de IL-23R (Harris *et al.*, 2007) ou c-Maf qui active directement Ror γ T en se fixant à sa séquence promotrice (Tanaka *et al.*, 2014).

Je serais intéressée de voir si la translocation nucléaire de Aiolos ou Ikaros permettrait de générer des cellules de phénotype Th17 au vu de la forte expression du marqueur Ror γ T. Ceci pourrait être vérifié par la détermination des marqueurs phénotypiques des cellules Th17, comme Ror γ T ou STAT3, CCR4, CCR6 ou IL-23R par cytométrie en flux ou RT-qPCR. Cependant la lignée cellulaire ILC87 est une ligne tumorale immature, il est donc peu vraisemblable que les cellules obtenues après traitement soient phénotypiquement et physiologiquement des cellules SP CD4⁺. Ainsi malgré l'expression de marqueurs spécifiques de ces cellules, ces cellules ne seront pas fonctionnelles.

Néanmoins, ce changement de phénotype permettrait de déterminer si la sur-expression d'Aiolos serait suffisante pour induire une différenciation cellulaire par elle-même. En effet la lignée cellulaire ILC87 est déficiente pour Ikaros, Aiolos ne peut donc pas se dimériser avec Ikaros pour agir. Un rôle dans la différenciation des cellules en Th17 serait donc intégralement dû au facteur Aiolos, et permettrait de voir sa spécificité d'action comparée à Ikaros.

4. Les facteurs de la famille Ikaros ont-ils la possibilité de générer d'autres sous-types cellulaires ?

Ikaros est impliqué dans le développement des autres sous-types de cellules T CD4⁺, parmi lesquelles les cellules Th2 et Tfh. En effet des études récentes réalisées *in vivo* et *in vitro* ont permis de montrer que Ikaros peut se fixer sur les séquences régulatrices des gènes *Ifng*, *Il4* et *Il10*, régulant ainsi l'expression de ces cytokines, et entraînant la différenciation des cellules vers un phénotype Th2 (Umetsu *et al.*, 2009). Il est donc essentiel à la balance Th1/Th2 observée. Son absence dans les souris *Ik*^{-/-} engendre une diminution des facteurs GATA3 et c-Maf (spécifiques des Th2) et une augmentation de T-bet et STAT4, responsables de la polarisation sous forme de cellules Th1 (Quirion *et al.*, 2009). Une autre étude a permis de montrer la fixation de Ikaros sur les séquences promotrices du gène *tbx21* (codant pour T-bet), ainsi qu'une répression épigénétique de l'expression de IFN γ durant la mise en place du phénotype Th2 (Thomas *et al.*, 2010). Helios s'avère être aussi impliqué dans l'apparition des cellules Th2 et Tfh par une régulation de GATA3 et de l'IL-4 (Serre *et al.*, 2011).

Comme dans le cas du phénotype Th17, je souhaiterais voir si les cellules apparaissant comme SP CD4⁺ à la fin de mes cultures présenteraient un phénotype de type Th1, Th2 ou Tfh dans les cultures de cellules ILC87 sur-exprimant les facteurs Aiolos, Helios et Ikaros (**Figure D1**). Une première analyse pourrait être réalisée par cytométrie en flux ou RT-qPCR afin de détecter puis de quantifier des marqueurs de surface spécifiques des différents types cellulaires, ou bien des facteurs intracellulaires essentiels (T-bet, pour Th1 ; GATA3, pour Th2 ; Bcl-6 pour Tfh).

Cet intérêt est dû à la très forte expression de Ror γ T dans ces cellules, et permettrait dans un cas de visualiser une possible différenciation, et dans un autre cas confirmer que la sur-

expression des gènes liés à la différenciation est uniquement due à la sur-expression des différentes protéines.

Au vu du côté immature de ces cellules, je suppose que l'apparition du marqueur CD4 engendre un intermédiaire de différenciation avant les cellules de phénotype DP, comparable aux ISP CD8+ détectées *in vivo*. Les cellules supposées comme SP CD4+ ne seraient donc pas matures et n'auraient donc pas de rôle physiologique.

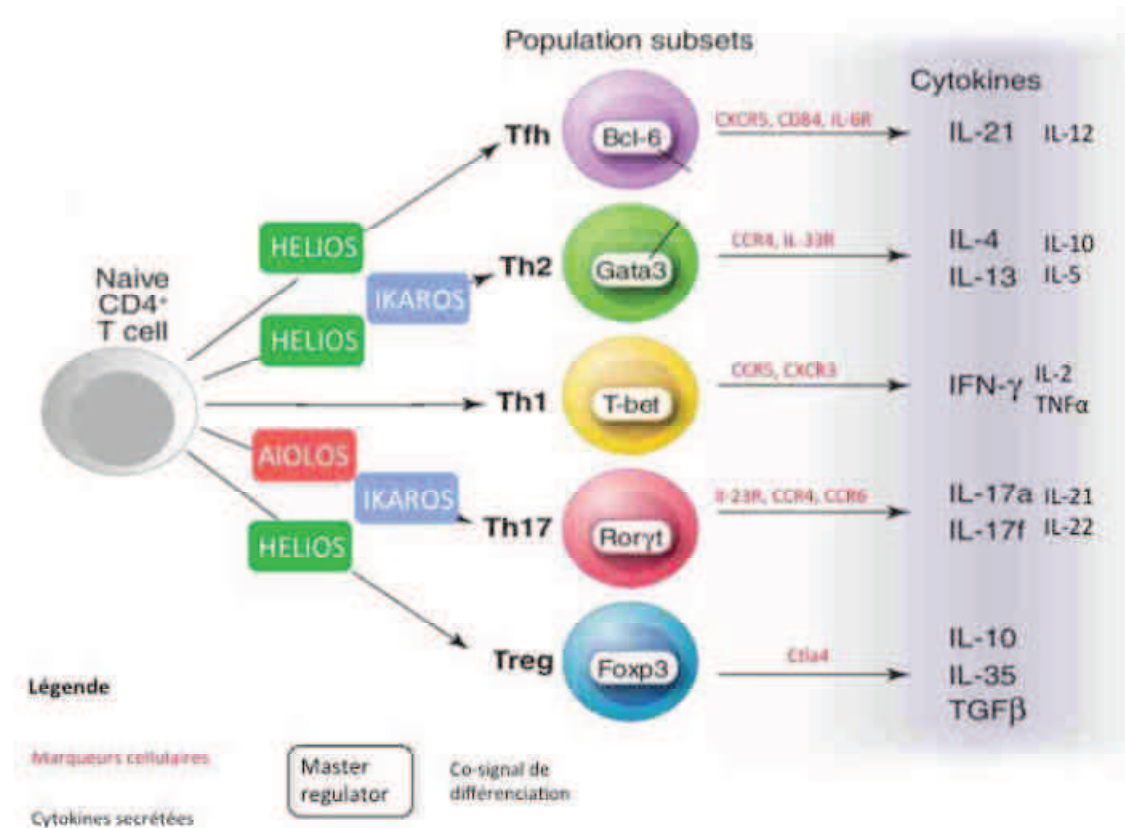


Figure D1 : Schéma représentant l'impact potentiel des membres de la famille Ikaros dans l'apparition des différents sous-types de cellules CD4⁺ (Adapté de O'Shea et al., 2010).

Partie 2 :

**Implication des facteurs de la
famille Ikaros dans le contrôle de la
prolifération des lymphocytes T.**

Partie 2 : Implication des facteurs de la famille Ikaros dans le contrôle de la prolifération des lymphocytes T

La différenciation des cellules T au cours de la sélection du TCR β (DN3-DN4) et du TCR $\alpha\beta$ (stade DP) est liée à une diminution de la prolifération cellulaire. La lignée ILC87 est une lignée tumorale qui présente une prolifération accrue. Les différentes ré-expressions des facteurs de la famille Ikaros ont alors permis de voir si l'un était impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire.

On peut voir dans l'expérience réalisée que la translocation d'Aiolos, Helios ou Ikaros induit une diminution de la croissance cellulaire. Ce comportement des cellules va de pair avec le début de différenciation observée dans la partie précédente.

Deux hypothèses peuvent expliquer cette diminution : la mort des cellules dans la culture en réponse à la ré-expression des facteurs de la famille, ou bien la mise en latence d'une partie de la population par un blocage du cycle cellulaire.

1. La mort des cellules est-elle due à une diminution de la croissance cellulaire ?

Les cellules des différentes lignées ont été analysées par incorporation de TOPRO-3 afin de déterminer s'il y a une augmentation de la proportion de cellules mortes dans la culture. On voit une diminution de la proportion des cellules vivantes dans toutes les lignées cellulaires après traitement au 4-OHT, légèrement plus fortement dans la lignée ré-exprimant la protéine Aiolos.

Cette mort cellulaire peut être le fruit de deux processus :

- l'apoptose ou mort cellulaire programmée est une mort cellulaire induite par des signaux internes de la cellule ou de l'organisme (dommages à l'ADN, stress, signaux de l'organisme, perturbation du cycle cellulaire). Elle est initiée par un blocage de l'activité mitochondriale, et une dégradation de l'ADN, suivie par une dispersion sous forme de corps apoptotiques.
- la nécrose est une forme de mort cellulaire dans laquelle il y a destruction de la cellule par éclatement (lyse), après une phase de gonflement (afflux d'eau intracellulaire).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Après éclatement de la cellule et de son contenu (acides nucléiques, organelles, protéines, ...) se répand dans le milieu. Ce processus n'est pas contrôlé par la cellule.

