

Université de Montréal

**Étude de l'interaction Ikaros/voie de signalisation Notch au  
cours de l'érythropoïèse**

par  
Lionel Mavoungou

Département Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en Sciences Biomédicales  
option Générale

Septembre, 2014

© Lionel Mavoungou, 2014

## Résumé

Tout au long de la vie d'un individu, il existe un nombre optimal de cellules à produire et de progéniteurs à conserver en réserve. On parle de maintien de l'homéostasie tissulaire. De façon générale, l'organisme a cinq possibilités pour réguler l'homéostasie : l'autorenouvellement et la quiescence, souvent utilisés pour maintenir un 'pool' fonctionnel de progéniteurs, la différenciation qui permet de produire des cellules effectrices, l'apoptose et la sénescence, qui permettent de limiter la production de cellules ou encore d'en faire diminuer le nombre quand elles sont en excès. La régulation de ces quatre mécanismes peut se faire de façon extrinsèque en passant par différentes voies de signalisation combinées à l'action intrinsèque de facteurs de transcription comme Ikaros et GATA1. Le facteur de transcription Ikaros joue un rôle critique dans le devenir des cellules progénitrices et la différenciation des lignages hématopoïétiques. Cependant, il demeure surtout connu pour son influence sur la voie Notch dans les cellules lymphoïdes, notamment les lymphocytes T. Les cellules érythroïdes sont hautement sensibles à l'environnement et donc, particulièrement adaptées à l'étude des régulations de l'homéostasie. Les résultats de différentes études ont permis de démontrer qu'Ikaros et la voie Notch influencent l'érythropoïèse. Cependant le détail de leurs actions demeure en grande partie inconnu à ce jour.

Au cours de notre étude nous avons voulu déterminer l'action d'Ikaros dans le maintien de l'homéostasie des cellules érythroïdes et si son rôle passe par un dialogue avec la voie Notch. Nous avons voulu décrypter les mécanismes de régulation transcriptionnelle utilisés par Ikaros et par Notch au cours de l'érythropoïèse et leurs effets.

Notre étude montre qu'Ikaros réprime à l'aide de GATA1 le gène *Hes1*, une cible importante de la voie Notch, en recrutant un complexe de la famille Polycomb, le PRC2

(Polycomb Repressive Complex 2). Cette répression permet la promotion de la différenciation des cellules érythroïdes.

Au niveau du maintien de l'homéostasie par régulation de l'apoptose, Ikaros est connu pour cibler l'anti-apoptotique *Bcl211* dans les lymphocytes. Puisque Gata-1, partenaire préférentiel d'Ikaros cible *Bcl211* dans les cellules érythroïdes, nous avons caractérisé leur effet sur l'expression de *Bcl211*. Nous avons découvert qu'Ikaros active de façon directe *Bcl211* et qu'il recrute sur le gène deux complexes partenaires d'élongation : un de la famille SET1/MLL, et le complexe P-TEFb-NuRD. En l'absence d'Ikaros, le fragment intracellulaire de Notch (NICD) et son cofacteur RBP-J $\kappa$  remplacent Ikaros et favorisent l'hyper-activation de l'expression de *Bcl211*. Ceci est associé à la modification du complexe d'élongation recruté, ainsi qu'à la mise en place de modifications épigénétiques distinctes de celles observées avec Ikaros ce qui modifie l'élongation transcriptionnelle du gène.

Ikaros et Notch sont fréquemment mutés ou présentent des fonctions altérées dans les leucémies. Notre étude montre un dialogue Ikaros/Notch influençant aussi bien la différenciation que l'apoptose et met en évidence l'existence d'un circuit génétique dont le dérèglement pourrait favoriser l'apparition d'une hématopoïèse maligne.

**Mots-clés** : transcription, homéostasie, érythropoïèse, Ikaros, Notch, épigénétique

## Abstract

Throughout the life of an individual, there is an optimal count of cells to produce and progenitors to conserve in stock. This is the tissue homeostasis maintenance. In a general fashion the organism has five means to regulate the homeostasis. Self-renewal and quiescence, often used in order to maintain a functional progenitors pool. Differentiation enhances effector cells production. Apoptosis and senescence can limit cell production and reduce cell number in case of excess. These regulation mechanisms can be performed in an extrinsic fashion using different signaling pathways combined with the action of transcription factors like Ikaros and GATA1. The transcription factor Ikaros is critical for progenitor cells fate and hematopoietic lineages differentiation. However, Ikaros is mostly known for its influence on Notch signaling in lymphoid cells, notably T lymphocytes. Erythroid cells are highly sensitive to the environment thus, particularly adapted to study homeostasis maintenance regulation. Results obtained in different studies showed Ikaros and Notch signaling influencing erythropoiesis. However, the detail of their effect remains mainly unknown to day.

Our aim was to determine Ikaros effect on erythroid cells homeostasis maintenance and if its role involved a cross-talk with Notch signaling. We will decipher transcription regulation mechanisms used by Ikaros and Notch during erythropoiesis and their effects.

We show Ikaros uses GATA1 to repress *Hes1*, a major Notch target by recruiting a Polycomb family complex, the PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2). This repression promotes erythroid cells differentiation.

At the apoptosis mediated control of homeostasis level, Ikaros is known to target *Bcl2l1* in lymphocytes. As GATA1, Ikaros preferential partner, targets *Bcl2l1* in erythroid cells, we assessed their effect on *Bcl2l1* expression. We discovered Ikaros directly activates *Bcl2l1*

and recruits two elongation associated complexes: one from SET1/MLL complex family, and the P-TEFb-NuRD complex. In the absence of Ikaros, the intracellular fragment of Notch (NICD) and its cofactor RBP-J $\kappa$  replace Ikaros and favors *Bcl2l1* overactivation. This is associated with a switch of recruited elongation associated complex and the establishment of distinct epigenetic modifications from those observed with Ikaros, which modifies the gene transcriptional elongation.

Ikaros and Notch are frequently mutated or present altered functions in leukemia. Our works present an Ikaros/Notch cross-talk influencing as well differentiation as apoptosis and reveal the existence of a genetic circuit for which a malfunction could favor hematologic disorders.

**Keywords** : transcription, homeostasis, erythropoiesis, Ikaros, Notch, epigenetics

# Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Table des matières</b>	<b>v</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des abbréviations</b>	<b>viii</b>
<b>Remerciements</b>	<b>x</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>1</b>
1.1- La cellule, l'information génétique et son environnement	1
1.1-1. La biologie de la cellule	1
1.1-2. La transcription	3
1.1-3. Biologie intégrative : l'homéostasie	18
1.2- Ikaros	27
1.2-1. Découverte et structure	27
1.2-2. Ikaros et l'hématopoïèse	31
1.2-3. Ikaros et ses associés	33
1.2-4. Ikaros et élongation transcriptionnelle	35
1.3- La voie de signalisation Notch	36
1.3-1. Un centenaire	36
1.3-2. Détail de la voie Notch	37
1.3-3. Notch durant l'hématopoïèse	40
1.3-4. Notch et leucémies	41
1.3-5. Hes1, une cible principale de la voie canonique de Notch dans les cellules hématopoïétiques	42
1.3-6. Notch dans la différenciation érythroïde	43
1.3-7. Ikaros vs. Notch	43
1.4- Hypothèses et objectifs	44
1.4-1. Hypothèses	44
1.4-2. Objectifs	45
<b>2. Résultats. Article 1</b>	<b>47</b>

Abstract	49
Introduction	50
Material and methods	52
Results	57
Discussion	66
References	71
Figure legends	80
<b>3. Résultats. Article 2</b>	<b>103</b>
Abstract	105
Introduction	106
Results and discussion	109
Material and methods	121
Figure legends	126
References	133
<b>4. Discussion</b>	<b>159</b>
4.1- L'interaction Ikaros/Notch	160
4.2- L'interaction Ikaros/Notch dans la différenciation	161
4.3- L'interaction Ikaros/Notch dans la régulation de l'apoptose	162
4.4- La régulation génique médiée par Ikaros	163
4.5- Ikaros et plasticité cellulaire	166
<b>5. Conclusion</b>	<b>171</b>
<b>Références</b>	<b>173</b>

# Liste des figures

## Introduction

FIGURE 1 : Structure d'un gène eucaryote	5
FIGURE 2 : Le cycle de la Polymerase II	9
FIGURE 3 : La chromatine en activation et en repression transcriptionnelle	16
FIGURE 4 : L'homéostasie	20
FIGURE 5 : L'érythropoïèse définitive	22
FIGURE 6 : L'érythropoïétine (EPO)	23
FIGURE 7 : Ikaros et ses isoformes	30
FIGURE 8: La voie Notch	40

## Discussion

FIGURE 1 : Schéma représentant la régulation génique par Ikaros	170
---	-----



## Liste des abréviations

ARNm= ARN messenger

Cpn= Camptothecin

DRB= 5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole

DSIF= DRB-Sensitivity Inducing Factor

EZH2 = Enhancer of Zeste 2

FVP = Flavopiridol

Gfi1b= Growth Factor Independent 1b

HES1 = Hairy Enhancer of Split 1

Kb= Kilopaires de bases

MLL= Mixed Lineage Leukemia

NELF= Negative Elongation Factor

NuRD = Nucleosome Remodeling Deacetylase

ORF = Open Reading Frame (Cadre Ouvert de Lecture)

P-TEFb = Positive Transcription Elongation Factor b

Pb = paires de bases

PRC2 = Polycomb Repressive Complex 2

RBBP5= Retinoblastoma-Binding Protein 5

SEC = Super Elongation Complex

TSS= Transcriptional Start Site (Point d'initiation de la transcription)

*Pour Maud*

# Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes ayant permis à cette thèse d'aboutir.

Pour commencer je voudrais remercier les membres de mon équipe qui ont joué un rôle essentiel à ma formation et à l'aboutissement de ce projet. Tout d'abord je voudrais remercier mon directeur de thèse, le Dr Éric Milot pour son encadrement, son support, son dévouement et la confiance qu'il m'a portée. La qualité de la formation qu'il m'a accordée peut être considérée comme exceptionnelle et je m'estime fier d'avoir pu faire mon doctorat dans son laboratoire. Je tiens aussi à remercier mes collègues, le Dr Stefania Bottardi pour son support quotidien et sa participation à ma formation, ainsi que mes autres partenaires, Farah Zmiri pour son aide en tant que collègue et amie, Helen Pak qui m'a beaucoup aidé dans les derniers stades de ce doctorat, Yahia Lakehal pour son apport quotidien, ainsi que Julie Ross, dont j'ai pris la suite pour ce projet.

Je remercie aussi les membres du centre de recherche m'ayant aidé à faire avancer ce projet, avec une mention particulière au Dr Driss El Kebbir, pour son aide concernant les essais d'apoptose et son support. Je remercie aussi Martine à la cytométrie et le personnel de l'animalerie.

Je remercie ma conjointe pour le soutien, essentiel, qu'elle m'a apporté pendant l'ensemble de mon doctorat. Je remercie aussi ma famille sans qui rien de tout cela n'aurait pu se produire. Pour leur support quand j'ai voulu venir dans l'équipe du Dr Milot, et pendant la progression de mon projet.

Enfin je remercie les membres de mon jury, qui prennent une partie de leur temps pour évaluer mon projet.

# **Chapitre 1 : Introduction.**

## **1.1- La cellule, l'information génétique et son environnement**

### **1.1.1- La biologie de la cellule**

La cellule représente l'unité de base de l'organisme (1). Sa structure permet de distinguer les trois grands groupes existants du vivant : les procaryotes, les archées et les eucaryotes (2). La cellule eucaryote se compose d'une membrane plasmique qui est sa frontière avec l'environnement extérieur, d'un cytoplasme contenant toutes les organelles nécessaires à son fonctionnement, et enfin de l'élément qui la distingue des procaryotes et des archées, un noyau, contenant la macromolécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) portant toute l'information nécessaire au fonctionnement et à la transmission des caractères héréditaires de la cellule lors de la mitose ou de la méiose, son matériel génétique (3).

#### L'ADN et la régulation génique

Structurellement la molécule d'ADN est un polymère de bases azotées, les nucléotides, qui sont au nombre de quatre : dATP, dGTP, dCTP, dTTP (4). Ces derniers se suivent pour former un brin d'ADN de l'extrémité 5', le début, à l'extrémité 3', la fin de la séquence. La molécule d'ADN est composée de 2 brins anti-parallèles : le nucléotide en 5' d'un brin va s'apparier au nucléotide en 3' de l'autre. Ces deux brins s'apparient via des liaisons hydrogène entre les bases opposées sur les brins. Les dATP lient les dTTP et les dCTP lient les dGTP. Les brins appariés forment une structure en double hélice, caractéristique de la molécule d'ADN. La séquence de bases sur un brin est l'élément clé de l'information transmise par la molécule d'ADN (5). Elle permet aussi de distinguer différentes régions du génome, qui peuvent être

définies comme les éléments du matériel génétique d'un individu. Le génome est composé de régions codantes, correspondant aux gènes donnant l'information sur les caractères héréditaires, et les non codantes, liées généralement à la structure du génome. Dans le noyau, le génome est réparti en chromosomes, qui sont les macromolécules d'ADN portant différents gènes sur chacun d'entre eux. Les gènes sont le support de l'information génétique (6). La séquence de nucléotides sur un gène est un message qui à terme, donnera soit un Acide Ribonucléique codant une protéine (ARNm) soit un ARN non codant (ARNnc) mais avec une fonction précise et nécessaire à la survie et à la croissance de la cellule (7).

### Structure du génome

Dans le noyau, les molécules d'ADN sont compactées en chromosomes. Cette compaction se fait par l'enroulement des molécules d'ADN sur les nucléosomes, qui sont des octamères de protéines, les histones. Chaque nucléosome est enroulé par approximativement 146 paires de bases (pb), cependant, le nombre de pb entre chaque nucléosome est variable et dépend du niveau de compaction de l'ADN et des molécules l'entourant. La somme de l'ADN et des protéines qui lui sont associées correspond à la chromatine, et ses différents degrés de compaction, vont influencer l'état d'activation des gènes qui s'y retrouvent. De façon générale, les gènes sont transcrits en ARNm avant d'être éventuellement traduits en protéines effectrices. On compte de 20000 à 25000 gènes dans le génome de la plupart des mammifères. Chaque cellule d'un organisme porte le même matériel génétique, mais doit exercer une fonction précise dépendamment de son environnement. Pour répondre à ce besoin, une grande partie des gènes agit en réponse aux signaux fournis par l'organisme (8).

## 1.1.2- La transcription

### 1.1.2.a. Les gènes

#### - Structure d'un gène

La transcription, processus permettant d'obtenir un ARNm à partir de la séquence d'ADN d'un gène, est le niveau le plus précis de régulation génique. L'activité transcriptionnelle est l'élément distinguant un gène activé d'un autre, réprimé. Généralement, les gènes codant pour des protéines d'eucaryotes présentent des éléments de base en commun. En 5' du point d'initiation de la transcription (Transcriptional Start Site; TSS) se trouvent des séquences minimales requises pour la régulation de la transcription qui, ensemble, forment le promoteur proximal du gène. D'autres régions, distales du TSS sont nommées enhancers, et participent avec le promoteur proximal à la régulation du niveau d'expression du gène. C'est à partir du TSS que débute l'unité de transcription (Transcription Unit) du gène. Cette zone du gène est transcrite et se termine par la séquence de terminaison de transcription (Figure1).

#### i. Le promoteur

Le promoteur d'un gène correspond à un agrégat des séquences régulatrices en 5', en cis du TSS. Généralement ces séquences sont situées à moins de 2kb du TSS. On distingue le promoteur basal, auquel s'associe la machinerie transcriptionnelle, des séquences cis-régulatrices, auxquelles s'associent des protéines exerçant une régulation de l'activité transcriptionnelle. Le promoteur basal s'étend sur environ 60 pb et chevauche le TSS. On y distingue fréquemment, mais pas systématiquement, 2 séquences régulatrices associées à la machinerie transcriptionnelle. La TATA box reconnue par le TFIID et l'élément de reconnaissance par TFIIB (BRE) reconnu par le TFIIB. Ces 2 éléments sont des facteurs

généraux de transcription qui favorisent le recrutement de l'ARN Polymérase II (Pol II). On y trouve aussi la séquence initiatrice (Inr ou élément initiateur) qui permet de situer le TSS (9).