Le facteur de transcription Aiolos a été montré comme interagissant avec des protéines anti-apoptotiques que sont Bcl-2 et Bcl-xl (Romero *et al.*, 1999 ; Rebollo *et al.*, 2001). La protéine Ikaros semble également participer à la régulation de l'apoptose dans les cellules érythroïdes de la moelle osseuse. Les auteurs ont pu observer que dans les souris déficientes pour Ikaros (Ik^{-/-}), il y a une augmentation des protéines SMAD6 et SMAD7, et une diminution de l'apoptose des cellules (Pulte *et al.*, 2006). Ce processus a pu être également visualisé dans d'autres types cellulaires mais de façon moins importante d'après la même étude. Aucun membre de la famille Ikaros ne semble pour le moment impliqué dans la nécrose cellulaire.

Un lien entre Helios et l'apoptose n'a pour le moment pas été déterminé. Cependant une étude réalisée dans mon laboratoire par ChIP dans les cellules ILC87-Helios-ER, suggère que Helios serait susceptible de réguler l'expression de p21 et PUMA, en se fixant sur des séquences régulatrices du locus des gènes (données non publiées).

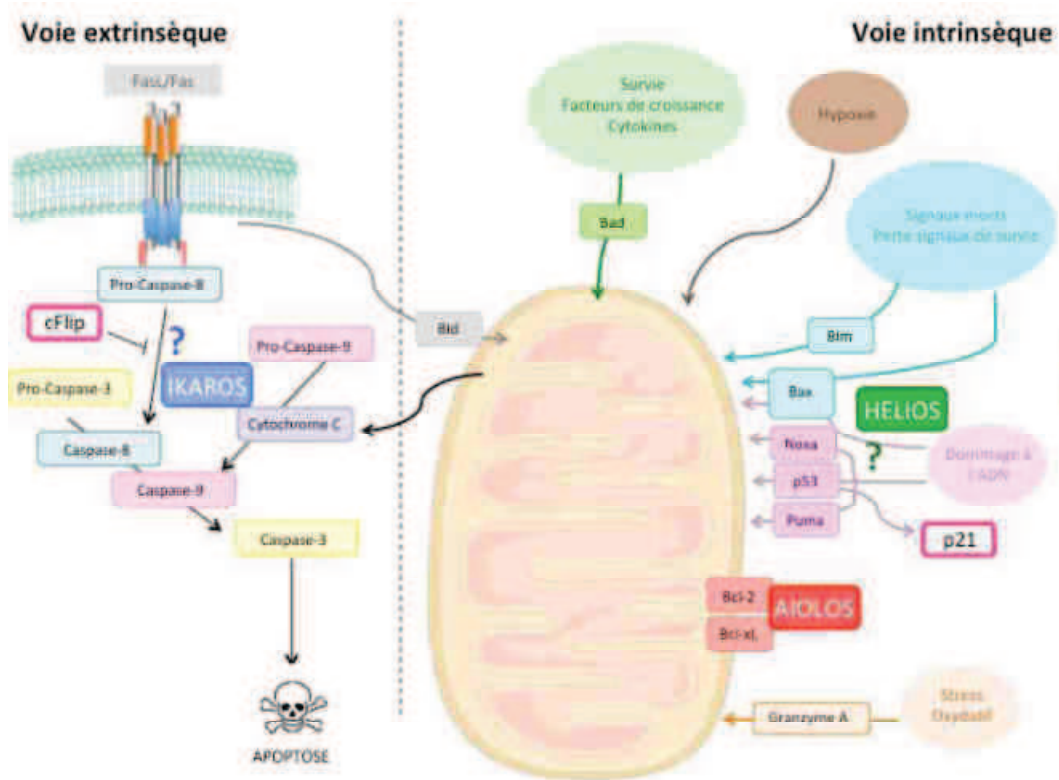


Figure D2 : Schéma représentant l'action potentielle des membres de la famille Ikaros dans la régulation du phénomène d'apoptose.

Les membres de la famille Ikaros sont représentés à côté de leurs partenaires protéiques avérés ou potentiels, et les protéines cFlip et p21 sont également représentées.

J'ai réalisé un marquage AnnexinV/DAPI afin de différencier les cellules vivantes, les cellules en nécrose et les cellules en apoptose (précoce et tardive). Le résultat obtenu ne montre pas de différence entre les lignées dans lesquelles on a induit la translocation nucléaire des protéines d'intérêt et les lignées témoins non induites. L'analyse réalisée par micro-array et RT-qPCR a permis de montrer une augmentation de l'expression des gènes *Cflar* et *Casp16* dans le cas des lignées cellulaires ILC87-Aiolos-ER et ILC87-Ikaros-ER. Le premier gène code pour la protéine c-Flip qui inhibe l'activation de la caspase 8 (principale caspase initiatrice) responsable d'une des voies d'apoptose. L'activation de cet inhibiteur, semble suggérer une inhibition de l'apoptose dans ces lignées cellulaires, en réponse à la présence de Aiolos, Helios ou Ikaros (**Figure D2**).

Il serait néanmoins intéressant de confirmer l'absence d'implication de l'apoptose dans cette diminution par d'autres méthodes d'analyses, telles que : la détection des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, ou de molécules pro-apoptotiques comme Bax, un marquage des caspases par cytométrie en flux ou une analyse de la fragmentation de l'ADN dans les cellules en culture.

2. Y- a - t'il une action des protéines de la famille Ikaros sur le contrôle du cycle cellulaire ?

Une autre explication possible à la diminution de la croissance cellulaire est qu'une partie des cellules en culture entre en "latence", c'est à dire en phase G0 du cycle cellulaire et qu'il y ait donc un arrêt de la croissance de cette partie des cellules. Cette hypothèse de "sous-populations" au sein même de la culture est soutenue par le fait que j'ai pu démontrer que selon le niveau d'expression des protéines d'intérêt, le niveau de différenciation n'est pas le même.

En effet le cycle cellulaire est une succession d'étapes permettant aux cellules de dupliquer leur matériel génétique et de donner naissance à deux cellules à partir d'une seule. Ce processus est très fortement régulé afin d'éviter une prolifération cellulaire incontrôlée, et une réplication d'un matériel génétique endommagé entraînant l'apparition de cancers. Les différentes phases du cycle sont les suivantes ; phase G1 (duplication du contenu cellulaire en dehors des chromosomes), phase S (duplication du matériel génétique), phase G2 (vérification de la réplication de l'ADN), phase M (mitose et cytokinèse). Une phase supplémentaire, appelée G0 est considérée comme une "sortie du cycle", et correspond à des cellules quiescentes ne proliférant plus, mais restant sous forme latente. Les différentes phases et les transitions entre celles-ci sont contrôlées par différentes protéines spécifiques, comme les cyclines, cdk, cdc, ...

Les analyses de micro-array et de RT-qPCR que j'ai réalisées ont permis de montrer une induction de l'expression de gènes codant pour certaines de ces protéines : *Cdc23*, *Cdc6* et *Cdkn1a*. Le gène *Cdc23* code pour la protéine CDC23 qui est impliquée dans la phase de transition de G2 vers M, elle fait aussi partie du complexe APC (Anaphase Promoting Complex). Le gène *Cdc6* code pour la protéine Cdc6p qui est impliquée dans la réplication de l'ADN, sert de checkpoint entre la phase S et M (Borlado et Méndez, 2008). Et finalement le gène *Cdkn1a* code pour la protéine p21 qui peut inhiber les cyclines CDK1/2, inhibant ainsi la réplication de l'ADN via la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), inhibant l'entrée en mitose et permettant la mise en place de la sénescence cellulaire. Son expression est contrôlée par la protéine p53 (Harper *et al.*, 1993 ; Rodriguez *et al.*, 2006). Il serait alors possible de déterminer une implication des facteurs Aiolos, Helios et Ikaros dans l'arrêt du cycle cellulaire de certaines cellules et leur entrée en phase de quiescence après traitement des

différentes lignées au 4-OHT. Cette hypothèse est soutenue par différentes découvertes impliquant les facteurs Aiolos et Ikaros, et les liant à la régulation du cycle cellulaire.

La première étude réalisée par l'équipe de K. Georgopoulos a mis à jour la capacité de la protéine Ikaros à réguler le passage des étapes G1 à S du cycle cellulaire. Cette fonction est liée à la phosphorylation de Ikaros sur le site p1 (exon8), ce qui engendre une diminution de l'affinité de Ikaros pour ses séquences cibles sur l'ADN, permettant la transition vers la phase S du cycle (Gómez-del Arco *et al.*, 2004). L'équipe de S. Winandy a permis de déterminer que l'introduction de la protéine Ikaros (Ik-1) dans des cellules murines leucémiques Ik-/-, engendre un arrêt de la croissance cellulaire, avec une entrée des cellules en phases G1/G0, une activation de la protéine p27 (répresseur des phases S-G1) et une augmentation de l'apparition des marqueurs de différenciation des cellules T (Kathrein *et al.*, 2005).