#### ii. L'unité de transcription

L'unité de transcription possède différentes régions. Il existe un espace entre le +1 de transcription et le site d'initiation de la traduction. C'est une région non-traduite le 5'UTR (5' Untranscribed Region). Parallèlement à cela, en 3', il existe un espace où la transcription continue après le codon stop de traduction. C'est le 3'UTR (3' Untranscribed Region). À partir du codon ATG d'initiation de la traduction jusqu'au codon stop, se situe le cadre ouvert de lecture (Open Reading Frame; ORF). Il contient une alternance de séquences qui seront transcrites et traduites, les exons, et de séquences transcrites mais non traduites qui subiront l'épissage pour donner l'ARN mature.

#### iii. Les amplificateurs («enhancers»)

Les gènes encodant des protéines présentent un niveau de régulation d'expression particulièrement précis, et pouvant dépendre d'autres séquences que le promoteur basal. Ces séquences permettant la régulation génique sont les amplificateurs («enhancers»), parfois situés à plusieurs milliers de paires de bases du TSS. La particularité des séquences amplificatrices est leur localisation. Elles peuvent être en amont, en aval du gène voire même dans ses introns. On pourrait décrire un amplificateur comme une séquence de quelques centaines de paires de bases, et contenant une forte concentration de sites de liaison de facteurs régulant la transcription. Il est important de noter que, lorsque ces séquences recrutent des facteurs ou complexes protéiques amenant une répression transcriptionnelle, elles sont considérées comme des séquences inactivatrices («silencers»). Les amplificateurs et

inactivateurs peuvent exercer des interactions à longue distance avec le promoteur proximal et permettent le recrutement ou non de la machinerie de transcription (10).

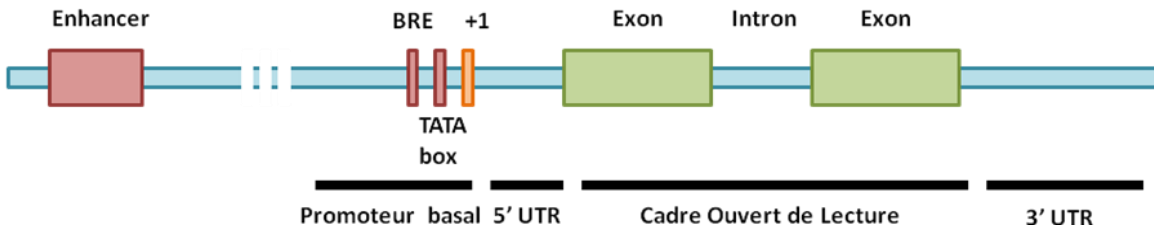


FIGURE 1 : STRUCTURE D'UN GÈNE D'EUCARYOTE

Exemple typique de structure d'un gène avec un amplificateur («enhancer») éloigné en 5' du gène portant une série de sites de liaison de facteurs de transcription, un promoteur proximal avec un BRE, une TATA box à proximité du +1 de transcription, deux exons qui seront traduits et un intron.

#### 1.1.2.b. L'ARN Polymérase II (ARN Pol II)

##### - Structure de l'ARN Pol II

L'ARN Pol II est responsable de la transcription des gènes codant des protéines et de certains ARNs non codants. Elle est considérée comme un complexe de douze sous-unités dont dix d'entre elles forment le noyau catalytique. La plupart d'entre elles participent au passage des acides nucléiques au sein du complexe protéique, à leur maintien dans un axe permettant la progression du complexe le long de la séquence d'ADN et à la réaction de polymérisation de l'ARN. Cette dernière réaction s'effectue notamment grâce à la plus grosse sous-unités du complexe, Rpb1, possédant un domaine C-Terminal (Pol II CTD), essentiel à la processivité du complexe (11). Le domaine CTD (contenant 52 répétitions de l'heptapeptide Y-S-P-T-S-P-S chez les mammifères) est en forme de queue et subit au cours du cycle de transcription des phosphorylations sur ses résidus de Sérine 2,5 et 7. Ce jeu de phosphorylations est très important pour le cycle de transcription, l'ARN Pol II devant, d'une part, être phosphorylée pour progresser le long des gènes, et d'autre part, être déphosphorylée pour être recyclée (11).



- Le cycle de la transcription : Mode d'action de l'ARN Pol II

i- L'initiation :

L'ARN Pol II a besoin de toute une batterie de protéines pour être fonctionnelle. On peut y distinguer deux groupes : Les facteurs généraux de transcription, qui participent à son recrutement, et le complexe Médiateur (Med) qui fait un pont entre les activateurs transcriptionnels et l'ARN Pol II, ce qui permet de moduler son activité (12).

Le recrutement de l'ARN Pol II peut être résumé comme suit : le facteur de transcription TFIID est recruté et reconnaît la TATA box du gène cible. La présence de TFIID sur la TATA box permet le recrutement du facteur TFIIB qui va donner l'orientation de l'ARN Pol II sur le gène. Ensuite vient le recrutement du facteur TFIIF avec l'ARN Pol II et le Médiateur, puis du TFIIE et TFIIH, une kinase pouvant à la fois phosphoryler le domaine CTD de l'ARN Pol II sur la Sérine 5 et avoir une activité hélicase, ce qui permet le « promoter clearance » c'est-à-dire le départ de l'ARN Pol II du promoteur (13). Tous ces facteurs sont des facteurs de transcription généraux. L'ARN Pol II avec le Médiateur et les facteurs de transcription généraux forment le Complexe de Préinitiation de la transcription (Preinitiation Complex ou PIC) (14). Une fois le PIC en place, la phosphorylation du CTD va « préparer » l'ARN Pol II pour l'étape suivante de la transcription, l'élongation.

ii- L'élongation :

L'élongation transcriptionnelle peut être divisée en deux étapes distinctes ; l'élongation précoce et l'élongation productive. L'élongation précoce peut être considérée comme l'étape entre le départ de l'ARN Pol II du promoteur et le point de départ de l'élongation productive (15). Initialement, quand l'ARN Pol II a transcrit moins de dix nucléotides, elle est toujours considérée comme étant en phase d'initiation. À ce stade elle est encore associée au TFIIB et

phosphorylée uniquement sur la Sérine 5 (par l'activité de TFIIH) de son CTD. Après dix nucléotides, le TFIIB est relâché et suite à la polymérisation de dix à cinquante nucléotides, l'ARN Pol II marque une pause. Cette pause est provoquée par le relâchement de TFIIH, puis au recrutement subséquent de deux éléments inhibant la progression de l'élongation ; le facteur inhibant l'élongation NELF (Negative Elongation Factor) et le complexe protéique DSIF (DRB Sensitivity Inducing Factor) composé des deux sous unités Spt4 et Spt5. Les facteurs de transcriptions généraux relâchés par l'ARN Pol II restent sur le promoteur pour servir de plateforme de recrutement de nouvelles ARN Pol II, recommençant le cycle d'initiation et d'élongation(15).

Une fois l'ARN Pol II en pause, deux possibilités se présentent. La poursuite de la synthèse d'ARN peut être avortée, ce qui est un moyen de réguler négativement l'expression d'un gène, si non, la transcription peut reprendre. On parle «d'échappée vers une élongation productive». Un élément essentiel à cette échappée est le recrutement de P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b) (16). Ce dernier est un complexe à activité kinase composé de deux sous unités ; soit la Cyclin-T1 (CycT1 ; 80% des complexes P-TEFb dans la cellule (17)) ou la Cyclin-T2 (20% des complexes P-TEFb dans la cellule (17)) et la Cyclin Dependant Kinase 9 (Cdk9). Le P-TEFb a la capacité de phosphoryler NELF (18) et DSIF (18, 19). Il est généralement accepté que ceci induit la transformation de DSIF en facteur d'élongation positif, et détache NELF de l'ARN Pol II (20, 21). Le P-TEFb reconnaît plus facilement l'ARN Pol II quand son domaine CTD présente de la Sérine 7 déjà phosphorylée (22). Cependant sa particularité est son aptitude à phosphoryler l'ARN Pol II CTD sur la Sérine 2, mais aussi sur la Sérine 5, ce qui rend la polymérase apte à poursuivre son élongation (23, 24). Dans le même temps, l'extrémité 5' de l'ARN en cours de production subit une modification

avec le dépôt d'une coiffe, correspondant à une guanine méthylée juste après son ajout. L'ajout de la coiffe 5' à l'ARN pré-messager est une étape nécessaire à la poursuite de l'élongation productive (25) (Figure 2).

La majorité du P-TEFb dans la cellule est inactif, car séquestré par le 7SK snRNP (26). Cependant il a été récemment démontré que le P-TEFb libéré et actif pouvait se trouver maintenu à l'ARN Pol II en pleine élongation dans des complexes de Super Élongation (Super Elongation Complex :SEC) (27). Alors, d'autres facteurs liés à la chromatine et à sa modification entrent en jeu et favorisent l'élongation de la transcription.

### iii- Les épissages des ARNs pré-messagers

Peu après la découverte des mécanismes d'épissage, des études ont permis de déterminer que l'épissage de l'ARN est aussi un mécanisme de régulation d'expression. En effet, en fonction du type cellulaire et/ou des conditions, pour un même gène, différents exons seront conservés dans l'ARN messenger (ARNm) et traduits. Ceci permet de donner naissance à différentes protéines à partir d'un seul gène. Ce mécanisme permettant de modifier la composition de l'ARNm d'un gène est appelé épissage alternatif (28). Il favorise la formation de différentes isoformes de protéines (28). Ce mécanisme de régulation est important biologiquement puisqu'environ 95% des gènes subissent des épissages alternatifs chez l'humain (29), ce qui permet de multiplier le nombre de protéines issues du transcriptome.

Il est admis qu'il existe un lien entre l'épissage des ARNs immatures et la progression de l'ARN Pol II. La polymérase interagit via son CTD avec les protéines des complexes d'épissages et pourrait leur permettre d'être recrutés aux sites d'épissages ("splicing") (30, 31). Le fait qu'il ait été observé que la perte de fonction de la machinerie d'épissage (spliceosome)

mène au blocage de l'ARN Pol II dans les introns (32), suggère que le « spliceosome » permet la mise en place d'une transcription associée à l'épissage (33).

#### iv- La terminaison :

Lorsque l'ARN Pol II arrive à la fin de l'unité de transcription, elle croise la séquence de terminaison du gène qui amène, à terme, un clivage de l'ARN messager (ARNm) immature suivi de l'ajout d'une queue poly-adénylée de quelques centaines de nucléotides (queue Poly-A). D'un point de vue mécanistique, sur l'ARNm immature une séquence de clivage formée par le dinucléotide CA est entourée par la séquence AAUAAA en amont qui sera reconnue par le complexe CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specific Factor), et la séquence DSE en aval (Downstream Element) qui sera reconnue par le complexe CstF (Cleavage stimulatory Factor) (34). Ces 2 complexes ainsi que l'ARN Pol II vont former le complexe de clivage qui va permettre de cliver l'ARNm immature et de détacher l'ARN Pol II de l'ADN. Suite à cela, une queue poly-A sera ajoutée et l'ARNm sera formée (35).

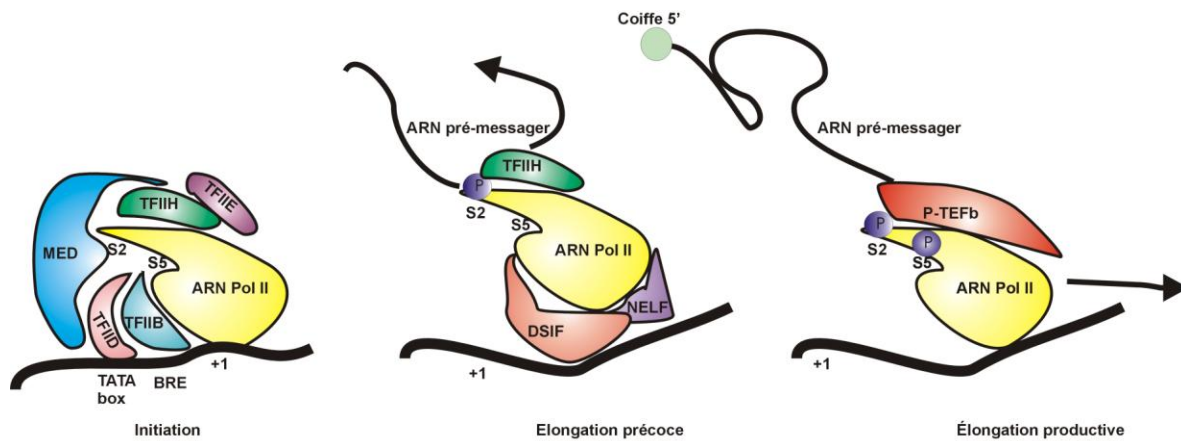


FIGURE 2 : LE CYCLE DE LA POLYMERASE II.

Schéma récapitulant les premières étapes de la transcription. À gauche l'initiation avec le recrutement des tous les facteurs de transcriptions généraux (TF), du médiateur et de L'ARN Pol II. Au milieu, l'élongation précoce avec la pause marqué par l'ARN Pol II associée à un relâchement de TFIIF, un recrutement des inhibiteurs d'élongation DSIF et NELF. À droite, l'élongation productive avec la mise de la coiffe 5' sur l'ARN précoce, le recrutement du P-

TEFb avec la phosphorylation du CTD de l'ARN Pol II sur les Sérines S2 et S5, et la progression de l'ARN Pol II le long du gène.

### 1.1.2.c- La régulation de l'activité transcriptionnelle

#### - Les facteurs de transcription

Les organismes multicellulaires se composent généralement de types cellulaires distincts. Chez les mammifères et notamment chez l'humain, on distingue plusieurs centaines de types cellulaires (36). Pour un type cellulaire donné un groupe très précis de gènes est activé, les autres sont réprimés. Autrement dit, pour un type cellulaire, il existe un «programme transcriptionnel» qui donne l'identité d'une cellule (37). Les protéines qui sont à la base de la mise en place des programmes transcriptionnels sont les facteurs de transcription spécifiques. Ils peuvent agir comme activateurs ou répresseurs des gènes dépendamment des contextes. Certaines voies de signalisation influencent les facteurs de transcription et différents récepteurs aux signaux extracellulaires deviennent des facteurs de transcription une fois activés par leur ligand (38). Cependant, une grande partie des facteurs de transcription agissent de façon intrinsèque. Une fois leur gène d'origine exprimé, leur présence dans le noyau va imposer un programme transcriptionnel. Généralement c'est une combinaison de facteurs de transcription qui définit l'identité cellulaire (37). Ils sont exprimés simultanément mais agissent par combinaisons sur leurs gènes cibles (39).

Les facteurs de transcription possèdent différents domaines protéiques typiques. Le plus caractéristique est le domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain : DBD) qui est essentiel à leur recrutement. Généralement, ils possèdent aussi un signal de localisation nucléaire (Nuclear Localization Domain : NLS). On retrouve aussi des domaines permettant les interactions avec des cofacteurs transcriptionnels, agissant avec les facteurs de

transcription mais n'ayant pas de domaine de liaison à l'ADN, mais aussi des domaines d'interaction avec des complexes modifiant la chromatine.

- Chromatine permissive vs chromatine répressive

La mise en place d'un programme transcriptionnel implique l'activation ou la répression de groupes de gènes. Cependant, de par sa structure, la chromatine peut être soit favorable ou défavorable à une activité transcriptionnelle. Pour être favorable à la transcription, l'organisation de la chromatine doit être relâchée, décompactée. Les nucléosomes doivent être associés moins fortement à l'ADN pour permettre à la machinerie transcriptionnelle de s'installer et de progresser. De façon générale, cette organisation de chromatine correspond à l'euchromatine. Par opposition, l'hétérochromatine est caractérisée par une organisation des nucléosomes qui est plus compacte et défavorable à la transcription. Dans l'euchromatine on distingue aussi des zones où la transcription est plus active qu'à d'autres, localisées en foci. Ces zones correspondent à des «usines de transcription» (Transcription Factories) (40). La régulation de la transcription par la modulation de la chromatine est le mécanisme principal de la régulation épigénétique des gènes.

- Le « code » des histones et les patrons de méthylation de l'ADN

Deux familles de modifications sont caractérisées comme essentielles à la régulation épigénétique de l'expression génique. Les modifications post-traductionnelles des histones et les modifications de l'ADN. Tandis que les modifications de l'ADN sont surtout associées aux mécanismes de répression transcriptionnelle, les modifications d'histones peuvent être associées à de l'activation comme à de la répression transcriptionnelle.

- i. Les modifications post-traductionnelles d'histones :

- L'acétylation des histones :

Effectuée par des enzymes à activité Histone Acétyl-Transférase (HAT), cette modification est associée à l'activité transcriptionnelle, et est retrouvée sur les histones H3 et H4 du nucléosome (41). Dans le détail, les histones sont chargées positivement tandis que l'ADN est chargé négativement, ce qui permet de maintenir un niveau d'affinité histones des nucléosomes/ADN. L'ajout d'un groupe Acétyl-, particulièrement au niveau des régions N-Terminales des histones, a pour effet d'annuler une charge positive de l'histone, ce qui diminue son affinité pour l'ADN et favorise le dépôt ou la progression de la machinerie transcriptionnelle (41). Les fonctions Acétyl- sont retirées par des enzymes Histone Désacétylases (HDAC). Par ailleurs, tout comme les autres modifications d'histones, l'ajout de groupes Acétyl- se fait sur des résidus spécifiques, les lysines (41). L'acétylation des histones participe à la mise en place du « code » des histones (42). Ce code correspond à la mise en place d'un patron de modifications post-traductionnelles des queues des histones, aboutissant à un état chromatinien responsable du niveau d'activation des gènes (42). Les Lysines acétylées des histones sont reconnues par les protéines possédant un « Bromodomain » (43). Les protéines ainsi recrutées pourraient à leur tour participer à l'organisation de la chromatine en favorisant le recrutement de complexes protéiques ayant la capacité d'induire d'autres modifications post-traductionnelles d'histones ou le remodelage de la chromatine. Ces protéines sont principalement celles de la famille des BRD (il y en a 52 chez l'humain (44)) dont BRD4 (43), qui lie les histones H3 et H4 acétylées (45), et participe à l'activation du P-TEFb (46), notamment en stimulant l'activité kinase de Cdk9 (47).

La méthylation des histones :

Les Histones H3 et H4 sont les principales concernées. Ce sont des enzymes Histone Méthyl Transférases (HMT) qui catalysent ces modifications. Contrairement à l'acétylation, la

méthylation des histones n'a pas d'effet biochimique direct sur l'interaction histone/ADN. Elle peut être associée aussi bien à de l'activation qu'à de la répression transcriptionnelle dépendamment du résidu méthylé. Tout comme pour l'acétylation des Lysines, la méthylation des Lysines et Arginines est reconnue par diverses protéines jouant un rôle dans le remodelage et la modification de la chromatine. Les groupes méthyl- sont retirés par des enzymes à activité Histone Déméthylase (48). Les histones méthylées sont reconnues par des protéines de remodelage de chromatine possédant des « chromodomains » (chromodomaines) (49). On compte parmi elles notamment Mi-2 $\alpha$  et Mi-2 $\beta$ , des protéines du complexe de remodelage de la chromatine Mi-2/NuRD (49). Il existe aussi des protéines présentant des « chromodomains » incomplet, qui n'ont pas de cage aromatique, et incapables de lier les histones ; les « chromo shadow domains » (50). C'est le cas de la protéine d'hétérochromatine HP1 pour laquelle le « chromo shadow domain » permet la dimérisation (51) et le recrutement d'autres protéines présentant le même domaine (52).

### 2.1.3. L'ubiquitylation des histones :

Elle peut se faire sur l'histone H1, connue sous le nom de « Linker Histone » et dont la présence est essentielle à la formation de certaines formes d'hétérochromatine (53). Son ubiquitylation par la sous-unité TAF<sub>II</sub>250 du TFIID favorise l'activité transcriptionnelle (54). On retrouve aussi de l'ubiquitylation sur les histones H2A (associée à de la répression) (55) et H2B (associée à de l'activation) (56).

#### Les autres modifications d'histones :

Les histones peuvent aussi être phosphorylées, ADP-ribosylées, ou encore sumoylées. Ces modifications présentent des effets spécifiques. La phosphorylation de H3 sur la Sérine 10 à



lieu aux phases G2/M du cycle cellulaire et participe à la compaction des chromosomes (57). L'ADP-rybosylation des histones par l'enzyme PARP-1 peut avoir lieu sur les histones H3, H4 et H2A/H2B et être associée à de l'activation transcriptionnelle (58). Enfin, la sumoylation de l'histone H4 par UBC-9 est associée à de la répression transcriptionnelle (59).

## ii. Impact des modifications sur la structure de la chromatine

Les études des modifications d'histones à l'échelle des génomes entiers par CHIP-seq ont révélé la présence de combinaisons de modifications d'histones associées à la chromatine. En fonction de ces combinaisons, se mettent en place des conformations de chromatine plus ou moins permissives ou restrictives pour la transcription. Il est considéré qu'il existe 3 types de chromatine dépendamment des modifications d'histones qu'on y retrouve. La chromatine répressive, la chromatine prête et la chromatine activée. Pour chacun de ces types de chromatine voici des combinaisons potentielles de modifications d'histones et de méthylation de l'ADN au promoteur et dans le cadre ouvert de lecture (Figure3) :

La chromatine répressive :

Au niveau des promoteurs deux marques épigénétiques associées à la répression sont caractéristiques ; la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), effectuée par le complexe répresseur Polycomb PRC2 (60), et la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3), déposée par G9a (61), ou SUV39H (H1 et H2) (62, 63) des histones méthyltransférases. Au niveau de la région codante des gènes réprimés, un fort enrichissement en H3K9me3 et H3K9me2 (lysine 9 di-méthylée) ainsi qu'en H3K27me3 est fréquemment détecté. Enfin sur les amplificateurs en situation répressive, les îlots CpG sont aussi généralement méthylés et les modifications du type H3K9me3 et H3K9me2 sont également détectables (42).

### La chromatine prête (primed chromatin):

Ce type de chromatine se distingue par la présence de modifications ayant des effets antagonistes. À titre d'exemple, sur différentes régions de régulation de gènes prêts, on retrouve une forme de chromatine que l'on nomme « bivalente ». Celle-ci est caractérisée par H3K27me<sub>3</sub>, mais aussi par une modification associée à une activité transcriptionnelle, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me<sub>3</sub>), modification effectuée par les complexes associés à l'élongation de la famille MLL (42). Ces complexes présentent une activité HMT (64) catalysant la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me<sub>3</sub>) (64). Cette modification épigénétique, conservée des levures aux mammifères, est fréquemment associée à une transcription active (64, 65). Située autour du site d'initiation de la transcription et s'étendant sur plusieurs kb (65), elle est le signe d'une élongation en cours sur le gène où on la retrouve (65). Chez les mammifères, on retrouve six complexes MLL associés à l'élongation. Ils peuvent être divisés en trois groupes : SETD1A/SETD1B, MLL1/MLL2, et MLL3/MLL4 (64).

Au niveau des amplificateurs, les combinaisons sont moins caractérisées, mais récemment, il a été montré que les complexes MLL3/4 de la famille MLL pouvaient y mono-métyler les H3K4 (H3K4me<sub>1</sub>) pour les gènes prêts à être activés (66).

### La chromatine active :

De façon générale, dans cette configuration, toutes les modifications associées à de la répression sont exclues. Au niveau des promoteurs, on détecte de l'H3K4me<sub>2</sub>, grâce aux complexes de la famille MLL (42) tandis que les histones H3 et H4 sont hyper-acétylées par des complexes à activité HAT comme CBP/P300 (42). Au niveau du cadre ouvert de lecture, les modifications observées sont la triméthylation de la lysine K36 de l'histone H3

(H3K36me3) par l'enzyme SETD2 (67, 68) et la diméthylation de la lysine 79 de l'histone H3 (H3K79me2) par DOT1L (69). Il est important de noter que ces deux modifications sont produites par des protéines reliées aux complexes facilitant l'élongation de la transcription ; le complexe FACT (Facilitates Chromatin Transcription) pour SETD2 (67, 70) et les complexes du type SEC (Super Elongation Complex) pour DOT1L (71). Au niveau des amplificateurs, on a un fort enrichissement en H3K4me1 et H3K4me2, et H3K27 acétylée (H3K27Ac) (42).

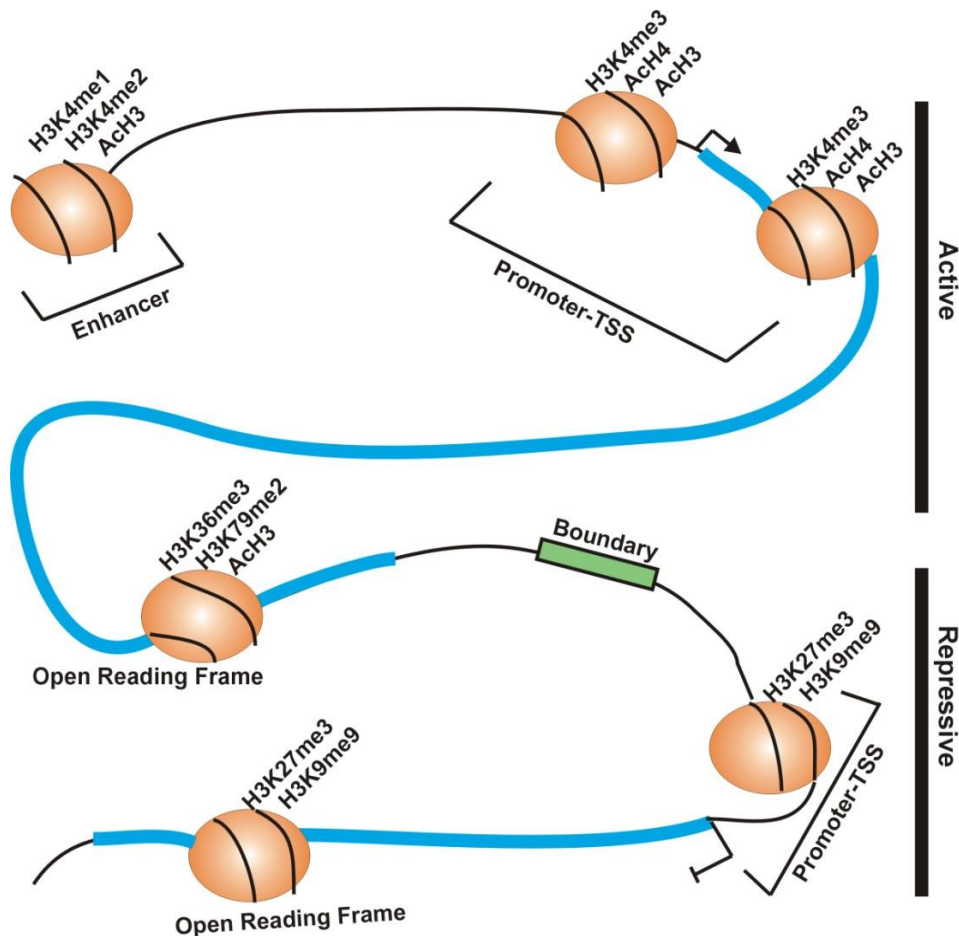


FIGURE 3 LA CHROMATINE EN ACTIVATION ET EN REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE

Schéma représentant différentes modifications épigénétiques usuellement retrouvées dans la chromatine d'un gène activé et d'un autre réprimé. Le gène activé présente des modifications épigénétiques caractéristiques de l'activation transcriptionnelle (H3K4me3, Acétylation, H3K36me3, H3K79me2) tandis que, le gène réprimé a des marques typiques de répression (H3K27me3, H3K9me3, hypo-acétylation).

#### iv - Les modifications de l'ADN :

##### La méthylation de l'ADN :

Chez les eucaryotes la méthylation de l'ADN se fait sur des séquences CpG groupées communément appelées «îlots CpG» (72). Ces îlots sont fréquemment situés au niveau des promoteurs mais peuvent aussi se trouver dans des séquences amplificatrices (72). C'est une modification particulièrement stable au cours des divisions cellulaires et souvent associée à la mémoire épigénétique des cellules (73). L'ajout du groupe méthyl- est effectué par des DNA-méthyltransferases (DNMT). Ces dernières peuvent agir au cours des mitoses pour maintenir la méthylation sur les cellules descendantes (DNMT1, DNMT3A), ou bien par l'ajout de novo de groupes méthyl- sur des îlots non méthylés au préalable (DNMT3B) (74, 75). Sauf situations exceptionnelles, comme récemment découvert (76), la méthylation de l'ADN est une modification associée à la répression (75). L'ADN méthylé peut être reconnu par des protéines de modification de chromatine agissant comme des répresseurs transcriptionnels et participer à la mise en place d'hétérochromatine dans le cas de gènes réprimés de façon définitive (77, 78).

##### L'hydroxyméthylation de l'ADN :

Modification suivant la méthylation, la découverte et la caractérisation de l'hydroxyméthylation de l'ADN sont encore récentes (79). L'hydroxyméthylation des CpG est la première étape de la déméthylation de l'ADN (79). Les enzymes responsables de sa formation sont les protéines de la famille TET (Ten Eleven Translocation) (80). On en compte trois chez les mammifères (TET1, TET2 et TET3) (80). Elles ont la capacité d'hydroxyler les cytosines méthylées, ce qui permet l'obtention de cytosines hydroxyméthylées qui après plusieurs intermédiaires catalysés en partie par les TETs,

deviendront des cytosines non méthylées. Les TETs permettent d'empêcher la méthylation définitive de leurs gènes cibles. On retrouve des hydroxyméthyl-cytosines sur des gènes aussi bien activés que réprimés (80, 81). Ce qui suggère un rôle aussi bien en situation d'activation (en empêchant la méthylation des îlots CpG) qu'en situation de répression. Il faut noter que des évidences d'interactions entre les protéines DNMTs, TETs et les complexes de modification d'histones suggèrent que les modifications d'histones et de l'ADN agissent de concert pour réguler l'expression des gènes.

### **1.1.3- Biologie intégrative : l'homéostasie**

#### 1.1.3.a- La cellule dans son environnement

La cellule, en tant qu'unité exerce une fonction nécessaire à la survie de l'organisme. Pour chaque système ou organe, un nombre précis de cellules est maintenu pour exercer une fonction donnée. C'est le maintien de l'homéostasie du système. L'homéostasie correspond à la capacité d'un organe ou d'un système de s'adapter aux besoins de l'organisme en ajustant ses processus physiologiques. Généralement, des signaux environnementaux prenant la forme d'hormones ou de voies de signalisation sont reçus par la cellule et vont, de façon directe ou indirecte, changer son programme transcriptionnel (le transcriptome) en activant et/ou réprimant des groupes de gènes précis, ce qui aboutit à la modification des processus physiologiques pour les adapter aux besoins de l'organisme (82).

#### 1.1.3.b- Homéostasie et cellules souches

L'essentiel des systèmes de l'organisme se développent et fonctionnent suivant le même procédé. Au cours du développement, des cellules souches émergent. Ces cellules vont ensuite passer par une étape d'expansion, puis de maintenance en se divisant de façon asymétrique.

Une des cellules filles garde son identité souche (on parle d'auto-renouvellement des cellules souches) tandis que l'autre se différencie en progéniteur (cellule partiellement différenciée), qui se différenciera en cellule qui, à terme, sera effectrice (83). À l'état adulte, les tissus possèdent toujours des cellules souches ainsi que des cellules progénitrices. Ces cellules agissent comme la réserve des tissus tout au long de la vie de l'organisme, et se divisent pour donner des cellules de plus en plus différenciées tout en gardant un pool constant de cellules souches (83).

Cependant la production de cellules effectrices doit être effectuée en fonction des besoins de l'organisme. C'est là que le maintien de l'homéostasie du tissu prend toute son importance. Comment agir en cas de hausse brutale du besoin en cellules différenciées après une blessure, ou autre stress? Pour répondre à ce type de difficultés, l'organisme régule l'homéostasie tissulaire en jouant principalement sur quatre aspects physiologiques : la prolifération cellulaire, la quiescence (mise en attente de la cellule), la différenciation et enfin la mort cellulaire (par apoptose ou sénescence). Un excès de production de cellules peut être un fardeau pour l'organisme en raison de l'énergie dépensée à leur production, leur surpopulation peut encombrer les tissus et les rendre inefficaces. Un excès de différenciation peut mener à l'appauvrissement en progéniteurs et éventuellement en cellules souches d'un compartiment cellulaire. Il en va de même pour une apoptose trop importante qui mène à une perte massive de cellules et donc une altération du fonctionnement du tissu atteint. Cependant une absence où un blocage de différenciation, est typique des leucémies avec une forte présence de blastes, qui sont en fait des cellules progénitrices. Une absence d'apoptose est aussi caractéristique des cancers, où des cellules deviennent insensibles aux signaux pro-apoptotiques de leur environnement (Figure 4).