Quelques années plus tard, le groupe de S. Dovat a pu mettre en évidence des sites de phosphorylation spécifiques sur la séquence de Ikaros (serine/thréonine). Ces sites sont phosphorylés/dé-phosphorylés de façon cyclique par la CK2 kinase / PP1 phosphatase. Les auteurs suggèrent une balance de régulation entre ces deux voies, permettant une régulation normale de la prolifération cellulaire, ainsi qu'un rôle comme suppresseur de tumeurs (Popescu *et al.*, 2009 ; Song *et al.*, 2011). Cette idée a été confirmée par une étude réalisée sur des lignées cellulaires humaines dérivées de leucémies LAL-B et LAL-T et présentant des résultats similaires (Li *et al.*, 2012).

Dans le cas de la protéines Aiolos, des études ont permis de montrer que la sur-expression de Aiolos dans une lignée cellulaire pré-B (Nalm6) entraîne une diminution de la prolifération cellulaire, une augmentation de la proportion de cellules en phase G0/G1, combinées à une diminution des cellules en phase S (Zhuang *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2015). Aucune donnée concernant un possible lien entre Helios et le cycle cellulaire n'est actuellement disponible.

Les données obtenues, croisées avec les références bibliographiques, semblent suggérer que les facteurs de la famille Ikaros peuvent être impliqués dans une régulation du cycle cellulaire, induisant ainsi la diminution de la croissance cellulaire observée. Afin d'affirmer ou de contester cette hypothèse, il sera nécessaire de confirmer une modification du cycle cellulaire (analyse du cycle cellulaire par marquage et analyse par cytométrie en flux à l'iodure de propidium par exemple), vérifier la présence et la régulation des protéines du cycle cellulaire (Cyclines, cdc, cdk) qui sont impliquées dans le blocage du cycle cellulaire par Western Blot et/ou RT-qPCR.

Partie 3 :

**Helios semble capable de réguler
des gènes spécifiques**

Partie 3 : Helios semble capable de réguler des gènes spécifiques

Malgré la très forte identité de séquences déterminées entre les protéines Helios et Ikaros, l'étude des résultats de l'analyse transcriptionnelle entre Helios et Ikaros, a permis d'identifier des gènes spécifiquement régulés par l'une ou l'autre des protéines, ainsi que des gènes dont l'expression est co-réglée à la fois par Helios et Ikaros.

De nombreux gènes identifiés par l'étude de micro-array et testés par RT-qPCR sont régulés de façon similaire par Ikaros et Helios, mais d'une façon moins importante dans le cas de Helios. Peu de gènes semblent être des cibles spécifiques de Helios.

1. Les gènes activés par le facteur Helios

Après analyse des données du micro-array et confirmation par RT-qPCR, deux gènes semblent être spécifiquement induits par le facteur de transcription Helios et non par Ikaros.

Le premier gène identifié est *Plcx2* ou Phosphatidylinositol-specific-phospholipase C, X domain containing 2. Ce gène code pour la protéine PLCX2 qui hydrolyse les phospholipides en acides gras et autres molécules lipophiles. La protéine est exprimée de manière ubiquitaire et participe à diverses fonctions biologiques dont la croissance des cellules, la signalisation et la mort cellulaire ainsi qu'à l'entretien des phospholipides membranaires.

Le deuxième gène identifié est *Tsnax*. Ce gène code pour la protéine Translin-Associated Factor X ou TSNAX, qui interagit spécifiquement avec la protéine appelée Translin, qui est une protéine de liaison à l'ADN qui se lie à des séquences consensus présentes aux jonctions des points de cassure des translocations chromosomiques (Aoki *et al.*, 1997 ; Erdemir *et al.*, 2002). Une expérience de ChIP réalisée dans le laboratoire dans la même lignée cellulaire après 24h d'induction a montré qu'il y avait une fixation de Helios sur la séquence régulatrice du gène *Tsnax*, ce qui confirmerait la régulation de l'expression de ce gène par Helios. De façon intéressante, notre équipe a pu montrer que Helios semble être impliqué dans le maintien de l'intégrité génomique (données non publiées), ce qui expliquerait une possible action sur l'expression de *Tsnax*.

2. Les gènes réprimés par le facteur Helios

L'analyse des gènes réprimés à partir du micro-array a mis à jour très peu de gènes. Parmi ceux isolés, il y a le gène *Cpe* qui code pour la Carboxypeptidase E. Cette protéine participe à la synthèse des hormones peptidiques et des neuropeptides (Cool *et al.*, 1997). Son expression a été montrée comme étant réprimée dans une étude de micro-array réalisée sur des cellules souches hématopoïétiques déficientes pour Helios (données non publiées).

Son expression a été montrée comme étant spécifiquement réprimée par Helios dans le micro-array, mais les données de RT-qPCR suggèrent que le facteur Ikaros serait également capable de réprimer son expression.

Partie 4 :

**Y-a-t 'il une collaboration possible
entre les facteurs Aiolos et Ikaros
dans le développement des
lymphocytes T ?**

Partie 4 : Y- a- t'il une collaboration possible entre les facteurs Aiolos et Ikaros dans le développement des lymphocytes T ?

Les protéines Aiolos et Ikaros sont les deux membres présentant la plus forte similarité de comportement au sein de la famille. Un des buts de ma thèse était donc de déterminer dans quelle mesure ces deux protéines présentaient des fonctions similaires ou spécifiques. Les différentes expériences réalisées sur le plan fonctionnel ou transcriptionnel, ont permis de suggérer un lien fonctionnel partiel entre ces deux protéines.

1. Détermination de gènes co-régulés suggérant une collaboration entre Aiolos et Ikaros

Les différentes analyses phénotypiques réalisées (analyse de l'apparition de CD4/CD8 α par cytométrie en flux et RT-qPCR, analyse de la croissance cellulaire) ont permis de suggérer des actions similaires des deux protéines, bien que d'amplitudes très différentes. En effet l'induction de l'expression de CD4 et CD8 α par Aiolos est extrêmement faible comparée aux valeurs enregistrées pour Ikaros. Ces données nous laissent cependant à penser qu'il existe peut-être une spécificité d'action de la part de Aiolos et d'Ikaros.

Afin de voir si Aiolos est capable d'une action différente de Ikaros dans la régulation génique, j'ai analysé sa capacité à réguler l'expression de certains gènes connus comme étant des cibles de Ikaros. J'ai pu observer que Aiolos semble être capable de réguler la répression de certains de ces gènes (*Mpzl2*, *Scn4b* et *Ctnd1*) de façon similaire à celle qui est observée pour Ikaros. Le gène testé dans le cas de l'induction est *Rorc*, qui est très fortement induit par Ikaros, et seulement faiblement par Aiolos en comparaison.

Si on s'intéresse plus précisément aux gènes étudiés, on peut noter que :

- La protéine *Mpzl2* est fortement exprimée dans les cellules T immatures au stade DN4 et permet l'adhésion des cellules au stroma thymique, puis son expression diminue lors de la maturation des cellules T (Guttinger *et al.*, 1998). Il a été découvert comme étant un gène cible de Notch (Tydell *et al.*, 2007). Dans les lignées cellulaires exprimant Ikaros et Aiolos, j'observe une diminution de l'expression de *Mpzl2*.
- La protéine *Scn4b* est un canal sodique qui semble essentiel pour la sélection positive des cellules T CD4⁺ (Lo *et al.*, 2012). Son expression est très élevée au stade de différenciation DN3, puis diminue lors de l'acquisition du stade DP et lors de

l'acquisition du marqueur CD4. La translocation nucléaire de Ikaros et Aiolos, induit une différenciation des cellules ainsi que l'acquisition du marqueur CD4, provoquant par le même biais la dérégulation de l'expression de ce canal.

- Le gène *Ctnnd1* code pour la protéine δ -Caténine (ou p120), membre de la famille de protéines Armadillo, qui a un rôle dans l'adhérence entre les cellules et la transduction du signal. Les protéines δ -Caténine (*Ctnnd1* et *Ctnnd2*) sont impliquées dans la régulation du facteur de transcription NF- κ B (Perez-Moreno *et al.*, 2006). NF- κ B a été démontré comme intervenant au cours du développement des lymphocytes T, particulièrement lors de la transition DN3-DN4 (Voll *et al.*, 2000). La translocation nucléaire de Ikaros et Aiolos induit une répression de l'expression de *Ctnnd1*.
- Le facteur Ror γ t est un facteur de transcription qui est nécessaire à la différenciation des cellules T CD4⁺ en cellules Th17 (Ivanov *et al.*, 2006). Cette expression est dans ma lignée cellulaire corrélée avec l'apparition d'une différenciation en cellules T CD4⁺.

Les gènes *Mpz12*, *Scn4b* et *Ctnnd1* sont tous impliqués dans les phases de différenciation des lymphocytes T entre les étapes DN et DP. Ces étapes de différenciation semblent être réalisées pour ma lignée cellulaire ILC87-Ikaros-ER, mais pas réellement dans le cas de ILC87-Aiolos, bien que j'observe une répression de ces gènes. Ces données suggèrent que Ikaros est bien impliqué dans la régulation de ces gènes, ainsi que dans le changement de phénotype cellulaire. La présence de Aiolos ne semble pas suffire à induire un changement de phénotype chez les cellules bien qu'elles soient capables de réguler ces gènes.