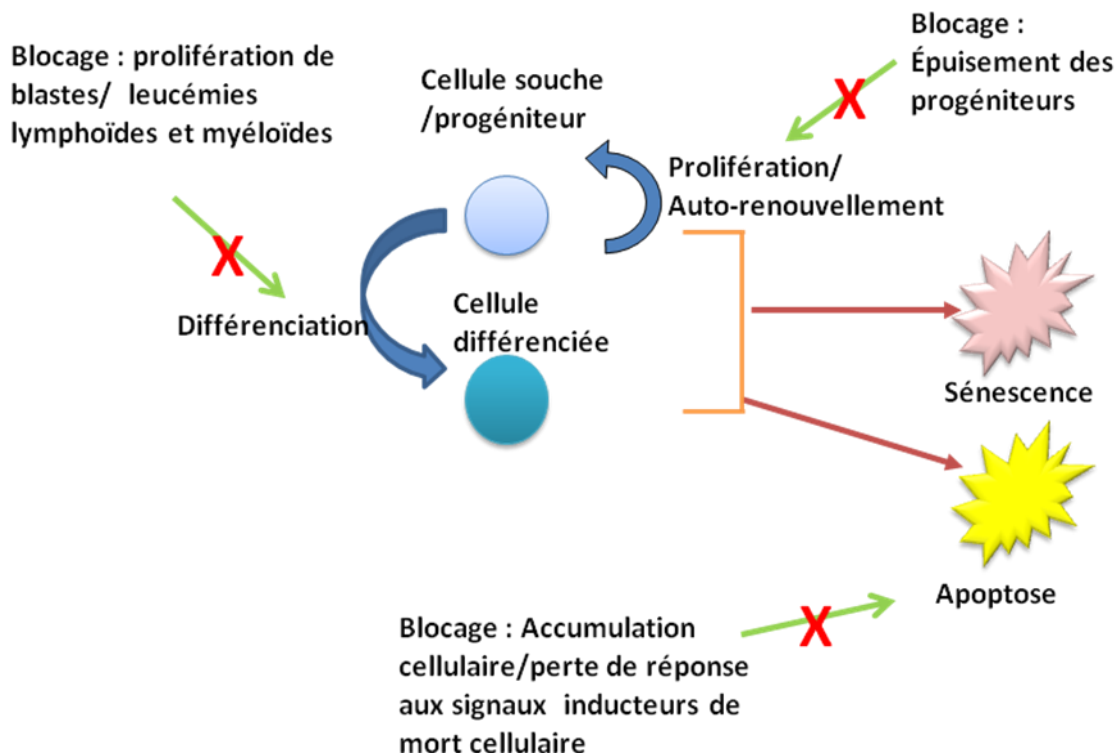


FIGURE 4 : L'HOMÉOSTASIE Schéma représentant l'importance du maintien de l'homéostasie d'un tissu ou d'un compartiment cellulaire. L'effet provoqué par le blocage des mécanismes de régulation homéostatique est présenté.

### 1.1.3.c- L'hématopoïèse

Les propriétés des cellules souches sont généralement acquises au cours du développement. L'étude de celles-ci se fait principalement chez la souris. La production de cellules hématopoïétiques se fait en deux vagues pendant le développement. Il y a d'abord la vague de l'hématopoïèse primitive, dans le sac vitellin, premier organe à produire des cellules hématopoïétiques à partir du stade E7.5 (7,5 jours *post coïtus* ou jour embryonnaire 7.5) (84, 85). Puis au niveau de la région Aorte-Gonade-Mésonephros (AGM) contenant l'aorte dorsale, l'émergence des cellules souches hématopoïétiques (CSH) adultes se produit à la seconde vague au stade E9.5 (86). Ensuite vient l'étape d'expansion des CSH qui vont migrer de l'AGM au foie fœtal, s'y expandre et y résider du stade E11.5 au stade E18 (87, 88). Suite à

cela, elles vont principalement migrer vers la moelle osseuse pour y résider toute la vie adulte de la souris (89).

#### 1.1.3.d- L'érythropoïèse

##### - Le maintien de l'homéostasie pendant l'érythropoïèse

Notre étude utilise pour modèle l'érythropoïèse, le processus menant à la fabrication de globules rouges, distribuant l'oxygène aux tissus de l'organisme. Sa caractérisation au niveau physiologique a été particulièrement bien détaillée (90). Les cellules souches hématopoïétiques donnent des progéniteurs multipotents précoces (MPP), qui à leur tour donneront des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) et des progéniteurs myéloïdes communs (CMP). Ces derniers seront convertis en progéniteurs mégakaryocytaires/érythroïdes (MEP). En présence d'érythropoïétine (EPO), les MEP se différencieront en progéniteurs érythroïdes, les BFU-E (Burt Forming Unit-Erythroid), qui vont passer par plusieurs états de différenciation : CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid), proérythroblastes, basophiles, orthochromatiques. Après énucléation les réticulocytes seront obtenus et ces derniers deviendront les globules rouges circulants qui vivront approximativement 120 jours (90) (Figure 5).

Le système érythroïde est très sensible à son environnement. Le maintien de l'homéostasie érythroïde est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme car en cas de perte abondante de sang, ou encore en altitude où l'oxygène se fait rare, l'organisme va avoir besoin d'augmenter sa production de globules rouges. Il existe chez les mammifères différents moyens de sentir les besoins de l'organisme et de s'y adapter dont la signalisation de l'érythropoïétine (EPO), la voie la plus caractérisée de l'érythropoïèse.



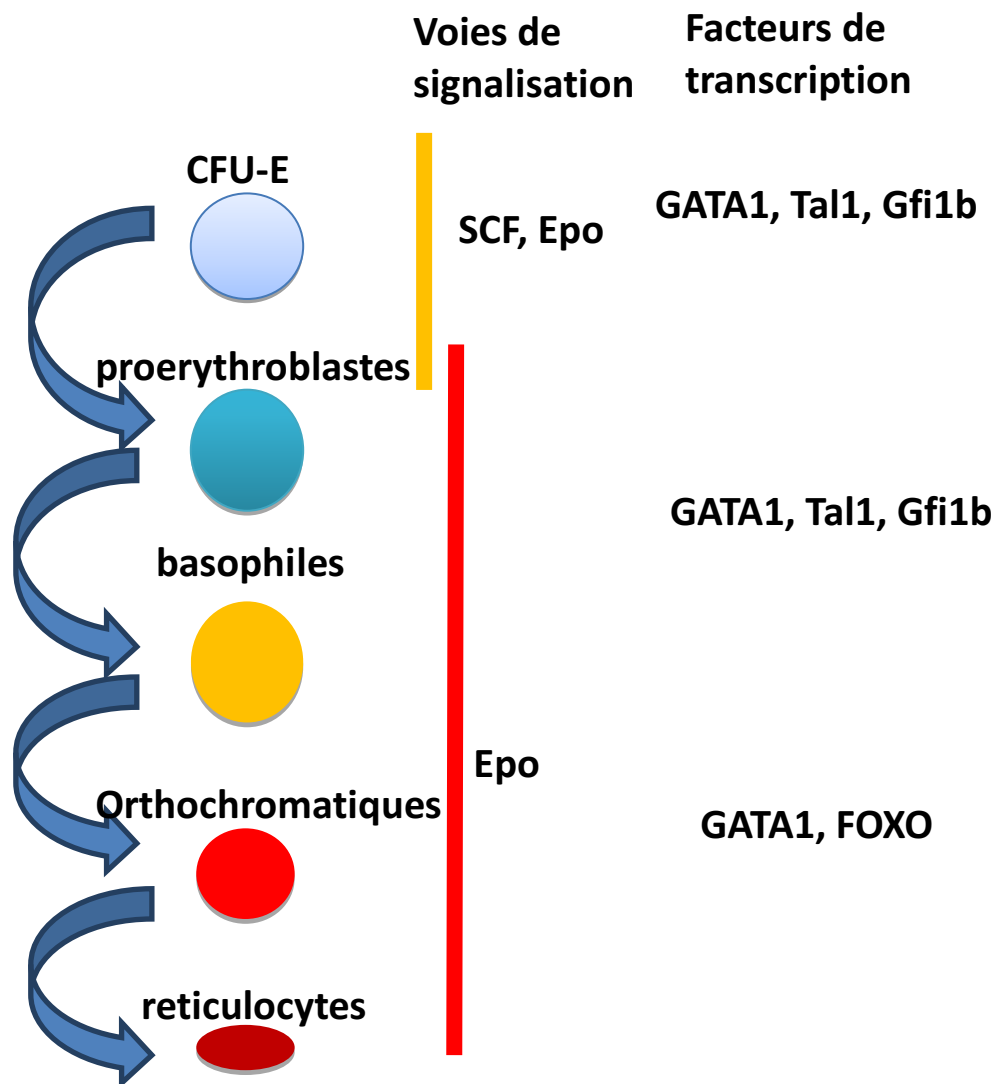


FIGURE 5 : L'ERYTHROPOIESE DÉFINITIVE

Détail de la différenciation érythroïde avec ses différents stades, les voies de signalisation impliquées les plus caractérisées et les facteurs de transcriptions connus pour leur rôle dans sa progression.

L'hormone érythropoïétine est produite par les glandes surrénales dépendamment de l'abondance d'oxygène dans l'environnement, ou bien de la quantité de sang circulant dans l'organisme (91). En cas de besoin (oxygène peu abondant ou perte de sang majeure), une hausse de la production d'EPO favorise l'augmentation de la production de globules rouges.

Au niveau du mécanisme, il a été démontré que les progéniteurs érythroïdes CFU-E possèdent

à leur surface le récepteurs de l'EPO (92). Une fois la liaison EPO/EPO-récepteur effectuée, le récepteur va subir un changement de conformation qui va activer la tyrosine kinase qui lui est attachée, Jak2 par son autophosphorylation. Alors, Jak2 va phosphoryler la protéine STAT5, qui va répondre à cette phosphorylation en se dimérisant, ce qui lui permettra d'entrer dans le noyau et d'agir comme facteur de transcription. Les gènes activés par STAT5 sont principalement reliés à la prolifération, à la différenciation et à la survie des cellules érythroïdes, ce qui permettra, à terme, d'amplifier la production de globules rouges (91) (Figure 6).

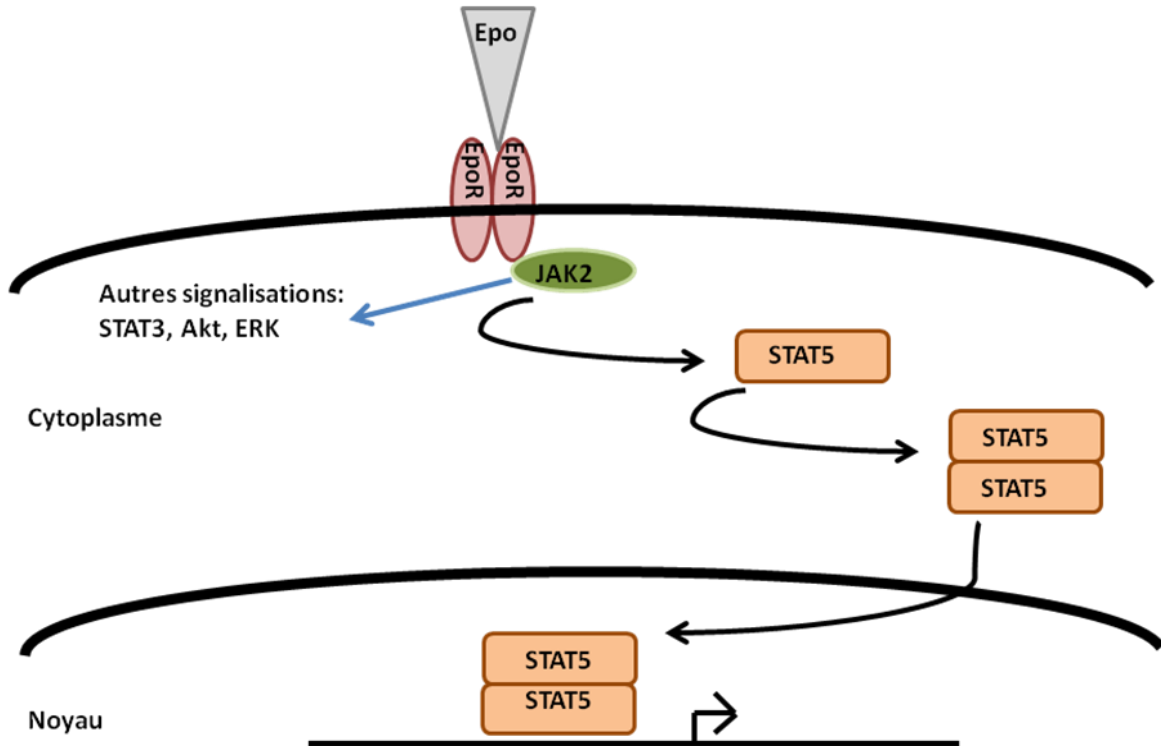


FIGURE 6 : L'ÉRYTHROPOÏÉTINE (EPO)

Schéma simplifié de l'activation de la voie de l'EPO. Le récepteur est un dimère activé à la rencontre de son ligand. L'activation provoque une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation du facteur de transcription STAT5, qui va alors activer ses gènes cibles.

- La dérégulation de l'homéostasie érythroïde

Il existe de nombreuses situations pathologiques dérivant de dérégulations de l'homéostasie, on peut parler des leucémies érythroïdes, dans lesquelles on retrouve un blocage de différenciation associé à une hyper-prolifération cellulaire (93), mais il existe d'autres pathologies, dont une exposant de façon typique un dérèglement de l'homéostasie érythroïde et ses conséquences : la *Polycythemia Vera*. Initialement mise en évidence en 1892 (94), c'est une pathologie clonale issue d'un progéniteur hématopoïétique multipotent provoquant une accumulation aberrante et excessive de cellules érythroïdes, et à un niveau moindre de cellules d'autres lignages hématopoïétiques, phénotypiquement normales (95). Les analyses génomiques ont permis de comprendre le mécanisme de cette maladie. On sait désormais que pour une grande partie des patients, l'élément déclencheur est la substitution d'une valine par une phénylalanine à la position 617 de la protéine Jak2 (Jak2<sup>V617F</sup>) résultant en l'activation constitutive de JAK2 et donc du signal de l'EPO via l'activation constitutive du substrat de JAK2, STAT5 (96). La suractivation va mener à une prolifération cellulaire accrue et à une résistance anormale à l'apoptose, notamment via la surexpression du gène Bcl2l1, codant la protéine anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub> (97).

#### - GATA1 et homéostasie érythroïde

Si les cibles de l'EPO sont associées à la prolifération et à l'apoptose, il est désormais admis que pour exercer ces effets, l'EPO agit en combinaison avec le facteur de transcription essentiel à l'érythropoïèse, GATA1 (98, 99). C'est d'ailleurs ensemble qu'ils vont réguler l'apoptose érythroïde en suractivant l'expression de l'anti-apoptotique Bcl-X<sub>L</sub> (100). GATA1 est le premier membre découvert de la famille des facteurs « GATA », qui reconnaissent la séquence consensus GATA sur le génome (101). C'est un facteur de transcription présentant deux domaines en doigts de Zinc, lui permettant d'interagir avec d'autres protéines et l'ADN

(101). GATA1 est exprimé dans les cellules érythroïdes, mégakaryocytaires, éosinophiles, mastocytes et dendritiques (102-106). Essentiel à l'expression coordonnée des globines (102), son action a beaucoup été étudiée pendant l'érythropoïèse. Chez la souris, les GATA1-déficientes ne sont pas viables, la perte de GATA1 étant létale au stade embryonnaire E10.5 à cause d'une anémie grave (107). Les cellules souches embryonnaires GATA1-déficientes n'arrivent pas à générer des cellules érythroïdes différenciées (108). GATA1 peut agir aussi bien comme activateur que comme répresseur transcriptionnel, notamment en s'associant à certains complexes modifiant la chromatine pour favoriser l'activation de la transcription (Brg1, CBP/P300) (109, 110), ou sa répression (PRC2) (111). Les associations de GATA1 avec ces complexes se font en grande partie via son cofacteur préférentiel FOG-1 (Friend Of GATA) (112, 113). Par ailleurs, il agit aussi en s'associant en combinaison avec d'autres facteurs de transcription dont Ikaros, Tal1, EKLF (114-116). Au niveau de l'effet de GATA1 sur le transcriptome, ces gènes cibles sont impliqués dans toutes les facettes de la différenciation érythroïde (111). Non seulement il active les gènes érythroïdes spécifiques, mais aussi, il réprime ceux associés aux autres lignages (111). Au niveau de la régulation de l'apoptose, son effet anti-apoptotique est en grande partie dû au fait que GATA1 active l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> (100).

- Bcl-X<sub>L</sub>

La protéine Bcl-X<sub>L</sub> est issue du gène *Bcl2l1* et fait partie de la famille des protéines reliées à Bcl-2 (117). Cette famille peut être divisée en trois groupes. Les anti-apoptotiques multidomaines protègent l'intégrité des membranes mitochondriales (Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-W). Les pro-apoptotiques multidomaines altèrent l'intégrité de ces membranes (Bax, Box, Bok). Et finalement, les pro-apoptotiques à domaine BH3 seulement (Bim, Bid, Bik, Bak)

activent les pro-apoptotiques multidomains par dimérisation avec eux, ce qui leur permet de former des pores sur la surface mitochondriale, par lesquels les composants des mitochondries vont sortir, ce qui va mener à la perte de fonction mitochondriale (117). Bcl-X<sub>L</sub> inhibe par liaison et séquestration, Bid et Bax (117). L'expression de Bcl-X<sub>L</sub> est requise pour la survie des cellules érythroïdes. En effet, les souris Bcl-X<sub>L</sub> <sup>-/-</sup> meurent au stade embryonnaire E13 par apoptose massive des cellules érythroïdes et des neurones (118). De même, une apoptose massive est observée quand des cellules Bcl-X<sub>L</sub> <sup>-/-</sup> souches embryonnaires sont cultivées dans un milieu de différenciation érythroïde (119). Il a été démontré que durant la différenciation des progéniteurs érythroïdes, une augmentation de l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> médiée par l'EPO et GATA1 est nécessaire à la survie et à la maturation érythroïde des érythroblastes (100). La dérégulation de l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> est un phénomène typique des pathologies altérant l'homéostasie érythroïde et hématopoïétique. Bcl-X<sub>L</sub> est systématiquement surexprimé dans les cellules érythroïdes de patients souffrant de *Polycythemia Vera* (97). Cette surexpression n'est pas anodine, des essais d'inhibition de Bcl-X<sub>L</sub> ont révélé que Bcl-X<sub>L</sub> est essentiel à la progression de la pathologie en forçant la survie cellulaire (97, 120) et que par conséquent la régulation de son niveau d'expression est essentielle au maintien de l'homéostasie érythroïde. De plus, la surexpression de Bcl-X<sub>L</sub> est fréquemment détectée dans les leucémies myéloïdes et lymphoïdes aiguës (121, 122) ou chroniques (123). Cette dérégulation de Bcl-X<sub>L</sub> dans les cellules leucémiques lymphoïdes est fréquemment associée à la perte de fonction du facteur de transcription Ikaros (124), ce qui suggère l'existence d'une régulation l'expression de Bcl-X<sub>L</sub> par ce facteur de transcription. La perte de fonction d'Ikaros est associée aux leucémies à mauvais pronostics (125). Ces données renforcent l'hypothèse selon laquelle Bcl-X<sub>L</sub> serai un

élément clé dans la régulation de l'homéostasie érythroïde et hématopoïétique de par sa capacité à influencer le niveau de résistance à l'apoptose des cellules.

## **1.2- Ikaros**

### **1.2.1- Découverte et structure**

#### 1.2.1.a- Rôle initialement mis en évidence dans les lymphocytes

Le gène Ikaros (IKZF1) encode un facteur de transcription. Initialement caractérisé en 1992 par Katia Georgopoulos (126) dans les lymphocytes, Ikaros a d'abord été reconnu comme un facteur de transcription liant une séquence enhancer du CD3delta, un marqueur de différenciation précoce des lymphocytes T (126).

La mutation d'Ikaros chez la souris a permis de déterminer que ce facteur est essentiel à la différenciation des lymphocytes T, surtout au niveau fœtal (127) en partie via la régulation de l'expression de nombreux gènes indispensables à la différenciation des lymphocytes T, notamment le CD4 (128). En plus de cela Ikaros s'est révélé important pour le développement thymique à l'état adulte, en jouant sur le point de contrôle décidant de la destinée CD4 ou CD8 des lymphocytes T (129).

Ikaros est aussi requis pour les lymphocytes B. Les souris Ikaros déficientes Ikaros<sup>null</sup> ne produisent pas de lymphocytes pré-pro-B, des progéniteurs précoces des lymphocytes B (127). Par conséquent, ces souris ne présentent pas de lymphocytes B (127). Dans le détail Ikaros promeut la formation des cellules B via deux aspects : d'une part, il active le programme transcriptionnel B spécifique; et d'autre part favorise l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques vers le lignage B en rendant les cellules sensibles aux signaux

extracellulaires promouvant la voie B et en bloquant l'activation des programmes transcriptionnels associés aux autres lignages de l'hématopoïèse (130).

#### 1.2.1.b- Structure d'Ikaros

Le gène *Ikzf1* ne donne pas une protéine unique. En effet des épissages alternatifs donnent naissance à plusieurs isoformes de la protéine, avec des fragments délétés sur les isoformes. Cependant l'isoforme la plus longue (Ik1) a bien été caractérisée (131). Ikaros appartient à la famille des facteurs de transcription à doigts de Zinc. Les motifs en doigts de Zinc C2H2 ont la particularité de pouvoir se lier directement à l'ADN et de servir de domaine d'interaction avec d'autres protéines (132). L'isoforme Ik1 fait 519 acides aminés chez l'homme et 517 chez la souris. La protéine contient quatre motifs en doigts de Zinc en N-Terminal, servant de domaine de liaison à l'ADN (131), et deux doigts de Zinc en C-Terminal servant aux interactions protéiques et à la dimérisation d'Ikaros (131). La séquence reconnue par Ikaros est TGGGAA/T avec pour noyau la partie GGGA de la séquence (133). Ces six doigts de Zinc (que nous appellerons ZF1 à ZF6 en partant du N-terminal) sont les parties les plus caractérisées au niveau de leur importance dans la fonction de la protéine. Dans le domaine de liaison à l'ADN (ZF1 à ZF4), ZF1 et ZF4 ne sont pas nécessaires à la spécificité de liaison à l'ADN (131) même si des données suggèrent que ZF1 augmente l'affinité d'Ikaros pour l'ADN (131). Par contre, ZF2 et ZF3 sont absolument requis pour la spécificité de liaison d'Ikaros sur des séquences cibles (131). Entre chaque ZF, de ZF1 à ZF4, se situent des « linkers ». Ces régions ont la particularité d'être phosphorylés pendant la mitose, et cette phosphorylation empêche Ikaros de se lier à l'hétérochromatine péricentromérique (134). Les deux motifs en C-Terminal ZF5 et ZF6 permettent l'homodimérisation mais aussi

l'hétérodimérisation d'Ikaros avec des protéines de sa famille (131). En effet, il a été démontré qu'Ikaros était un des membres d'une famille de facteurs de transcription comprenant Aiolos, Helios, Eos et Pegasus, tous étant des facteurs de transcription présentant des domaines à doigts de Zinc (135). Des expériences de construction avec seulement ZF5 et ZF6 ont montré qu'à eux seuls ils sont nécessaires et suffisants pour obtenir une homo-dimérisation ainsi que la dimérisation d'Ikaros avec d'autres protéines (131). Cependant il est intéressant de noter que les interactions protéiques ne sont pas réservées aux domaines ZF5 et ZF6. Nous avons récemment démontré que l'exon 6 d'Ikaros permet son interaction avec la kinase requise pour libérer l'ARN Pol II en pause près du promoteur et promouvant l'élongation de la transcription, Cdk9 (114).

Comme cité précédemment, en raison d'épissages alternatifs, Ikaros est exprimé sous plusieurs isoformes (figure 7). Les isoformes longues Ik1, Ik2 et Ik2A sont fortement exprimées dans les cellules saines tandis que les autres isoformes, courtes sont exprimées à de faibles niveaux. Par contre, en situation pathologique, ces isoformes courtes sont surexprimées et auraient alors un effet délétère lié à leur aptitude à se dimériser sans posséder de domaine de liaison à l'ADN fonctionnel, et pour certaines, en n'ayant pas, en prime, de domaine de localisation nucléaire (Ik6). Ceci provoquerait un effet de dominant négatif, menant à la perte de fonction d'Ikaros dès que ces isoformes sont exprimées à de hauts niveaux (136).

La protéine Ikaros peut subir des modifications post-traductionnelles. Elle possède de nombreux sites de phosphorylation, ou encore de sumoylation (137, 138). Ikaros peut être phosphorylée par la Caséine Kinase 2 (CK2) et déphosphorylée par la Protéine Phosphatase 1 (PP1) (138).



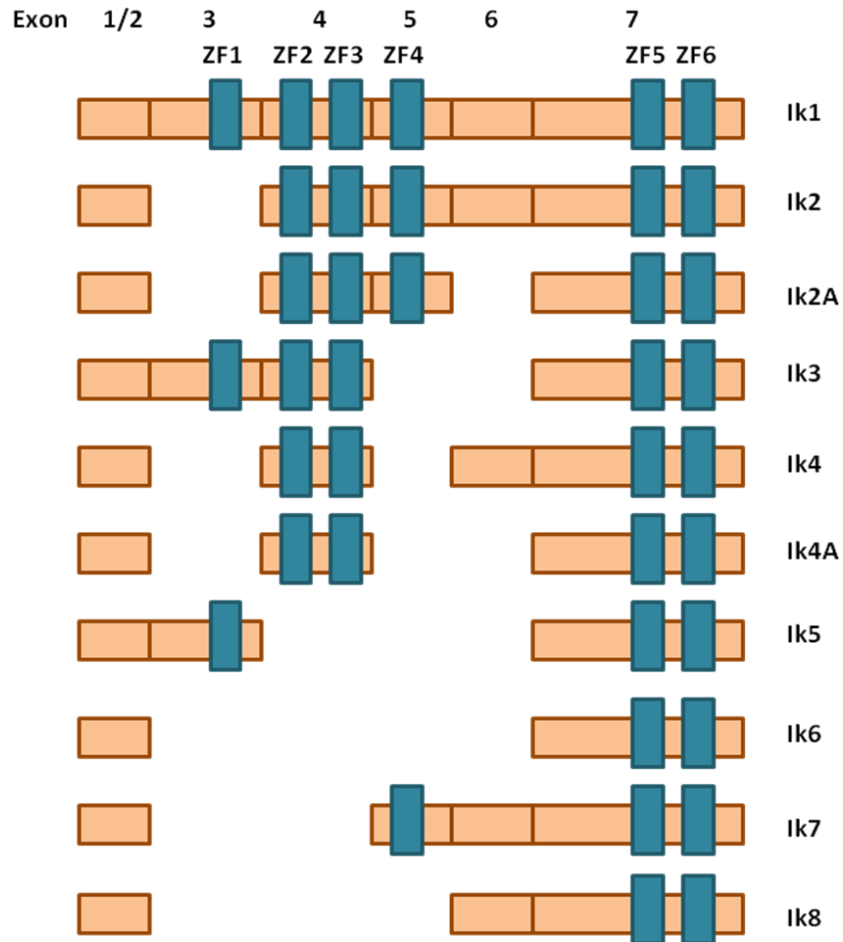


FIGURE 7 : IKAROS ET SES ISOFORMES

Détail de la structure de chaque isoforme d'Ikaros. Les petites isoformes manquent de ZF dans le domaine de liaison à l'ADN ce qui les rend inefficaces, et en fait des dominants négatifs.

La sumoylation a un effet sur les interactions d'Ikaros avec ses partenaires (137) tandis que la phosphorylation présente des effets similaires mais, en plus, a pour conséquence de diminuer la capacité d'Ikaros à se dimériser et ainsi, à se lier à l'ADN (139). Cela altère aussi sa localisation subnucléaire. Alors que la protéine est fortement accumulée au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique en temps normal, la localisation devient aspécifique après phosphorylation (134). Cette dernière modification mène aussi à une dégradation accélérée d'Ikaros par le protéasome (139), car les sites phosphorylés par CK2 sont dans des

motifs riches en Proline (P), Acide Glutamique (E), Sérine (S) et Thréonine (T) (domaines PEST), cibles de dégradation protéique médiée par le protéasome (139). La protéine Ikaros phosphorylée a une demi-vie huit fois plus courte que sa forme non phosphorylée (138).

## **1.2.2- Ikaros et l'hématopoïèse**

### **1.2.2.a- Ikaros dans les autres lignages**

Les cellules du système hématopoïétique expriment Ikaros (140-142), tout comme les neurones et les cellules rétinienne (143, 144). Après sa découverte et ses premières caractérisations dans les lignées lymphoïdes, de nombreuses études se sont penchées sur le rôle potentiel d'Ikaros dans les autres lignages hématopoïétiques. Des défauts dans la myélopoïèse sont observés dans tous les modèles de souris mutantes avec perte de fonction d'Ikaros (127, 145, 146). Dans le cas des neutrophiles par exemple, les souris mutantes Ikaros<sup>null</sup> présentent un défaut de production de ces cellules, et ce défaut est lié à l'échec des granulocytes immatures (progéniteurs de neutrophiles) à augmenter l'expression de Gr-1, un marqueur essentiel à la différenciation (147). Au niveau érythroïde ainsi qu'au niveau mégakaryocytaire, son rôle est moins clair.

Il est intéressant de noter que ce ne sont pas les mêmes isoformes longues qui sont observées dans les différents lignages hématopoïétiques. Les études chez l'humain ont révélé que dans les lymphocytes B et T, la forme dominante est Ik1 (140). Tandis que chez les précurseurs de monocytes, on retrouve Ik1 et Ik2 (142). Dans les monocytes différenciés, c'est Ik2 qui est la forme la plus exprimée d'Ikaros (142). Enfin dans les progéniteurs hématopoïétiques CD34+, on retrouve Ik1 et Ik2 exprimés à des niveaux comparables.

### 1.2.2.b- Leucémies

Les souris mutantes pour Ikaros ont montré le rôle évident du facteur de transcription comme suppresseur de tumeur. De même, les données cliniques suggèrent un effet de la perte de fonction d'Ikaros dans l'apparition ou la progression tumorale (125, 148-150). Les souris mutantes ( $Ik^{DN}$ ) hétérozygotes, exprimant une isoforme agissant comme dominant négatif présentent très rapidement des lymphomes des cellules T (146). Les souris homozygotes  $Ikaros^{null}$ , exprimant Ikaros à de très faibles niveaux finissent aussi par présenter des lymphomes multiples des cellules T au bout de quelques semaines après la naissance (127). Chez l'humain les données cliniques montrent que les mutations d'Ikaros sont fréquemment retrouvées dans les cas de leucémies lymphoblastiques aiguës des cellules B et, à un moindre niveau, des cellules T (150, 151). Enfin, des défauts de fonction d'Ikaros sont aussi observés dans des pathologies myéloïdes. Notamment des néoplasmes myéloprolifératifs et des leucémies aiguës myéloïdes. Cependant dans les cas myéloïdes comme lymphoïdes, ce ne sont pas systématiquement des mutations qui entraînent la perte de fonction d'Ikaros mais fréquemment l'expression inattendue de ses petites isoformes, qui semble alors agir comme des dominants négatifs (152).

Au niveau des événements succédant la perte de fonction d'Ikaros, il a été observé que le cycle cellulaire et la mort cellulaire présentent des altérations. En effet, il a été démontré qu'Ikaros régule de façon directe des gènes reliés aux deux processus (124, 134, 153, 154). Cependant, un autre aspect est de plus en plus admis. La démonstration que les mutants  $Ikaros^{null}$ , ne produisent pas de lymphocytes B et moins de T (127) que des souris normales, suggère que le facteur de transcription a un effet sur la différenciation cellulaire. Par ailleurs, les leucémies avec perte de fonction d'Ikaros sont lymphoblastiques, donc avec une

prolifération aberrante de blastes et un défaut de différenciation (127). Ce qui laisse supposer de façon plus appuyée que le blocage de différenciation serait un effet probable de la perte de fonction d'Ikaros.

### **1.2.3- Ikaros et ses associés**

#### 1.2.3.a- Les facteurs de transcription

Comme indiqué précédemment, les facteurs de transcription sont des protéines modulaires. De façon générale, ils n'agissent pas seuls mais en combinaison. Ikaros n'échappe pas à cette règle. De nombreux travaux ont montré qu'il avait quelques partenaires préférentiels pour réguler ses cibles.

Des analyses d'Immunoprécipitation de Chromatine suivi de séquençage massif (ChIP-seq) sur plusieurs facteurs de transcription dans des progéniteurs hématopoïétiques ont révélé qu'Ikaros pouvaient s'y associer avec les facteurs Tal1, Meis1 et Pu.1 (39).