Afin d'aller plus loin et de voir si des gènes plus spécifiques de Aiolos sont identifiables, j'ai réalisé une analyse du transcriptome par micro-array. Les données obtenues ont permis de confirmer des gènes cibles d'Ikaros (*Cd8 α* , *H19*, *Chd1*), de déterminer des gènes co-régulés par Aiolos et Ikaros (*Cdkn1a*, *Rorc*, *Med11*, *Cflar*), ou de rares gènes régulés uniquement par Aiolos (*Cdc23*).

Ainsi peu de gènes semblent être susceptibles d'être uniquement régulés par le facteur Aiolos, alors que de nombreux gènes semblent régulés par les deux facteurs. Ces données suggèrent une co-régulation possible par les deux protéines. L'absence d'Ikaros expliquerait peut-être la faible action de Aiolos dans les cellules, et deux hypothèses sont envisageables :

- Dans la lignée ILC87-Aiolos-ER, il y a sur-expression de Aiolos, mais pas la présence de la protéine Ikaros. Si la protéine a besoin d'agir sous forme d'hétérodimère Aiolos/Ikaros pour être fonctionnelle et non d'homodimère Aiolos/Aiolos, cette absence expliquera peut-être la faible action dans les cellules. L'article de l'équipe de K. Georgopoulos met en lumière l'action conjointe des deux protéines et suggère que ce rôle est nécessaire notamment au cours de la différenciation des lymphocytes T et B (Morgan *et al.*, 1997).
- Une autre hypothèse, elle aussi basée sur l'absence de la protéine Ikaros dans la lignée cellulaire ILC87-Aiolos-ER, suggère que Ikaros permet la régulation de l'expression de *Ikzf3*, codant pour Aiolos. Elle est soutenue par une publication de l'équipe de A.Rebollo, qui montre une fixation de Ikaros sur la séquence du promoteur de *Ikzf3*, ce qui permet d'activer l'expression de Aiolos dans des lignées cellulaires, ainsi que dans des cellules primaires B et T isolées (Ghadiri *et al.*, 2007). Cette seconde hypothèse est réfutée par une absence de l'induction de *Ikzf3* dans la lignée ILC87-Ikaros-ER dans l'analyse du micro-array.

Une autre hypothèse potentielle est d'ordre plus pratique. Lors de la génération des différentes lignées cellulaires, la lignée ILC87-Aiolos-ER a été la plus difficile à réaliser du point de vue des infections virales, le taux de transduction étant plus faible que pour les autres. Cette difficulté lors des transductions virales est peut-être à l'origine de l'impact réduit de Aiolos sur les gènes testés, ainsi que sur l'analyse par micro-array.

La lignée ILC87-Aiolos-ER présente une capacité de répression des gènes similaire à celle sur-exprimant Ikaros, ce qui permet de rejeter l'idée d'un niveau d'expression plus faible de la protéine.

Il serait intéressant d'utiliser une lignée cellulaire T déficiente pour Aiolos et de sur-exprimer Ikaros dans celle-ci, afin de voir si on peut restaurer le phénotype et la régulation des gènes cibles de Aiolos, grâce à l'activité de Ikaros.

2. Quelle est l'importance des domaines DBD dans la régulation des différents gènes cibles ?

Les protéines Aiolos et Ikaros présentent une homologie de séquences de 53 %, avec une 86 % d'identité entre leur domaine DBD, et 80 % entre leur domaine de dimérisation (Hahm *et al.*, 1998). Cette identité de séquences entre les domaines est très forte, mais néanmoins plus faible que celle partagée entre les protéines Helios et Ikaros au niveau des mêmes domaines (94 %). Cette plus forte différence est peut être à l'origine des différences fonctionnelles observées entre Aiolos et Ikaros.

Afin de tester cette possibilité, j'ai généré des lignées chimères : Aiolos-DBD-Ikaros (AdI) et Ikaros-DBD-Aiolos (IdA). Ces lignées expriment des protéines chimères Aiolos-DBD-Ikaros et Ikaros-DBD-Aiolos réalisées par un échange des deux domaines DBD. Elles ont été soumises aux mêmes analyses que les lignées classiques et ont donc permis de voir l'importance de la spécificité des DBD dans les fonctions des deux membres.

Elles présentent des comportements intermédiaires entre ceux d'Aiolos et Ikaros. Le facteur AdI entraîne une très faible expression des marqueurs CD4 et CD8 α , et une différenciation proche de celle observée dans le cas de Aiolos. Avec néanmoins une proportion légèrement plus forte de cellules SP CD4⁺ au sein des cellules GFP^{high}. Les cellules sur-exprimant IdA, engendrent une expression moyenne des marqueurs CD4 et CD8 α , une différenciation semblable à celle de Ikaros, à partir du jour 4 principalement. Comme pour Ikaros, leurs actions sur les niveaux d'expression de CD4 et CD8 α sont fonction du niveau de GFP. Les deux lignées présentent également une diminution de la croissance cellulaire similaire à celle observée précédemment.

La régulation des gènes cibles d'Ikaros par AdI est similaire à celle observée pour Ikaros, et même plus forte dans le cas de la répression de *Mpzl2*, *Scn4b* et *Ctnd1*. En comparaison IdA ne présente que peu, voir pas d'effet sur le niveau d'expression de ces mêmes gènes. Aucun des deux facteurs chimériques ne semble cependant capable de réguler l'expression de *Rorc*.

L'étude des résultats du micro-array a permis d'aller plus loin. En accord avec les résultats obtenus par RT-qPCR, les lignées AdI et IdA perdent une grande partie de leurs capacités inductrices, et répressives. Toutefois, les chimères semblent être capables de réprimer les gènes réprimés par Ikaros mais plus difficilement ceux réprimés en temps normal par Aiolos. Elles ne sont pas capables d'activer faiblement les gènes induits par Ikaros ou Aiolos.

L'expression du DBD de Ikaros au sein de la séquence codante pour Aiolos, dans la lignée AdI, ne semble pas suffisante pour permettre la régulation des gènes cibles de Ikaros, et ne permet que faiblement celle des gènes cibles de Aiolos. Au contraire, l'introduction du DBD de Aiolos dans la séquence codant pour Ikaros, donnant la lignée IdA, ne semble pas perturber de manière importante la régulation des gènes cibles de Ikaros. Ces résultats suggèrent que l'intégrité des protéines Aiolos et Ikaros est importante. Il semble y avoir une action conjointe des DBD avec les autres domaines de leurs séquences respectives.

3. La collaboration de Aiolos et Ikaros peut-elle être mise en place de façon chronologique ?

Les deux protéines présentent une expression différentielle au cours des phases de la lymphopoïèse (Ikaros depuis les cellules souches jusqu'aux cellules matures, et Aiolos plutôt dans les cellules matures). Leurs actions pourraient donc être séquentielles bien que collaboratrices. Cette hypothèse est soutenue par l'action progressive des facteurs sur l'expression des gènes *Cd4* et *Cd8 α* lors des expériences de différenciation.

J'ai décidé de tester cette possibilité en réalisant une étude cinétique sur la régulation des gènes testés précédemment : *Cd8 α* , *Rorc*, *Cdkn1a*, *Med11*, *Cdc23* et *Cflar*.

Cette expérience a permis d'observer un comportement spécifique :

- La protéine Ikaros semble être capable d'induire l'expression de gènes « précoces ». A contrario le facteur Aiolos est impliqué dans une expression tardive de ces gènes cibles.
- Les protéines chimères présentent un profil similaire : le facteur AdI paraît être plus impliqué dans les phases tardives de transcription (comme Aiolos), alors que IdA est plus impliqué dans la phase précoce (comme Ikaros).

Il semblerait que la mise en place de la régulation des gènes cibles communs de Aiolos et Ikaros (*Cdkn1a*, *Cflar*) soit réalisée en deux vagues successives et concomitantes par moment.

Il serait intéressant de voir si cette chronologie peut être induite artificiellement par une sur-expression différée des deux facteurs dans la même ligne cellulaire (par deux systèmes d'induction indépendants). Cette lignée cellulaire, permettrait aussi de définir si la collaboration potentielle entre Aiolos et Ikaros est dépendante du niveau d'expression des deux facteurs pour sa réalisation optimale.

Partie 5 :

Conclusion générale

Partie 5 : Conclusion générale

Lors de mon étude, j'ai pu montrer que les différents membres de la famille Ikaros induisent différents phénotypes après ré-expression dans les cellules ILC87. Aiolos et Helios présentent une fonction similaire à celle de Ikaros en induisant à la fois une différenciation et une réduction de la prolifération des cellules ILC87. Les modèles de permutation présentent deux comportements différents. La ré-expression de Aiolos-DBD-Ikaros induit une légère différenciation des cellules ILC87 qui expriment alors les marqueurs CD4 et CD8. Cette différenciation est liée à une diminution de la prolifération des cellules. Le DBD de Ikaros ne semble pas suffisant pour induire une différenciation prononcée des cellules, une fois inséré dans la séquence de Aiolos.

Les différents membres de la famille présentent aussi des profils de régulations géniques différents. Aiolos et Helios régulent les gènes cibles de Ikaros de façon similaire à Ikaros mais avec une moins grande amplitude.

L'étude des résultats de l'analyse transcriptionnelle entre Helios et Ikaros, a permis d'identifier des gènes spécifiquement régulés par l'une ou l'autre des protéines, ainsi que des gènes dont l'expression est co-réglée à la fois par Helios et Ikaros. L'étude des chimères a permis de montrer que certains gènes sont régulés spécifiquement par Aiolos ou bien Ikaros, mais que cette spécificité n'est pas, en général, portée par le domaine DBD mais par un autre domaine du gène. En effet on voit que pour un gène Ikaros spécifique, cette régulation n'est pas maintenue dans la chimère AdI, bien qu'il y ait présence du DBD de Ikaros. Il semble donc que en l'absence du DBD, il y ait un maintien partiel de la spécificité des gènes régulés.

Cette mise en évidence pourrait permettre de déterminer à plus long terme des domaines spécifiques de régulation pour les différents membres de la famille Ikaros.

Références

Bibliographie

Aifantis I, Borowski C, Gounari F, Lacorazza HD, Nikolich-Zugich J, von Boehmer H., « A critical role for the cytoplasmic tail of pTalpha in T lymphocyte development. » 2002, *Nat Immunol.* ; 3(5):483-8

Alam SM, Travers PJ, Wung JL, Nasholds W, Redpath S, Jameson SC, Gascoigne NR., « T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. » 1996, *Nature*.13; 381(6583):616-20.

Aoki K, Ishida R, Kasai M. «Isolation and characterization of a cDNA encoding a Translin-like protein, TRAX.» 1997, *FEBS Lett.* ; 401(2-3):109-12.

Antica M, Dubravcic K, Weber I, Raic L, Labar B, Batinic D., « A search for a mutation of the Aiolos phosphorylation domain in lymphocytes from patients with leukemia. » 2007, *Haematologica* ; 92(2):260-1.

Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. «Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T cell growth. » 2013, *Cancer Sci.*; 104(8):1097-106.

Avitahl N, Winandy S, Friedrich C, Jones B, Ge Y, Georgopoulos K. « Ikaros sets thresholds for T cell activation and regulates chromosome propagation. » 1999, *Immunity*. 10(3):333-43.

Bain G, Robanus Maandag EC, te Riele HP, Feeney AJ, Sheehy A, Schlissel M, Shinton SA, Hardy RR, Murre C. « Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage. » 1997 *Immunity*. ; 6(2):145-54.

Baine I, Basu S, Ames R, Sellers RS, Macian F. « Helios induces epigenetic silencing of IL2 gene expression in regulatory T cells. » 2013 ; *J Immunol.* ; 190(3):1008-16.

Balciunaite G, Ceredig R, Rolink AG. « The earliest subpopulation of mouse thymocytes contains potent T, significant macrophage, and natural killer cell but no B-lymphocyte potential. » 2005, *Blood.* ; 105(5):1930-6

Benlagha K, Kyin T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. « A thymic precursor to the NK T cell lineage. » 2002 ; *Science.* ; 296(5567)

Billot K, Soeur J, Chereau F, Arrouss I, Merle-Béral H, Huang ME, Mazier D, Baud V, Rebollo A. « Deregulation of Aiolos expression in chronic lymphocytic leukemia is associated with epigenetic modifications. » 2011 ; *Blood.* ; 117(6):1917-27.

Boggs SS, Trevisan M, Patrene K, Georgopoulos K. « Lack of natural killer cell precursors in fetal liver of Ikaros knockout mutant mice. » 1998 ; *Nat Immun.* ; 16(4):137-45.

Borlado LR, Méndez J. «CDC6: from DNA replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis. » 2008, *Carcinogenesis.* ; 29(2):237-43.

Brändle D, Müller C, Rüllicke T, Hengartner H, Pircher H. « Engagement of the T-cell receptor during positive selection in the thymus down-regulates RAG-1 expression. » 1992 ; Proc Natl Acad Sci U S A. ; 89(20):9529-33.

Brown KE, Guest SS, Smale ST, Hahm K, Merkenschlager M, Fisher AG. « Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. » 1997 ; Cell. ; 91(6):845-54.

Brown KE, Baxter J, Graf D, Merkenschlager M, Fisher AG. « Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. » 1999 ; Mol Cell. ; 3(2):207-17.

Caballero R, Setien F, Lopez-Serra L, Boix-Chornet M, Fraga MF, Ropero S, Megias D, Alaminos M, Sanchez-Tapia EM, Montoya MC, Esteller M, Gonzalez-Sarmiento R, Ballestar E. « Combinatorial effects of splice variants modulate function of Aiolos. » 2007 ; J Cell Sci. ; 120(Pt 15):2619-30.

Cai Q, Dierich A, Oulad-Abdelghani M, Chan S, Kastner P. « Helios deficiency has minimal impact on T cell development and function. » 2009 ; J Immunol. ; 183(4):2303-

Ceredig R, Cummings DE. « Phenotypic and functional properties of murine thymocytes. III. Kinetic analysis of the recovery of intrathymic cytolytic T lymphocyte precursors after in vivo administration of hydrocortisone acetate. » 1983 ; J Immunol. ; 130(1):33-7.

Cobb BS, Morales-Alcelay S, Kleiger G, Brown KE, Fisher AG, Smale ST. « Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. » 2000 ; Genes Dev. ; 14(17):2146-60.

Cool DR, Normant E, Shen F, Chen HC, Pannell L, Zhang Y, Loh YP. « Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. » 1997, Cell. ; 88(1):73-83.

Cortes M, Wong E, Koipally J, Georgopoulos K. « Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. » 1999 ; Curr Opin Immunol. ; 11(2):167-71.

DeKoter RP, Singh H. « Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. » 2000 ; Science. ; 288(5470):1439-41.

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. » 2005 ; J Exp Med. ; 201(11):1715-23.

Duhamel M (1), Arrouss I, Merle-Béral H, Rebollo A. « The Aiolos transcription factor is up-regulated in chronic lymphocytic leukemia. » 2008 ; Blood. ; 111(6):3225-8.

Duhamel M (2), Navarro P, Cario-Andre M, Billot K, Arrouss I, Rebollo A. « Differential epigenetic regulation of Aiolos expression in human tumoral cell lines and primary cells. » 2008 ; FEBS Lett. ; 582(3):457-67.

Dumortier A (1), Kirstetter P, Kastner P, Chan S. « Ikaros regulates neutrophil differentiation. » 2003 ; Blood. ; 101(6):2219-26.

Dumortier A (2), Jeannet R, Kirstetter P, Kleinmann E, Sellars M, dos Santos NR, Thibault C, Barths J, Ghysdael J, Punt JA, Kastner P, Chan S. « Notch activation is an early and critical event during T-Cell leukemogenesis in Ikaros-deficient mice. » 2006 ; Mol Cell Biol. ; 26(1):209-20.

Emambokus N, Vegiopoulos A, Harman B, Jenkinson E, « Progression through key stages of haemopoiesis is dependent on distinct threshold levels of c-Myb. » 2003 ; EMBO J. ; 22(17):4478-88.

Engel I, Murre C. « E2A proteins enforce a proliferation checkpoint in developing thymocytes. » 2004 ; EMBO J. ; 23(1):202-11.

Erdemir T, Bilican B, Oncel D, Goding CR, Yavuzer U. «DNA damage-dependent interaction of the nuclear matrix protein C1D with Translin-associated factor X (TRAX).» 2002, J Cell Sci. ; 115(Pt 1):207-16.

Ernst P, Hahm K, Trinh L, Davis JN, Roussel MF, Turck CW, Smale ST. « A potential role for Elf-1 in terminal transferase gene regulation. » 1996 ; Mol Cell Biol. ; 16(11):6121-31.

Ezzat S, Mader R, Yu S, Ning T, Poussier P, Asa SL. « Ikaros integrates endocrine and immune system development. » 2005 ; J Clin Invest. ; 115(4):1021-9

Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P. « Ligand-activated site-specific recombination in mice. » 1996 ; Proc Natl Acad Sci U S A. ; 93(20):10887-90.

Franco CB, Scripture-Adams DD, Proekt I, Taghon T, Weiss AH, Yui MA, Adams SL, Diamond RA, Rothenberg EV. « Notch/Delta signaling constrains reengineering of pro-T cells by PU.1. », 2006, Proc Natl Acad Sci U S A. ; 103(32):11993-8.

Fujii K, Ishimaru F, Nakase K, Tabayashi T, Kozuka T, Naoki K, Miyahara M, Toki H, Kitajima K, Harada M, Tanimoto M. « Over-expression of short isoforms of Helios in patients with adult T-cell leukaemia/lymphoma. » 2003 ; Br J Haematol. ; 120(6):986-9.