Plusieurs études menées dans notre laboratoire ont montré qu'Ikaros agissait fréquemment avec le facteur de transcription GATA1 dans les cellules érythroïdes. La combinaison Ikaros/GATA1 joue un rôle majeur dans le développement érythroïde en permettant le passage de la globine fœtale  $\gamma$  à la globine adulte  $\beta$  (102). Par ailleurs nous avons récemment démontré qu'Ikaros pouvait non seulement interagir avec GATA1 mais aussi avec tous les autres facteurs de la famille GATA exprimés durant l'hématopoïèse, c'est-à-dire GATA1, GATA2 dans les progéniteurs hématopoïétiques et GATA3 dans les cellules lymphoïdes. Plus important encore, Ikaros se lie à ces protéines de façon directe comme nous l'avons démontré *in vitro* (114). Cela laisse supposer un rôle potentiel d'Ikaros dans leur recrutement. Le facteur de transcription Ikaros est aussi connu pour s'associer aux autres protéines de sa famille :

Aiolos, Helios, Eos et Pegasus (135). Ces associations pourraient aussi permettre à Ikaros de moduler le niveau d'activation d'un gène cible. Les facteurs de transcription ne pouvant pas modifier la chromatine par eux-mêmes, ils doivent guider sa modification en s'associant avec des complexes de modification de chromatine. Et ces complexes permettront de faire varier le niveau de transcription.

#### 1.2.3.b- Les complexes de remodelage de la chromatine

Cette connexion facteur de transcription/modification et/ou remodelage de la chromatine correspond à la direction d'un programme transcriptionnel et à son exécution. De nombreux exemples ont été observés d'interactions entre facteurs de transcription et complexes de modification d'histones et/ou de remodelage de la chromatine. Ces interactions existent dans tous les tissus de l'organisme et c'est par leur biais que les facteurs de transcription peuvent imposer l'activation ou la répression d'un gène. Le cas d'Ikaros est emblématique. Les complexes associés à Ikaros ont été en grande partie identifiés par des chromatographies sur colonnes FPLC et des purifications protéiques. Ces analyses ont conforté l'hypothèse selon laquelle Ikaros peut agir comme un répresseur ou un activateur transcriptionnel car des complexes répresseurs comme les complexes Sin3 (155), ou répresseurs/activateurs comme le complexe Mi-2/NuRD (156), ou encore activateurs stricts comme les complexes PYR qui contient des sous-unité caractéristiques du complexe SWI/SNF (155), et CBP/P300 (157) ont été détectés comme associés à Ikaros.

Pour ce qui est de la répression, les complexes Sin3 tout comme le complexe Mi-2/NuRD agissent en partie via leurs sous unités HDACs : HDAC1 et HDAC2 (158). Leurs activités leur permettent de participer à la mise en place d'une chromatine répressive. De plus ces

complexes peuvent agir ensemble où en s'associant à d'autres complexes Polycomb tels que le PRC2 (159, 160) et recruter les gènes à l'hétérochromatine, lieu où Ikaros est connu pour s'accumuler (161, 162).

Le cas de l'interaction d'Ikaros avec le complexe Mi-2/NuRD est particulier. En effet ce complexe peut aussi bien être associé à de la répression qu'à de l'activation (112, 163, 164). Son activité HDAC peut servir pour empêcher la surabondance d'histones acétylées mais d'un autre côté, Mi-2 $\alpha$  et Mi-2 $\beta$  possèdent une activité de déplacement de nucléosomes ATP dépendante qui peut être associée à de l'activation transcriptionnelle (112, 163). Le complexe NuRD est très fréquemment associé à Ikaros, à tel point que certains placent ce facteur de transcription dedans (165). Ikaros interagit directement avec Mi-2 $\beta$  (156), et il a été démontré qu'Ikaros est essentiel au complexe pour sa spécificité de recrutement dans les lymphocytes (166). Il semble qu'Ikaros permette au complexe de cibler des gènes et des locus. En l'absence d'Ikaros, Mi-2/NuRD se fixe sur la chromatine de façon anormale ce qui mène à une dérégulation massive du transcriptome (166).

#### **1.2.4- Ikaros /élongation transcriptionnelle**

Notre équipe a précédemment démontré qu'Ikaros pouvait interagir de façon directe avec Cdk9, le facteur d'élongation du complexe P-TEFb promouvant l'activité de l'ARN Polymérase II en phosphorylant les Sérines 2 et 5 de son domaine CTD (167, 168). Le bénéfice de cette interaction pour Ikaros est qu'elle lui permet de pouvoir directement influencer l'avancée de l'élongation transcriptionnelle. Mieux encore, cette influence suggère qu'Ikaros peut alors moduler le niveau d'activité transcriptionnel d'un gène qu'il est en train d'activer, amenant un nouveau niveau de précision de la régulation transcriptionnelle.

Récemment, nous avons mis à jour un nouveau complexe de régulation génique comprenant Ikaros, P-TEFb mais aussi Mi-2/NuRD. La particularité de ce complexe est que son recrutement à des gènes cibles d'Ikaros dépend de la concentration de ce dernier dans le noyau. À faible concentration Ikaros est uniquement capable de promouvoir le recrutement du complexe Mi-2/NuRD, mais quand sa concentration augmente il semble qu'il devient suffisamment abondant pour recruter des complexes comprenant P-TEFb et Mi-2/NuRD. Nous avons démontré que ce complexe participait de façon active à l'activité d'élongation de transcription sur les gènes ciblés par Ikaros (Bottardi et al., soumis). Ikaros semble donc pouvoir maintenir l'activité de l'ARN Pol II avec Cdk9 et utiliser l'activité de déplacement des nucléosomes de Mi-2 pour favoriser la progression de l'élongation transcriptionnelle.

La signalisation cellulaire peut influencer Ikaros et sa capacité à réguler des gènes. Tel qu'indiqué précédemment, la phosphorylation d'Ikaros altère sa capacité de liaison à l'ADN (134, 138, 169). Elle peut également empêcher son interaction avec Mi-2 $\beta$  et par conséquent inhibe son activité de régulateur transcriptionnel. De la même façon, sa sumoylation sur les lysines 58 et 240 empêche son interaction avec Mi-2 $\beta$ , Sin3a et Sin3b (137). Par conséquent l'activité d'Ikaros peut varier dépendamment d'un grand nombre de paramètres : l'isoforme, les modifications post-traductionnelles, les protéines qui lui sont associées et sa concentration, pour citer quelques exemples. Les variations au niveau de la chromatine qui sont associées à Ikaros quand il agit en temps que répresseur ou activateur, sont encore à définir. De même que les modalités de son action dans l'élongation de la transcription.

### **1.3- La voie de signalisation : Notch**

#### **1.3.1- Un centenaire**

Les phénotypes provoqués par son absence ont été découverts il y a désormais un siècle, au niveau de la formation des ailes chez la drosophile (170). La voie de signalisation Notch est une des voies les plus étudiées des sciences du vivant. Son effet a été particulièrement caractérisé au cours du développement. En effet durant l'embryogénèse, Notch va agir de plusieurs façons. Le signal va avoir un effet sur les phénomènes d'inhibition latérale au niveau de plusieurs organes (oreille interne, glandes endocrines) (171, 172). Il est aussi connu pour ses multiples rôles au cours de la neurogénèse (173), ou encore la somitogénèse (174), mais aussi dans les formations de limites, notamment des limites entre somites (175). Sa participation à la segmentation a aussi lieu au niveau du cerveau des vertébrés, dont les compartiments sont en partie établis par la voie Notch (176). Enfin, la voie a aussi un effet sur les divisions asymétriques pouvant avoir lieu au cours du développement, permettant d'obtenir une cellule qui va rester en place et une autre qui va migrer et devenir une cellule différenciée d'un tissu donné (177). Tous ces éléments indiquent l'effet majeur que peut avoir la voie Notch dans la destinée cellulaire.

### **1.3.2- Détail de la voie Notch**

#### 1.3.2.a- Structure du récepteur Notch

Il existe 4 récepteurs Notch (Notch1, Notch2, Notch3 et Notch4) encodés par différents gènes (178). Chaque gène donne un polypeptide qui est clivé par une convertase de type Furine dans l'appareil de Golgi et y devient un hétérodimère lié de façon non covalente (179, 180). Tous ces récepteurs ont une structure de base commune et présentent les mêmes motifs. Cependant au sein de ces motifs on retrouve quelques variations qui sont spécifiques à chaque récepteur. De base, un récepteur Notch est une protéine transmembranaire que l'on peut diviser en deux



parties. La partie extracellulaire plus en N-Terminal correspond à un des dimères et le second dimère correspond aux domaines transmembranaires et intracellulaires. Ce dernier étant couramment appelé NICD (Notch Intracellular Domain) en C-Terminal. La partie extracellulaire en N-Terminal est principalement composée d'une répétition de motifs de type EGF (Epidermal Growth Factor). Le nombre de répétitions varie selon le récepteur Notch (36 pour Notch1 et Notch2, 34 pour Notch3 et 29 pour Notch4) et celui-ci participe à l'affinité pour les différents ligands des récepteurs Notch (181). Plus loin en C-Terminal sur chaque Notch se trouve un domaine composé de trois répétitions de motif LNR (Lin/Notch Repeat). Après les répétitions LNR se trouve un domaine d'hétérodimérisation HD, qui est la zone où se fait l'interaction entre les deux hétérodimères. Après le domaine HD se retrouve un domaine de répétition de motifs Ankyrin, le domaine RAM (RBP-J $\kappa$  Associated Molecule) dans lesquels on retrouve aussi deux signaux de localisation nucléaire (NLS). Puis un domaine de Transactivation (TAD), un domaine PEST qui permet à la protéine d'être reconnue par le protéasome et d'être dégradée, donc qui régule sa stabilité (182).

#### 1.3.2.b- Mécanisme d'activation de la voie Notch

L'activation des récepteurs Notch passe avant tout par leurs ligands. On peut les regrouper par familles. La famille des ligands Delta et celle des Serrates. Chez les mammifères se trouvent trois ligands Delta (ou Delta Like) : Dll1, Dll3 et Dll4, et deux ligands Serrate : Jagged1 et Jagged 2. Tous sont des protéines transmembranaires (177), par conséquent le contact cellule-cellule est important pour que le signal Notch puisse se faire.

Tous les ligands sont capables d'interagir avec tous les récepteurs (177). Cependant leurs niveaux d'expression sont variables selon les tissus et les lignages et leur délétion produit des effets très variés dépendamment du ligand (183-185).

Après l'interaction du récepteur avec un des ligands, possédant tous un domaine de répétition de motifs de type EGF, un changement de conformation va avoir lieu sur le récepteur Notch. Ceci permet aux métalloprotéases ADAM10/17 de cliver le récepteur sur son site S2. Suite à cela, un autre clivage est effectué sur le site S3 par le complexe Presenilin/ $\gamma$ -Secretase. Suite à ce dernier clivage, le NICD est relâché dans la cellule et va alors se transloquer dans le noyau pour activer des gènes cibles (186).

Le NICD est un activateur transcriptionnel, mais pour exercer son effet il doit s'associer à son cofacteur RBP-J $\kappa$ . Ce dernier agit comme un répresseur transcriptionnel des cibles potentielles de la voie Notch (187). Cependant, suite à l'entrée du NICD dans le noyau, ce dernier interagira avec RBP-J $\kappa$  via le domaine RAM du récepteur Notch. Cette interaction provoquera un changement de conformation de RBP-J $\kappa$  qui lui permettra de se lier au coactivateur Mastermind Like 1 (MAML1) et au coactivateur CBP/P300 (188). Le complexe NICD- RBP-J $\kappa$  -MAML1 peut favoriser l'activité transcriptionnelle en recrutant diverses protéines de remodelage chromatinien associées à l'activité transcritptionnelle et des protéines associées à la machinerie transcriptionnelle (186) (Figure 8).

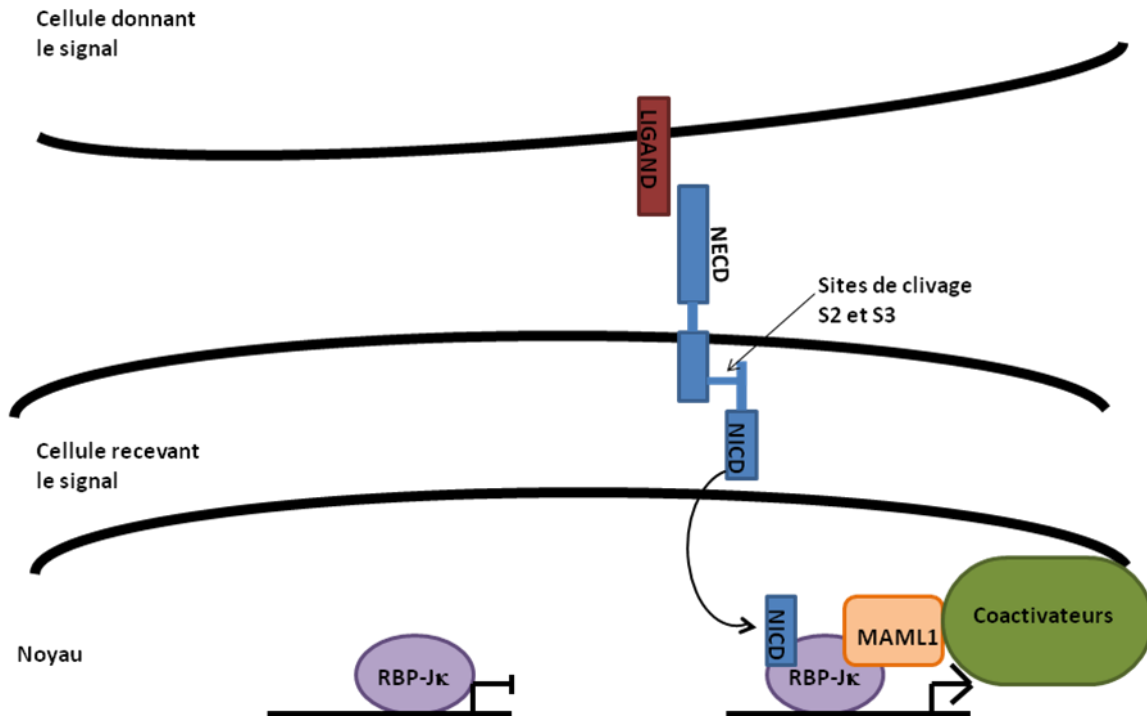


FIGURE 8: LA VOIE NOTCH

Détail de la voie de signalisation Notch. L'activation du récepteur Notch mène à la translocation nucléaire du domaine intracellulaire de Notch (NICD), qui va s'associer à son cofacteur RBP-J $\kappa$  pour activer ses gènes cibles.

### 1.3.3- Notch durant l'hématopoïèse

#### 1.3.3.a- Notch et les cellules souches hématopoïétiques

Au niveau développemental, l'inhibition de Notch par des inhibiteurs de  $\gamma$ -secretase dans des régions AGM aux stades E9 et E10 empêche la génération et donc l'émergence, mais pas la prolifération des CSH (189). De la même façon les souris mutantes déficientes pour RBP-J $\kappa$  ne génèrent pas de CSH dans la région AGM (189). Au niveau mécanisme de production des CSH, il semblerait qu'une synergie se fasse entre les signaux Notch et Bone Morphogenetic Protein (BMP) pour activer l'expression des facteurs de transcription GATA2 et Runx qui vont à leur tour diriger la conversion de cellules endothéliales en cellules hématopoïétiques et donc permettre l'émergence des CSH (178). Au stade adulte, le rôle de Notch dans la biologie

des CSH est moins clair. Cependant, l'absence de phénotype chez les souris présentant des mutations perte de fonction de Notch1, Notch2 et Jagged1 suggère que le signal Notch n'y est pas essentiel (178).

#### 1.3.3.b- Notch dans les différents lignages hématopoïétiques

Si le signal Notch ne semble pas essentiel à la biologie des CSH au stade adulte, il paraît clairement impliqué dans la destinée cellulaire de ces cellules et le choix de lignage pendant l'hématopoïèse. Il a été démontré qu'un signal Notch fort pousse la différenciation des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques vers le lignage lymphoïde (190), de plus si ce signal reste fort il favorise la différenciation en cellule T plutôt qu'en cellule B (191). Au niveau myéloïde l'effet de Notch est plutôt inexploré. Si certaines données suggèrent un rôle négatif de Notch sur la différenciation terminale des progéniteurs déjà engagés dans les lignages myéloïdes (192, 193), d'autres suggèrent des effets positifs dans le choix du lignage myéloïde des progéniteurs hématopoïétiques (194). Cependant l'ensemble de ces résultats montrent que la régulation du signal Notch est d'une importance majeure pour obtenir une hématopoïèse équilibrée. Il existe de nombreuses situations pathologiques démontrant l'importance d'une régulation fine de l'activité de Notch, notamment des leucémies.