Geimer Le Lay AS, Oravec A, Mastio J, Jung C, Marchal P, Ebel C, Dembélé D, Jost B, Le Gras S, Thibault C, Borggreffe T, Kastner P, Chan S. « The tumor suppressor Ikaros shapes the repertoire of notch target genes in T cells. » 2014, Sci Signal.;7 (317)

Getnet D, Grosso JF, Goldberg MV, Harris TJ, Yen HR, Bruno TC, Durham NM, Hipkiss EL, Pyle KJ, Wada S, Pan F, Pardoll DM, Drake CG. « A role for the transcription factor

Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. », 2010, Mol Immunol. ; 47(7-8):1595-600.

Georgopoulos K, Moore DD, Derfler B. « Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. » 1992 ; Science. ; 258(5083):808-12.

Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, Molnar A, Wu P, Winandy S, Sharpe A. « The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. » 1994, Cell. ; 79(1):143-56.

Georgopoulos K, Winandy S, Avitahl N. « The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. » 1997 ; Annu Rev Immunol. ; 15:155-76. Review.

Georgopoulos K. « Transcription factors required for lymphoid lineage commitment. » 1997 ; Curr Opin Immunol. ; 9 (2):222-7. Review.

Georgopoulos K. « Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. », 2002 ; Nat Rev Immunol. ; 2(3):162-74. Review.

Germain R.N. « T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. », 2002 ; Nat Rev Immunol. ; 2(5):309-22

Ghadiri A, Duhamel M, Fleischer A, Reimann A, Dessauge F, Rebollo A. «Critical function of Ikaros in controlling Aiolos gene expression.» 2007, FEBS Lett. 2007 Apr 17;581(8):1605-16.

Godfrey DI., Zlotnik A, Suda T. « Phenotypic and functional characterization of c-kit expression during intrathymic T cell development. »1992, J Immunol. ; 149(7):2281-5.

Godfrey D.I., Kennedy J, Suda T, Zlotnik A. «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. 1993. 150: 4244-4252. » 1993, J Immunol. ; 150(10):4244-52.

Godfrey DI et Zlotnik A « Control points in early T-cell development. » 1993 Immunol Today. ; 14(11):547-53. Review.

Gómez-del Arco P, Maki K, Georgopoulos K. «Phosphorylation controls Ikaros's ability to negatively regulate the G(1)-S transition. » 2004, Mol Cell Biol. ; 24(7):2797-807.

Gottschalk RA, Corse E, Allison JP. et al., «Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. » 2012, J Immunol. ; 188(3):976-80.

Guttinger M, Sutti F, Panigada M, Porcellini S, Merati B, Mariani M, Teesalu T, Consalez GG, Grassi F. «Epithelial V-like antigen (EVA), a novel member of the immunoglobulin superfamily, expressed in embryonic epithelia with a potential role as homotypic adhesion molecule in thymus histogenesis.» 1998, J Cell Biol. ; 141(4):1061-71.

Hahm K, Ernst P, Lo K, Kim GS, Turck C, Smale ST. « The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. » 1994, *Mol Cell Biol.* ; 14(11):7111-23

Hahm K, Cobb BS, McCarty AS, Brown KE, Klug CA, Lee R, Akashi K, Weissman IL, Fisher AG, Smale ST., « Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. » 1998, *Genes Dev.* ; 12(6):782-96.

Hardy RR, Kincade PW, Dorshkind K. « The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. » 2007, *Immunity.* ; 26(6):703-14. Review.

Harker N, Naito T, Cortes M, Hostert A, Hirschberg S, Tolaini M, Roderick K, Georgopoulos K, Kioussis D. «The CD8alpha gene locus is regulated by the Ikaros family of proteins. » 2002, *Mol Cell.* ; 10(6):1403-15.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. «The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.» 1993, *Cell.* ; 75(4):805-16.

Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, Hipkiss EL, Getnet D, Goldberg MV, Maris CH, Housseau F, Yu H, Pardoll DM, Drake CG. «Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity.» 2007, *J Immunol.* ; 179(7):4313-7.

Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R, Mathis D, Benoist C. « Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. » 2007, *Immunity.* ; 27(5):786-800.

Igarashi H, Gregory SC, Yokota T, Sakaguchi N, Kincade PW. « Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. » 2002, *Immunity.* ; 17(2):117-30.

Ikuta K, Weissman IL., « Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. » 1992, *Proc Natl Acad Sci U S A.* ; 89(4):1502-6.

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. «The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. » 2006, *Cell.* ; 126(6):1121-33.

Jeannet R, Mastio J, Macias-Garcia A, Oravec A, Ashworth T, Geimer Le Lay AS, Jost B, Le Gras S, Ghysdael J, Gridley T, Honjo T, Radtke F, Aster JC, Chan S, Kastner P. « » 2010

Kastner P, Chan S., « Role of Ikaros in T-cell acute lymphoblastic leukemia. » *World J Biol Chem.* ; 2(6):108-14. 2011

Kathrein KL, Lorenz R, Innes AM, Griffiths E, Winandy S. «Ikaros induces quiescence and T-cell differentiation in a leukemia cell line.» 2005, *Mol Cell Biol.* ; 25(5):1645-54.

Kelley CM, Ikeda T, Koipally J, Avitahl N, Wu L, Georgopoulos K, Morgan BA. « Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. » 1998, *Curr Biol.* ; 8(9):508-15.

Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. « "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. » 1975, *Eur J Immunol.*; 5(2):117-21.

Kim J, Sif S, Jones B, Jackson A, Koipally J, Heller E, Winandy S, Viel A, Sawyer A, Ikeda T, Kingston R, Georgopoulos K. «Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. » 1999, *Immunity.*; 10(3):345-55.

Kirstetter P, Thomas M, Dierich A, Kastner P, Chan S. «Ikaros is critical for B cell differentiation and function. » 2002, *Eur J Immunol.*; 32(3):720-30.

Kleinmann E, Geimer Le Lay AS, Sellars M, Kastner P, Chan S. « Ikaros represses the transcriptional response to Notch signaling in T-cell development. » 2008, *Mol Cell Biol.*; 28(24):7465-75.

Klug C.A., Morrison SJ, Masek M, Hahm K, Smale ST, Weissman IL. «Hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors express different Ikaros isoforms, and Ikaros is localized to heterochromatin in immature lymphocytes. » 1998, *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 95(2):657-62.

Koipally J, Georgopoulos K. « Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. » 2000 ; *J Biol Chem.* 2000 Jun 30; 275(26)

Koipally J, Georgopoulos K. (1) «Ikaros-CtBP interactions do not require C-terminal binding protein and participate in a deacetylase-independent mode of repression. » 2002, *J Biol Chem.* 2002 Jun 28; 277(26):23143-9.

Koipally J, Georgopoulos K. (2) « A molecular dissection of the repression circuitry of Ikaros. » 2002, *J Biol Chem.* ; 277(31):27697-705.

Koipally J, Renold A, Kim J, Georgopoulos K. « Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. » 1999, *EMBO J.*; 18(11):3090-100.

Koipally J, Renold A, Kim J, Georgopoulos K. Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. 1999, *EMBO J.* 1999 Jun 1; 18(11)

Kondo M, Weissman IL, Akashi K., «Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. » 1997; 91(5):661-72.

Koretzky GA. «Multiple roles of CD4 and CD8 in T cell activation.» 2010, *J Immunol.* ; 185(5):2643-4.

Kouskoff V, Vonesch JL, Benoist C, Mathis D., « The influence of positive selection on RAG expression in thymocytes. » 1995, *Eur J Immunol.* ; 25(1):54-8.

Li Z, Song C, Ouyang H, Lai L, Payne KJ, Dovat S. «Cell cycle-specific function of Ikaros in human leukemia.» 2012, *Pediatr Blood Cancer*. ; 59(1):69-76.

Liippo J, Nera KP, Veistinen E, Lähdesmäki A, Postila V, Kimby E, Riikonen P, Hammarström L, Pelkonen J, Lassila O., « Both normal and leukemic B lymphocytes express multiple isoforms of the human Aiolos gene. » 2001, *Eur J Immunol*. ; 31(12):3469-74.

Lin H, Grosschedl R, «Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. » 1995, *Nature*. ; 376 (6537):263-7.

Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, Petrie HT, «Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development.» 2001, *J Exp Med*. ; 194(2):127-34.

Lo K, Landau NR, Smale ST, « LyF-1, a transcriptional regulator that interacts with a novel class of promoters for lymphocyte-specific genes. », 1991 *Mol Cell Biol*. ; 11(10):5229-43.

Lo W.L., Donermeyer D.L., Allen P.M. « A voltage-gated sodium channel is essential for the positive selection of CD4(+) T cells. » 2012, *Nat Immunol*. 13(9): 880-7.

Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, Levine SS, Fraenkel E, von Boehmer H, Young RA. «Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation.» 2007, *Nature*. ; 445(7130):931-5.

Martín-Ibáñez R, Crespo E, Esgleas M, Urban N, Wang B, Waclaw R, Georgopoulos K, Martínez S, Campbell K, Vicario-Abejón C, Alberch J, Chan S, Kastner P, Rubenstein JL, Canals JM, «Helios transcription factor expression depends on Gsx2 and Dlx1&2 function in developing striatal matrix neurons. » 2012, *Stem Cells Dev*. ; 21(12):2239-51.

McCarty AS, Kleiger G, Eisenberg D, Smale ST., «Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily.» 2003, *Mol Cell*. ; 11(2):459-70.

Molnár A, Georgopoulos K., « The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins.» 1994, *Mol Cell Biol*. ; 14(12):8292-303.

Molnár A, Wu P, Largespada DA, Vortkamp A, Scherer S, Copeland NG, Jenkins NA, Bruns G, Georgopoulos K. « The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. » 1996, *J Immunol*. ; 156(2):585-92.

Mombaerts P (1), Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. «RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes.» 1992, *Cell*. ; 68(5):869-77.

Mombaerts P (2), Clarke AR, Rudnicki MA, Iacomini J, Itohara S, Lafaille JJ, Wang L, Ichikawa Y, Jaenisch R, Hooper ML, et al. «Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages.» 1992, *Nature*. ; 360(6401):225-31.

Morgan B, Sun L, Avitahl N, Andrikopoulos K, Ikeda T, Gonzales E, Wu P, Neben S, Georgopoulos K. «Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. » 1997, *EMBO J*. ; 16(8):2004-13.

Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. «The biology of hematopoietic stem cells.» 1995, *Annu Rev Cell Dev Biol*. ; 11:35-71. Review.

Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA, Downing JR. «Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia.» 2007, *Nature*. ; 446 (7137):758-64.

Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, White D, Hughes TP, Le Beau MM, Pui CH, Relling MV, Shurtleff SA, Downing JR. «BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros.» 2008, *Nature*. ; 453(7191):110-4.

Naito T, Gómez-Del Arco P, Williams CJ, Georgopoulos K. «Antagonistic interactions between Ikaros and the chromatin remodeler Mi-2beta determine silencer activity and Cd4 gene expression.» 2007, *Immunity*. ; 27(5):723-34.

Nakase K, Ishimaru F, Avitahl N, Dansako H, Matsuo K, Fujii K, Sezaki N, Nakayama H, Yano T, Fukuda S, Imajoh K, Takeuchi M, Miyata A, Hara M, Yasukawa M, Takahashi I, Taguchi H, Matsue K, Nakao S, Niho Y, Takenaka K, Shinagawa K, Ikeda K, Niiya K, Harada M. «Dominant negative isoform of the Ikaros gene in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia.» 2000, *Cancer Res*. ; 60(15):4062-5.

Nakase K, Ishimaru F, Fujii K, Tabayashi T, Kozuka T, Sezaki N, Matsuo Y, Harada M. «Overexpression of novel short isoforms of Helios in a patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia. » 2002, *Exp Hematol*. ; 30(4):313-7.

Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Friedrich C, Georgopoulos K. «Ikaros in hemopoietic lineage determination and homeostasis.» 1998, *Semin Immunol*. 1998 Apr; 10(2):119-25. Review.

Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Neben S, Friedrich C, Georgopoulos K. «Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice.» 1999, *J Exp Med*. ; 190(9):1201-14.

O'Neill DW, Schoetz SS, Lopez RA, Castle M, Rabinowitz L, Shor E, Krawchuk D, Goll MG, Renz M, Seelig HP, Han S, Seong RH, Park SD, Agalioti T, Munshi N, Thanos D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bank A. «An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells.» 2000, *Mol Cell Biol*. ; 20(20):7572-82.

Okamura RM, Sigvardsson M, Galceran J, Verbeek S, Clevers H, Grosschedl R. «Redundant regulation of T cell differentiation and TCRalpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. » 1998, *Immunity*. ; 8(1):11-20.

O'Shea, J.J., Paul, W.E. « Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4 + T Cells. » 2010, *Science* ; 327(5969):1098-102.

Pai SY, Truitt ML, Ting CN, Leiden JM, Glimcher LH, Ho IC. «Critical roles for transcription factor GATA-3 in thymocyte development. » 2003, *Immunity*. ; 19(6):863-75.

Papathanasiou P, Perkins AC, Cobb BS, Ferrini R, Sridharan R, Hoyne GF, Nelms KA, Smale ST, Goodnow CC. «Widespread failure of hematolymphoid differentiation caused by a recessive niche-filling allele of the Ikaros transcription factor.» 2003, *Immunity*. ; 19(1):131-44.

Papathanasiou P, Attema JL, Karsunky H, Hosen N, Sontani Y, Hoyne GF, Tunngley R, Smale ST, Weissman IL. «Self-renewal of the long-term reconstituting subset of hematopoietic stem cells is regulated by Ikaros.» 2009, *Stem Cells*. ; 27(12):3082-92.

Payne KJ, Dovat S. «Ikaros and tumor suppression in acute lymphoblastic leukemia.» 2011, *Crit Rev Oncog*. 2011; 16(1-2):3-12. Review.

Perdomo J, Holmes M, Chong B, Crossley M. « Eos and pegasus, two members of the Ikaros family of proteins with distinct DNA binding activities. » 2000, *J Biol Chem*. ; 275(49):38347-54.

Perez-Moreno M., Davis M.A., Wong E., Pasolli H.A., Reynolds A.B., Fuchs E. « p120-catenin mediates inflammatory responses in the skin. » 2006, *Cell*. 124(3): 631-44.

Popescu M, Gurel Z, Ronni T, Song C, Hung KY, Payne KJ, Dovat S. «Ikaros stability and pericentromeric localization are regulated by protein phosphatase 1.» 2009, *J Biol Chem*. ; 284(20):13869-80.

Porritt HE, Rumfelt LL, Tabrizifard S, Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC, Petrie HT. «Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages.» 2004, *Immunity*. 2004 Jun; 20(6):735-45.

Pulte D, Lopez RA, Baker ST, Ward M, Ritchie E, Richardson CA, O'Neill DW, Bank A. «Ikaros increases normal apoptosis in adult erythroid cells.» 2006, *Am J Hematol*. ; 81(1):12-8.

Quintana FJ, Jin H, Burns EJ, Nadeau M, Yeste A, Kumar D, Rangachari M, Zhu C, Xiao S, Seavitt J, Georgopoulos K, Kuchroo VK. «Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing Il2 expression.» 2012, *Nat Immunol*. ; 13(8):770-7.

Quirion MR, Gregory GD, Umetsu SE, Winandy S, Brown MA. «Cutting edge: Ikaros is a regulator of Th2 cell differentiation.» 2009, *J Immunol.* ;182(2):741-5.

Radtke F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., and Aguet, M. « Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. » 1999 *Immunity* 10, 547-558.

Rebollo A, Ayllón V, Fleischer A, Martínez CA, Zaballos A « The association of Aiolos transcription factor and Bcl-xL is involved in the control of apoptosis. », 2001 *J Immunol.* ; 167(11):6366-73.

Rebollo A, Schmitt C. « Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. », 2003 *Immunol Cell Biol.* ; 81(3):171-5. Review.

Rodriguez R, Meuth M. «Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress.» 2006, *Mol Biol Cell.* ;17(1):402-12.

Rolink A, Karasuyama H, Haasner D, Grawunder U, Mårtensson IL, Kudo A, Melchers F « Two pathways of B-lymphocyte development in mouse bone marrow and the roles of surrogate L chain in this development. », 1994 *Immunol Rev.* ; 137:185-201. Review.

Romero F, Martínez-A C, Camonis J, Rebollo A. « Aiolos transcription factor controls cell death in T cells by regulating Bcl-2 expression and its cellular localization. » 1999, *EMBO J.* 1999 Jun 15; 18(12):3419-30.

Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, Duenas J, So L, Yi L, Ziltener HJ. « Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. » 2005, *Nat Immunol.* 2005 Jun; 6(6):626-34.

Rothenberg EV. « Decision by committee: new light on the CD4/CD8-lineage choice. » 2009, *Immunol Cell Biol.* ; 87(2):109-12.

Saint-Ruf C, Ungewiss K, Groettrup M, Bruno L, Fehling HJ, von Boehmer H. « Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. » 1994, *Science.* ; 266(5188):1208-12.

Sambandam A, Maillard I, Zediak VP, Xu L, Gerstein RM, Aster JC, Pear WS, Bhandoola A. « Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. », 2005 *Nat Immunol.* 2005 Jul; 6(7):663-70.

Schilham MW, Wilson A, Moerer P, Benaissa-Trouw BJ, Cumano A, Clevers HC. « Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. », 1998 *J Immunol.* ; 161(8):3984-91.

Serre K, Bénézech C, Desanti G, Bobat S, Toellner KM, Bird R, Chan S, Kastner P, Cunningham AF, MacLennan IC, Mohr E. «Helios is associated with CD4 T cells differentiating to T helper 2 and follicular helper T cells in vivo independently of Foxp3 expression.» 2011, *PLoS One.* ; 6(6):e20731.

Song C, Li Z, Erbe AK, Savic A, Dovat S. «Regulation of Ikaros function by casein kinase 2 and protein phosphatase 1.» 2011, World J Biol Chem. ; 2(6):126-31.

Spangrude GJ, Aihara Y, Weissman IL, Klein J. «The stem cell antigens Sca-1 and Sca-2 subdivide thymic and peripheral T lymphocytes into unique subsets.» 1988, J Immunol. 141(11):3697-707.

Sridharan R, Smale ST. «Predominant interaction of both Ikaros and Helios with the NuRD complex in immature thymocytes. », 2007 J Biol Chem. ; 282(41):30227-38.

Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T, Sakaguchi S. «Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis.» 2006, Int Immunol. ; 18(8):1197-209.