#### 1.3.4- Notch et leucémies

Initialement le rôle potentiellement pathogène de Notch1 a été découvert chez l'humain dans des leucémies lymphoblastiques aiguës T (T-LLA) avec translocations chromosomiques, dans lesquelles son gène se retrouvait tronqué (195). Suite à cela de nombreuses études ont permis de déterminer que dans 50 % des T-LLA, des mutations gain de fonction étaient détectées

dans le gène Notch1, notamment au niveau du motif HD (domaine d'hétérodimérisation fragilisée donc facilitation de clivage) et le motif PEST (diminution de la dégradation et accumulation de NICD) (196, 197). Et le phénomène de dérégulation de Notch a paru encore plus évident quand il a été montré que dans une fraction significative de T-LLA, le signal Notch était suractivé, même sans mutation de Notch1 (198). Il a aussi été démontré que les gènes Notch1 et Notch2 étaient souvent mutés ou la voie Notch suractivée dans les leucémies lymphoblastiques chroniques des cellules B (B-LLC) et les lymphomes (199). De la même façon, il a été observé que Notch pouvait avoir un effet dans les leucémies myéloïdes aiguës (LMA) (200). L'ensemble des données issues de la clinique ont permis d'avancer considérablement dans la compréhension du rôle du signal Notch dans l'hématopoïèse. Cependant l'effet de Notch sur certains lignages reste particulièrement obscur. C'est notamment le cas de notre modèle d'étude le lignage érythroïde.

### **1.3.5- Hes1, une cible principale de la voie canonique de Notch dans les cellules hématopoïétiques**

La cible la mieux caractérisée de Notch, Hairy Enhancer of Split 1 (Hes1), est un membre de la famille des facteurs de transcriptions Hes. S'il existe sept facteurs de la famille Hes (201), seuls Hes1, Hes5 et Hes7 sont des cibles de la voie Notch (201). Ce sont des facteurs de transcription à domaine bHLH (basic Helix Loop Helix) agissant en tant que répresseurs transcriptionnels (201). Hes1 reconnaît les N-Box (CACNAG) comme séquences consensus (202). Il a été démontré que son effet répressif passe par son association avec Groucho/TLE (203) et le recrutement de HDACs (204, 205). Hes1 agit comme principal médiateur de Notch dans de nombreux processus développementaux (neurogénèse, myogénèse) (206, 207). La

surexpression de Hes1 est observée dans de nombreux cas de leucémies myéloïdes chroniques (208) et dans certains cas de leucémies lymphoïdes aiguës (209). Son effet a été détaillé dans des progéniteurs hématopoïétiques, les progéniteurs myéloïdes communs. Il a été montré que la forte expression de Hes1 dans les cellules de leucémies myéloïdes chroniques est associée à l'apparition de la crise blastique menant à la phase aigüe (208). Cependant de façon plus mécanistique, il a été montré que Hes1 favorise la quiescence des progéniteurs hématopoïétiques en inhibant leur cycle cellulaire (210, 211). Au niveau érythroïde, l'effet de Hes1 est surtout relié à celui de Notch.

### **1.3.6- Notch dans la différenciation érythroïde**

Au cours des dernières années plusieurs études ont montré des travaux contradictoires sur l'effet de Notch sur l'érythropoïèse. Il a par exemple été observé que Notch pouvait avoir un effet pro-différenciation (212, 213) tandis qu'il était plutôt anti –différenciation dans d'autres (214, 215). Cependant, il semblerait que ces discordances soient plus liées aux différences des modèles utilisés dans ces différents travaux. Par exemple, certaines des lignées utilisées n'étaient pas érythroïdes mais des progéniteurs myéloïdes (213), alors il s'agit plus d'un effet de Notch sur l'engagement vers le lignage érythroïde que de différenciation érythroïde. Par conséquent, actuellement, le rôle de la voie de signalisation Notch dans la différenciation érythroïde reste indéfini.

### **1.3.7- Ikaros vs. Notch**

Les liens entre facteurs de transcription et voies de signalisation sont courants et essentiels au bon déroulement de l'hématopoïèse. On peut les retrouver dès l'émergence des CSH, avec le

lien Notch/GATA2 (216), mais ensuite dans tous les lignages hématopoïétiques, dont le lignage érythroïde dans lequel de nombreuses voies de signalisation interagissent avec les facteurs de transcription essentiels à la maturation cellulaire (100, 217, 218). La connexion Ikaros/Notch est de plus en plus reconnue pour son importance au cours de la différenciation lymphoïde (219), mais cette mise en évidence est surtout liée aux données cliniques (220). En effet, il a été observé que la perte de fonction d'Ikaros mène de façon presque systématique à une suractivation de la voie Notch (220), et que cette combinaison perte d'Ikaros/voie Notch suractivée est un élément caractéristique des leucémies (220, 221) ce qui laisse supposer qu'Ikaros pourrait avoir un effet sur la voie Notch. Par la suite il a été montré qu'Ikaros peut aussi exercer un effet de dominance sur la cible principale de la voie Notch, Hes1, dans les cellules lymphoïdes ce qui suggère qu'il existe une compétition entre Ikaros et la voie Notch pour certaines de ces cibles. Cependant, mis à part cet aspect, les mécanismes sous-jacents au dialogue Ikaros/Notch sont peu caractérisés, et leur effet sur les lignages non-lymphoïdes sont inconnus.

## **1.4- Hypothèses et objectifs**

### **1.4.1- Hypothèses**

Ikaros est exprimé dans toutes les cellules hématopoïétiques (140, 141) et sa perte de fonction aboutit à une activation incontrôlée de la voie Notch dans les cellules lymphoïdes (220-222). L'activation de la voie Notch est généralement transitoire (157, 223), et sa suractivation constitutive est associée à une multitude de désordres hématologiques (198, 200), ce qui suggère qu'il est nécessaire de contrôler précisément l'activité de la signalisation Notch. Au cours de la différenciation érythroïde, Ikaros pourrait exercer le même effet sur la voie Notch

que dans les cellules lymphoïdes, en participant, à l'altération de la signalisation Notch et ainsi permettrait de contrôler l'activité de la signalisation.

Hypothèse 1 : Ikaros intervient dans la régulation de l'activité de la voie Notch.

La perte de fonction d'Ikaros chez les souris, mène à une anémie qui est caractérisé par l'altération de la différenciation érythroïde. De plus, La perte de fonction d'Ikaros affecte l'apoptose érythroïde (224). L'anti-apoptotique jouant un rôle majeur au cours de l'érythropoïèse est Bcl-X<sub>L</sub> (119). La corrélation entre la perte de fonction d'Ikaros et la surexpression de Bcl-X<sub>L</sub> a été montré dans certaines leucémies (124). Ikaros pourrait donc réguler de façon directe ou indirecte *Bcl2l1* (gène encodant Bcl-X<sub>L</sub>). Bien que l'effet de Notch soit peu caractérisé dans les cellules érythroïdes, la suractivation de la voie Notch est associée à différents types de leucémies à forte présence de blastes (impliquant un blocage de différenciation) et à une résistance à l'apoptose accrue. La signalisation Notch pourrait donc avoir la même influence dans les cellules érythroïdes.

Hypothèse 2: Ikaros et la voie Notch influencent l'homéostasie érythroïde en participant à la régulation de la différenciation et à l'apoptose des cellules.

#### **1.4.2- Objectifs**

Au cours de cette étude nous allons déterminer le rôle exact d'Ikaros et de Notch dans la maintenance de l'homéostasie érythroïde. Pour cela nous allons étudier leur mode d'action au cours de deux processus : la différenciation et l'apoptose. Pour la différenciation, nous avons fait des essais de différenciation érythroïde in vitro. Pour ce qui est de l'apoptose, nous avons



déterminer la réponse au stress génotoxique de cellules érythroïdes ex-vivo, avec ou sans Ikaros.

Nous allons décrypter les mécanismes de compétition entre Ikaros et Notch au cours de l'érythropoïèse. Notamment en analysant leur mode d'action pour remodeler la chromatine et influencer les mécanismes de régulation de la transcription. Nous allons décortiquer comment Ikaros peut procéder quand il réprime des gènes cibles, mais aussi son fonctionnement en tant qu'activateur. Nous mettrons cela en opposition avec l'effet de Notch afin de comparer si Ikaros et Notch sont capables d'activer les mêmes gènes et de déterminer si des différences de mode d'action peuvent avoir un effet sur l'érythropoïèse.

L'ensemble de ces analyses nous permettront d'avoir une meilleure compréhension de la fonction d'Ikaros au cours de l'érythropoïèse, et de son mode d'action moléculaire, en détectant des associés qui lui étaient jusqu'ici inconnus.

## **Chapitre 2: Résultats.1 :**

**GATA-1 utilizes Ikaros and the Polycomb Repressive Complex 2 to suppress *Hes1* and to promote erythropoiesis**

Participation équivalente à celle de l'autre co-premier auteur, Julie Ross pour la conceptualisation des expériences, la production des résultats, l'interprétation des résultats et la rédaction du manuscrit.

**GATA-1 utilizes Ikaros and the Polycomb Repressive Complex 2 to suppress Hes1  
and to promote erythropoiesis**

Julie Ross<sup>1\*</sup>, Lionel Mavoungou<sup>1\*</sup>, Emery H. Bresnick<sup>2</sup> and Eric Milot<sup>1#</sup>

<sup>1</sup> Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center and Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4;

<sup>2</sup> Wisconsin Institutes for Medical Research, Carbone Cancer Center, Department of Cell and Regenerative Biology, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison, Wisconsin 53705, United States of America

\*These authors contributed equally to this work

# To whom correspondence should be addressed : Eric Milot, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center and Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

Running title: GATA-1 interferes with the Notch pathway

Word count:

Abstract: 193

Materials and Methods: 1112

Introduction, Results, Discussion: 4474

## **ABSTRACT**

The transcription factor Hairy Enhancer of Split 1 (HES1), a downstream effector of the Notch signaling pathway, is an important regulator of hematopoiesis. In here, we demonstrate that in primary erythroid cells, the *Hes1* gene expression is transiently repressed around proerythroblast stage of differentiation. Using mouse erythroleukemia cells we found that the RNAi-mediated depletion of HES1 enhances erythroid cell differentiation, suggesting that this protein opposes terminal erythroid differentiation. This is also supported by the decreased primary erythroid cell differentiation upon HES1 upregulation in Ikaros deficient mice. A comprehensive analysis led us to define that Ikaros favors *Hes1* repression in erythroid cells by facilitating recruitment of the master regulator of erythropoiesis GATA-1 alongside FOG-1, which mediate *Hes1* repression. GATA-1 is then necessary for the chromatin binding of the NuRD remodeling complex ATPase MI-2, the transcription factor GFI1B and the histone H3K27 methyltransferase EZH2 along with the Polycomb Repressive Complex 2. We show that EZH2 is required for the transient repression of *Hes1* in erythroid cells. In aggregate, our results describe a mechanism whereby GATA-1 utilizes Ikaros and the Polycomb Repressive Complex 2 to promote *Hes1* repression as an important step in erythroid cell differentiation.

## INTRODUCTION

Extracellular signaling, combined with the activities of multiple transcription factors and cofactors, is fundamental for conferring gene expression specificity and hence, cell fate. Although the erythropoietin receptor constitutes the best characterized pathway controlling erythroid cell (EryC) formation, other pathways including stem cell factor/c-kit receptor, wingless-type, Notch and Sonic Hedgehog are also implicated (38, 55). In particular, the Notch pathway affects EryC survival, proliferation, and/or differentiation i.e., EryC homeostasis (3, 12, 19, 20, 22, 27, 44).

*Notch1*-activating mutations occur in various types of leukemia, including a majority of T-cell acute lymphoblastic leukemias. Moreover inactivation of Notch signaling can promote specific forms of myeloid-related leukemia (25). The binding of ligands to the Notch extracellular domain triggers a sequential proteolytic cleavage, resulting in nuclear relocalization of the Notch intracellular domain (NICD). A ternary complex composed of the NICD, the transcription factor RBPJ (CBF1; RBP-J $\kappa$ ) and the coactivator mastermind-like is then formed to promote high-level transcription of Notch target genes (7). In the absence of Notch activation, target genes are repressed by complex composed by RBPJ and corepressors. Other pathways like Sonic Hedgehog (47) and transcription factors including HIF-1 $\alpha$  (*Drosophila* sigma protein) (31) can also influence the regulation of specific Notch target genes in a Notch-independent manner (hereafter: non-canonical regulation).

The transcription factor GATA-1 is critical for EryC homeostasis (40, 49, 53, 54, 57, 60). The absence of GATA-1 in differentiating embryonic stem cells and in mice results in abnormal EryC maturation and massive apoptosis of proerythroblasts (16). Along with GATA-

1, the transcription factor Ikaros acts as a developmental stage-specific repressor of  $\gamma$ -globin genes in EryC (4, 6). This repression is not limited to  $\gamma$ -globin genes, since in primitive and definitive EryC, Ikaros collaborates with GATA-1 to facilitate *Gata2* gene repression (4, 6). The absence of Ikaros, such as in Ikaros null ( $Ik^{null}$ ) mice, results in a severe defect in B- and T-lymphopoiesis and reduced hematopoietic stem cell activity (36, 56). However, many questions remain unanswered as to why adult  $Ik^{null}$  mice also exhibit anemia (36, 43).

Ikaros influences the Notch pathway in lymphoid cells particularly with respect to non-canonical repression of the Notch target gene *Hes1* (9, 11). Overexpression of *Hes1* interferes with B-lymphoid and myeloid cell maturation (22, 24). HES1 protein is also frequently overexpressed in acute and chronic myeloid leukemia (1, 35) and is implicated in the transcriptional repression of multiple genes encoding factors involved in cellular proliferation and differentiation (13). Whether HES1 exerts a positive or a negative role on EryC differentiation is unclear (20, 22).

To define whether GATA-1 participates in the non-canonical Notch signaling in EryC, we investigated the impact of GATA-1 on *Hes1* gene regulation in EryC. We demonstrate that the binding of GATA-1 and its cofactor Friend of GATA-1 (FOG-1) to chromatin at the *Hes1* promoter is facilitated by Ikaros. Then, alongside FOG-1, GATA-1 mediates *Hes1* repression and favors the recruitment of the NuRD remodeling complex ATPase MI-2, the transcription factor GFI1B, and the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) subunits EZH2 and SUZ12 to the *Hes1* promoter. EZH2 is required for the GATA-1-repression of *Hes1* in EryC. Moreover, our data support a model in which HES1 directly control EryC homeostasis, since *Hes1* repression promotes terminal EryC differentiation.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Mouse line**

We utilized a mouse model characterized by the deletion of the c-terminal part of Ikaros which results in protein instability and the absence of Ikaros protein in all tissues (Ik<sup>null</sup>; (56)). Heterozygous Ik<sup>null</sup> male and female were bred and homozygote Ik<sup>wt</sup> or Ik<sup>null</sup> 14.5 dpc fetal liver cells were isolated. Animal experiments were conducted in accordance with the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines and approved by the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal care committee.

### **Cell lines**

G1E-2 (parental GATA-1 null cell line) and G1E-ER4 (GATA-1 null cell line expressing an inducible GATA-1-ER protein) (58) were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco) containing 13% Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma), 1.7% penicillin-streptomycin (PS; Wisent), 2U/mL erythropoietin (Eprex), 1.1 mM 1-thioglycerol (sigma M6145) and 0.5% conditioned medium from a kit ligand producing CHO cell line. To induce nuclear localization of GATA-1-ER, tamoxifen (Sigma) was added to the medium (final concentration: 1 $\mu$ M) for 24h. Tamoxifen, an antagonist of the estrogen receptor, was preferred to estrogen since *Hes1* expression is modulated by  $\beta$ -estradiol (32). Since tamoxifen is dissolved in ethanol (EtOH), equal volume of EtOH was added to control dishes.

MEL (C-88) cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 10% FBS and 1% PS. To knockdown expression of *Hes1*, pLKO.1 vectors containing shRNA

specific to *Hes1* mRNA or unspecific (scramble; Scr) (Sigma) were transfected by electroporation in MEL cells. Puromycin (0.3 µg/mL) was then added in the medium to select for cells with stable integration of pLKO.1 and thus, stably expressing the shRNA. Two different shRNA molecules were used to stably knockdown *Hes1* (sh327 and sh329). The shScramble was also stably integrated in MEL cells (control: shScr). To induce erythroid differentiation, dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the medium at a 2% final concentration.

### **Wright-Giemsa**

100000 to 150000 MEL or 14.5 dpc FL cells were collected and staining was performed as previously described (4). Cell morphology was analyzed with a Leica DMRE microscope and images were acquired with Qimaging digital camera.