Sun L, Liu A, Georgopoulos K. «Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development.» 1996, EMBO J. ; 15(19):5358-69.

Swat W, Shinkai Y, Cheng HL, Davidson L, Alt FW. «Activated Ras signals differentiation and expansion of CD4+8+ thymocytes.» 1996, Proc Natl Acad Sci U S A. ; 93(10):4683-7.

Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. «A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment.» 2000, Cell. ; 100(6):655-69.

Tabayashi T, Ishimaru F, Takata M, Kataoka I, Nakase K, Kozuka T, Tanimoto M. «Characterization of the short isoform of Helios overexpressed in patients with T-cell malignancies.» 2007, Cancer Sci. ; 98(2):182-8.

Taghon T, Yui MA, Pant R, Diamond RA, Rothenberg EV. «Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus.» 2006, Immunity. ; 24(1):53-64.

Taghon T, Yui MA, Rothenberg EV. «Mast cell lineage diversion of T lineage precursors by the essential T cell transcription factor GATA-3.» 2007, Nat Immunol. ; 8(8):845-55.

Takanashi M, Yagi T, Imamura T, Tabata Y, Morimoto A, Hibi S, Ishii E, Imashuku S. «Expression of the Ikaros gene family in childhood acute lymphoblastic leukaemia.» 2002, Br J Haematol. ; 117(3):525-30.

Tanaka S, Suto A, Iwamoto T, Kashiwakuma D, Kagami S, Suzuki K, Takatori H, Tamachi T, Hirose K, Onodera A, Suzuki J, Ohara O, Yamashita M, Nakayama T, Nakajima H. «Sox5 and c-Maf cooperatively induce Th17 cell differentiation via ROR γ t induction as downstream targets of Stat3.» 2014, J Exp Med. ; 211(9):1857-74.

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

- Thomas RM**, Chen C, Chunder N, Ma L, Taylor J, Pearce EJ, Wells AD. «Ikaros silences T-bet expression and interferon-gamma production during T helper 2 differentiation.» 2010, J Biol Chem. ; 285(4):2545-53.
- Thompson EC**, Cobb BS, Sabbattini P, Meixlsperger S, Parelho V, Liberg D, Taylor B, Dillon N, Georgopoulos K, Jumaa H, Smale ST, Fisher AG, Merkenschlager M. « Ikaros DNA-binding proteins as integral components of B cell developmental-stage-specific regulatory circuits.» 2007, Immunity. ; 26(3):335-44.
- Thornton AM**, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM. «Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells.» 2010, J Immunol. ; 184(7):3433-41
- Tourigny MR**, Mazel S, Burtrum DB, Petrie HT. «T cell receptor (TCR)-beta gene recombination: dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny.» 1997, J Exp Med. ; 185(9):1549-56.
- Trinh LA**, Ferrini R, Cobb BS, Weinmann AS, Hahm K, Ernst P, Garraway IP, Merkenschlager M, Smale ST. «Down-regulation of TDT transcription in CD4(+)CD8(+) thymocytes by Ikaros proteins in direct competition with an Ets activator.» 2001, Genes Dev. ; 15(14):1817-32.
- Tydell CC**, David-Fung ES, Moore JE, Rowen L, Taghon T, Rothenberg EV. «Molecular dissection of prethymic progenitor entry into the T lymphocyte developmental pathway.» 2007, J Immunol. ; 179(1):421-38.
- Umetsu SE**, Winandy S. «Ikaros is a regulator of Il10 expression in CD4⁺ T cells.» 2009, J Immunol. ; 183(9):5518-25.
- Urbánek P**, Wang ZQ, Fetka I, Wagner EF, Busslinger M. «Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP.» 1994, Cell. ; 79(5):901-12.
- Verhagen J**, Wraith DC. « Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells".» 2010, J Immunol. ; 185(12):7129
- Voll R.E.**, Jimi E., Phillips R.J., Barber D.F., Rincon M., Hayday A.C., Flavell R.A., Ghosh S. «NF- κ B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T cell development. » 2000, Immunity 13, 677–689.
- von Boehmer H**, Aifantis I, Azogui O, Saint-Ruf C, Grassi F. «The impact of pre-T-cell receptor signals on gene expression in developing T cells.» 1999, Cold Spring Harb Symp Quant Biol.; 64:283-9.

Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. «CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen.»2000, J Immunol.; 164(6):2978-86.

Wang JH, Nichogiannopoulou A, Wu L, Sun L, Sharpe AH, Bigby M, Georgopoulos K. « Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. » 1996, Immunity. ; 5(6):537-49.

Wang JH, Avitahl N, Cariappa A, Friedrich C, Ikeda T, Renold A, Andrikopoulos K, Liang L, Pillai S, Morgan BA, Georgopoulos K. «Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state.» 1998, Immunity. ; 9(4):543-53.

Wang R, Guo G, Li H, Li X, Yu Y, Li D. «Overexpression of Aiolos in Nalm-6 acute lymphoblastic leukaemia cells reduces apoptosis by suppressing phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 and activating the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signalling pathway.»2015, Mol Med Rep. ; 11(5):3457-64.

Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP 4th, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. «Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia.» 2004, Science. ; 306(5694):269-71.

Williams CB, Engle DL, Kersh GJ, Michael White J, Allen PM. «A kinetic threshold between negative and positive selection based on the longevity of the T cell receptor-ligand complex.»1999, J Exp Med. ; 189(10):1531-44.

Wilson A, Held W, MacDonald HR. «Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes.»1994, J Exp Med. ; 179(4):1355-60.

Winandy S, Wu P, Georgopoulos K. «A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma.»1995, Cell. ; 83(2):289-99.

Wong LY, Hatfield JK, Brown MA. «Ikaros sets the potential for Th17 lineage gene expression through effects on chromatin state in early T cell development.» 2013, J Biol Chem. ; 288(49):35170-9.

Wu L, Antica M, Johnson GR, Scollay R, Shortman K. «Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus.»1991, J Exp Med.; 174(6):1617-27.

Wu L, Li CL, Shortman K. «Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny.»1996, J Exp Med. ; 184(3):903-11.

Wu L, Nichogiannopoulou A, Shortman K, Georgopoulos K. «Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage.»1997, Immunity.; 7(4):483-92.

Wu L. «T lineage progenitors: the earliest steps en route to T lymphocytes.» 2006, Curr Opin Immunol. ; 18(2):121-6.

Yannoutsos N, Wilson P, Yu W, Chen HT, Nussenzweig A, Petrie H, Nussenzweig MC. «The role of recombination activating gene (RAG) reinduction in thymocyte development in vivo.» 2001, *J Exp Med.* ; 194(4):471-80.

Yap WH, Yeoh E, Tay A, Brenner S, Venkatesh B. «STAT4 is a target of the hematopoietic zinc-finger transcription factor Ikaros in T cells.» 2005, *FEBS Lett.* ; 579(20):4470-8.

Yücel R, Karsunky H, Klein-Hitpass L, Mörröy T. «The transcriptional repressor Gfi1 affects development of early, uncommitted c-Kit⁺ T cell progenitors and CD4/CD8 lineage decision in the thymus.» 2003, *J Exp Med.* ; 197(7):831-44.

Zabransky DJ, Nirschl CJ, Durham NM, Park BV, Ceccato CM, Bruno TC, Tam AJ, Getnet D, Drake CG. «Phenotypic and functional properties of Helios⁺ regulatory T cells.» 2012, *PLoS One.* ; 7(3):e34547.

Zhang Z, Swindle CS, Bates JT, Ko R, Cotta CV, Klug CA. «Expression of a non-DNA-binding isoform of Helios induces T-cell lymphoma in mice.» 2007, *Blood.* ; 109(5):2190-7.

Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, Easton J, Chen X, Wang J, Rusch M, Lu C, Chen SC, Wei L, Collins-Underwood JR, Ma J, Roberts KG, Pounds SB, Ulyanov A, Becksfort J, Gupta P, Huether R, Kriwacki RW, Parker M, McGoldrick DJ, Zhao D, Alford D, Espy S, Bobba KC, Song G, Pei D, Cheng C, Roberts S, Barbato MI, Campana D, Coustan-Smith E, Shurtleff SA, Raimondi SC, Kleppe M, Cools J, Shimano KA, Hermiston ML, Doulatov S, Eppert K, Laurenti E, Notta F, Dick JE, Basso G, Hunger SP, Loh ML, Devidas M, Wood B, Winter S, Dunsmore KP, Fulton RS, Fulton LL, Hong X, Harris CC, Dooling DJ, Ochoa K, Johnson KJ, Obenauer JC, Evans WE, Pui CH, Naeve CW, Ley TJ, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Mullighan CG. «The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia.» 2012, *Nature.* ; 481(7380):157-63.

Zhang L, Zhao Y. «The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road.» 2007, *J Cell Physiol.* ; 211(3):590-7. Review.

Zheng W and Flavell RA., «The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells.» 1997, *Cell.* 1997 May 16; 89(4):587-96.

Zhuang Y, Li D, Fu J, Shi Q, Lu Y, Ju X. «Overexpression of AIOLOS inhibits cell proliferation and suppresses apoptosis in Nalm-6 cells.» 2014, *Oncol Rep.* ; 31(3):1183-90.