### **Diaminofluorene and benzidine staining**

100000 to one million cells were collected and stained with either diaminofluorene solution (0.01% diaminofluorene (Sigma; dissolved to 1% in 90% glacial acetic acid (Fisher)) and 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fisher) in 0.2M Tris-HCl pH 7) or benzidine solution (0.42% Benzidine, 4.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 12.8% Glacial Acetic Acid in H<sub>2</sub>O). Positive blue cells were counted.

### **RT-PCR and quantitative RT-PCR**

Total RNA was isolated by Trizol (Invitrogen) and used for cDNA synthesis with oligo(dT)<sub>12-18</sub> and SuperScript Reverse Transcriptase III (Invitrogen). Semi-quantitative PCR or quantitative real-time PCR (qPCR) were carried out with specific primers (Table 1). The primer set specific for *Actb* was used as internal control and the primer set specific for *Hprt* was used as additional control.



The transcripts were either detected on agarose gel with AlphaImager (Cell Biosciences) (semi-quantitative analyses) or stained with SYBR Green (Invitrogen) and analyzed with the iCycler iQTM (BioRad) system (quantitative analyses). The equation of Pfaffl (41) was employed for quantification:

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

$E_{target}$ : target qPCR efficiency;  $E_{ref}$ : control qPCR efficiency; CP: crossing point;  $\Delta CP_{target}$ : CP deviation of reference sample vs. test sample target gene transcript;  $\Delta CP_{ref}$ : CP deviation of reference sample vs. test sample control transcript.

Unpaired 'Student's t test' was used to determine the levels of statistical significance (p-value).

### **Western blot analysis and protein immunoprecipitation**

For Western Blot, two million cells were lysed in saline solution (1mM PMSF, 150 mM NaCl) and sonicated. Supernatants collected after centrifugation, were diluted 1:2 in sample loading buffer (50mM Tris HCl pH6.8, 10% Glycerol, 2% SDS, 0.1% Bromophenol Blue, 2.5%  $\beta$ -mercapto-ethanol), migrated on SDS-PAGE and transferred on polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (SantaCruz). HES1 (Millipore), GATA-1 (N-6, SantaCruz), GATA-2 (SantaCruz), EZH2 (Millipore), GFI1B (SantaCruz), SUZ12 (Cell signaling) or CDK9 (SantaCruz) and Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody (eBioscience) were used for immunoblotting. Membranes were revealed with Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) on a Fujifilm LAS-4000 luminescent image analyzer. GAPDH (Millipore) or ACTIN (NeoMarkers) antibody were used as loading control.

Immunoprecipitations (IP) were carried out as described before with modifications (4). For standard IP, Lysis Buffer composition was: 150mM NaCl, 20mM HEPES pH 7.9, 0.2mM EDTA, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40, 25% Glycerol, 1mM PMSF, 1μg/ml Aprotinin and protease inhibitors cocktail (Sigma #P8340). For DNaseI/RNaseI/Ethidium bromide (EtBr) IP assays, DNase (1μg/ml, Sigma), RNase (1μg/ml, Sigma) and EtBr (50μg/ml, Sigma) were added to Lysis Buffer. GATA-1, EZH2 or isotype matched-immunoglobulins were utilized for IP.

### **Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and quantitative Real-Time PCR assays**

The ChIP assay was carried out as per manufacturer's instruction (Millipore) and described previously (4). Briefly, cells were crosslinked in 1% formaldehyde for 10 minutes at 37°C and sonicated to obtain chromatin fragments of 400-800 bp on average. Antibodies used for ChIP were directed against diacetylated histone H3 (K9 and K14), trimethylated histone H3K27, HDAC1 and EZH2 (AC22) (Millipore); TFIID (TBP; SI-1), Ikaros (E-20), GATA-1 (N6), Pol II (N-20), FOG-1 (M-20), MI-2 (H-242), GFI1B (D-19) and RBPJ (D-20) (SantaCruz); SUZ12 (D39F6) (Cell Signaling) and activated Notch1 (Abcam). Isotype matched IgG (SantaCruz) was used as control. About 1/30th of immunoprecipitated and unbound (input) material was used as template for quantitative real-time PCR (qPCR) with one primer set specific for *Hes1* or *Notch1* promoter and another primer set specific for the internal control (kidney-specific Tamm-Horsfall promoter; *Thp*). Control qPCR reactions were performed to assess the specificity of the ChIP with primers specific for *β-globin HS2*, *βmaj*, *Gata2 -2.8* and *Gata2 1G*, *Amy* and *βmaj* (see Table 2). Reactions were performed using SYBR Green (Invitrogen) with the iCycler iQTM (BioRad). Quantification was carried out according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method:

$$\text{Fold enrichment} = 2^{-[(Ct \text{ ChIP}_{test} - Ct \text{ input}_{test}) - (Ct \text{ ChIP}_{control} - Ct \text{ input}_{control})]}$$

Ct: threshold cycle; Ct ChIP: Ct value for ChIP sample; Ct input: Ct value for input sample; test: primer set of interest; control: internal control primer set.

Unpaired ‘Student’s t test’ was used to determine the levels of statistical significance (p-value).

### **Cell sorting**

Three 14.5 dpc fetal livers were washed and resuspended in PBS/5% heat-inactivated FBS (PBS/FBS). Cells were incubated for 30 minutes on ice with rat  $\alpha$ -Ter119,  $\alpha$ -rat fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated (BD Pharmingen) and phycoerythrin (PE)-conjugated  $\alpha$ -CD71 (Biolegends) and sorted by high-speed fluorescence-activated cell sorting (FACS Vantage; Becton Dickinson).

### **COS-7 and G1E-ER4 transfection**

The pEGFP-N1 vector containing the FLAG-HA-Ikaros cDNA (4) was used to transiently transfect COS-7 cells. The pGFP-V-RS vector (OriGene) transcribing the shRNA molecules 381 or 382 (both, directed against EZH2 RNA), MI-2-1 or MI-2-2 (against MI-2 RNA), GFI1B-1 or GFI1B-2 (against GFI1B) or the non-specific shRNA molecule “scramble” were used in transient transfections of G1E-ER4 cells. Transfections were made with Lipofectamine (Invitrogen), or with the Nucleofector apparatus (Amaxa; kit R) according to the manufacturer’s instructions. Cells were harvested 36h post-transfection. Note that Ikaros is tagged with FLAG and HA, and GFP is not expressed in the pEGFP-N1 construction containing Ikaros-HA.

## RESULTS

### Levels of *Hes1* expression and erythroid cell differentiation

To define the expression levels of *Hes1* during erythroid cells (EryC) differentiation we made use of fluorescence-activated cell sorting (FACS) and isolated four populations of cells from 14.5 day post-coitus (dpc) mouse fetal livers corresponding to different stages of EryC maturation (51, 63). At this time of development, the mouse fetal liver is mostly composed of EryC (>80%; (51)). We selected four populations of cells according to the expression levels of the cell surface markers CD71 (transferrin receptor; expressed on proliferating cells) and Ter119 (erythroid specific) (Figure 1A). More than 90% of cells from P1 population are erythroid progenitors (63). This population contains Burst Forming Unit-Erythroid (BFU-E) progenitors and is enriched in erythroid progenitors of the Colony Forming Unit-Erythroid (CFU-E). P2 and P3 populations are constituted by proerythroblasts, basophilic and chromatophilic erythroblasts. P2 and P3 cells expressed about 15 to 20 times less *Hes1* than P1 cells (Figure 1B; Ik<sup>wt</sup>). *Hes1* expression was about 4-fold higher in P4 (orthochromatic erythroblasts) than P3 cells. Thus, *Hes1* is transiently down-regulated at the proerythroblast and basophilic erythroblast stages of EryC differentiation.

To further define the variable *Hes1* expression during EryC differentiation the model cell lines G1E-ER4(58, 59) and the mouse erythroleukemia (MEL) cells (50) were used. These model cell lines are well defined and recapitulate different segments of EryC differentiation (Figure 1C). G1E-ER4 cells are deficient for endogenous GATA-1 but, express an estrogen-dependent form of GATA-1 (GATA-1 fused to estrogen receptor; GATA-1-ER (58)). Treatment of the cells with tamoxifen induced relocalization of GATA-1-ER to the nucleus

and consequently, expression of GATA-1 target genes is rapidly affected by the nuclear accumulation of GATA-1-ER (Figures 1D and 1E). These changes in gene expression trigger G1E-ER4 cell differentiation from cells resembling erythroid progenitors to basophilic erythroblast-like cells (42, 58, 59, 61). MEL cells, the second model, resemble proerythroblasts and can differentiate into orthochromatic normoblasts in presence of DMSO (Figure 1F). EryC differentiation is promoted by the variable expression of specific genes, some of which are also regulated during MEL cell differentiation (Figure 1G). In both models, we measured *Hes1* mRNA expression and found that *Hes1* was downregulated in tamoxifen-induced G1E-ER4 cells compared to ethanol (tamoxifen diluent) -treated or uninduced cells (Figure 1H and not shown). Tamoxifen induction had no effect on *Hes1* expression in G1E-2 cells, the GATA-1 null parental cell line (Figure 1H). The expression level of *Hes1* is 3-fold higher in DMSO-treated MEL cells than in untreated MEL cells (Figure 1I). This variation of *Hes1* expression is reminiscent to observation made at late EryC differentiation stages in primary fetal liver EryC (Figure 1B).

Perturbing *Hes1* expression and/or HES1 function is likely to impact severely on cellular identity, since it is central to establishing/maintaining a genetic network that controls cell fate. Thus, to clarify the role of HES1 in EryC and to assess the potential biological relevance of the increased HES1 expression observed at late stages of EryC differentiation, we investigated whether reducing *Hes1* expression (*Hes1kd*) in MEL cells by stable expression of specific shRNA could influence MEL cell functions. MEL cells were then stably transfected with pLKO.1 vector coding for shRNA directed against *Hes1* mRNA or for a non-specific shRNA (shScr). The expression of HES1 was similar in shScr and wild type cells but, little to no HES1 protein was detectable by Western blotting with two constructions (sh327 and sh329;

Figure 2A). By quantitative RT-PCR (qRT-PCR) assay, we observed a decrease *Hes1* but not Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*Hprt*) expression in *Hes1kd* cells with either one of these constructions (decreased expression of 55% and 73% with sh327 and sh329, respectively) relative to control cells (shScr; Figure 2B). Then, *Actin* (*Actb*) was the internal control and *Hprt* expression was used as negative control. We tested the ability of HES1-depleted MEL cells to undergo differentiation. Like in the control cells, the residual *Hes1* expression was upregulated in knockdown cells after DMSO induction (Figure 2B). We evaluated the differentiation of MEL cells by hemoglobin staining with diaminofluorene (DAF) or benzidine (Figures 2C and 2D). Comparison of the slopes of curves obtained by calculation of percentages of DAF positive cells in time after DMSO induction of MEL shSrc vs. sh327 and sh329 (Figure 2C), suggested a more rapid differentiation of MEL cells following *Hes1kd*. This is supported by the benzidine staining analysis (Figure 2D) and by variations in expression levels of differentiation marker genes in *Hes1kd* cells relative to control cells (Figure 2E). Upon DMSO induction, the upregulation of *Hba-a1*, *Alas2* and *Epor* genes, three genes with higher expression levels in differentiated EryC, was significantly enhanced in cells deficient for *Hes1* (Figure 2E). Concomitantly, *Trfr2* expression, which is downregulated during EryC differentiation, was further decreased in *Hes1kd* cells (Figure 2E). This effect of *Hes1* level is specific to differentiating EryC since the relative expression of these genes was not affected in uninduced sh*Hes1* vs. shScr cells (Figure 2F).

### **Ikaros and *Hes1* gene regulation in erythroid cells**

To define the importance of Ikaros in *Hes1* gene regulation in EryC, we used total 14.5 dpc fetal liver cells extracted from mouse embryos that do not express Ikaros (Ik<sup>null</sup>). The

absence of Ikaros had no significant effect on EryC morphology or viability (compared to wild type fetal liver EryC: Ik<sup>wt</sup>) (Figure 3A; (4)). However, Ik<sup>null</sup> fetal livers are smaller due, most likely, to the role of Ikaros in production of hematopoietic precursors (Figure 3B; (36)). In Ik<sup>null</sup>, we observed that *Hes1* expression was increased by 3-fold in total fetal liver (Figure 3C). More precisely, the *Hes1* expression was increased in the basophilic-chromatophilic-orthochromatophilic erythroid populations P3 and P4 (Figure 1B) where the number of cells was significantly reduced in Ik<sup>null</sup> vs. Ik<sup>wt</sup> fetal liver (Figures 3D and 3E). Thus, the absence of Ikaros leads to the abnormal upregulation of *Hes1* and interferes with normal terminal erythroid differentiation at 14.5 dpc (Figures 3C-E). Furthermore, the increased number of cells and downregulation of *Hes1* in Ik<sup>null</sup> P1 population suggest that HES1 and Ikaros exert opposite effects in erythroid progenitors vs. differentiated EryC (Figures 1B and 3E).

We tested whether Ikaros directly represses *Hes1* using chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay. The chromatin binding of Ikaros to *Hes1* promoter was detected with two independent but partially overlapping primer sets (pro1 and pro2; Figure 4A). In Ik<sup>wt</sup> EryC, we detected a 3.5-fold enrichment of Ikaros at the repressed *Hes1* promoter relative to a non-target promoter (*Thp*; negative control) (Figure 4B). However, Ikaros was not significantly recruited to the *Hes1* open reading frame (ORF). The *Amylase* promoter was used as negative control and *Gata-2 IG* enhancer, as positive control (4) for the Ikaros ChIP analysis. As expected, in Ik<sup>null</sup> EryC an enrichment value of one was obtained at the *Hes1* gene (same as observed at *Thp* promoter; Figure 4B). We obtained similar results when ChIP was performed with isotype-matched IgG, confirming the specificity of the antibody. Since Ikaros occupies the *Hes1* promoter in Ik<sup>wt</sup> EryC and *Hes1* expression was elevated in Ik<sup>null</sup> cells (Figure 3C), we conclude that Ikaros directly represses *Hes1* transcription in fetal liver EryC.

## **Ikaros facilitates GATA-1 chromatin occupancy and the subsequent repression of *Hes1* gene**

GATA-1 can coregulate genes with Ikaros (4) and the analysis of the *Hes1* promoter revealed the presence of a conserved GATA binding site ~100bp downstream of the Ikaros binding sites (Figure 4A). Using the ChIP assay, we tested whether GATA-1 occupies the *Hes1* promoter in Ik<sup>wt</sup> fetal liver EryC. While GATA-1 occupied the *Hes1* promoter in Ik<sup>wt</sup> cells, GATA-1 occupancy was significantly reduced in Ik<sup>null</sup> EryC (Figure 4C) although its protein level is maintained (Figure 4D). GATA-1 binding was detected at *Hes1* promoter with two independent primer sets but not at the ORF. Since it is not active in EryC, the *Amylase* promoter was used as negative control, and the *β-globin HS2* region -whereby GATA-1 binds chromatin in EryC- was the positive control for the GATA-1 ChIP analysis. A ratio of one was obtained when ChIP was performed with isotype-matched IgG, confirming the specificity of the antibody. Thus, Ikaros facilitates the binding of GATA-1 to *Hes1* promoter chromatin in primary EryC.

To test whether GATA-1 mediates *Hes1* repression, we used G1E-ER4 cells. Ikaros protein levels and recruitment were similar in non-induced, EtOH-treated (tamoxifen diluent) and tamoxifen-induced G1E-ER4 cells (Figure 4E and not shown) even if Ikaros expression is slightly decreased in G1E-ER4 induced cells (Figure 4G). As expected GATA-1 (GATA-1-ER) was only recruited to *Hes1* promoter in tamoxifen induced cells (Figure 4F). Ikaros and GATA-1 were also detected at the repressed *Hes1* promoter in MEL cells (Figures 2B, 4H and 4I). The GATA-1 impaired recruitment to *Hes1* promoter in DMSO-treated cells could not be linked to a variation in GATA-1 protein levels (Figure 4J). Thus, GATA-1 is not required for



Ikaros occupancy at the *Hes1* promoter but, Ikaros favors GATA-1 occupancy at the *Hes1* promoter. GATA-1 represses *Hes1* transcription.

### **Recruitment of a GATA-1-nucleated repressive complex to *Hes1* promoter**

The histone deacetylase HDAC1 and the chromatin remodeling factor MI-2 can be associated with gene repression. These factors interact with Ikaros and GATA-1 directly or via FOG-1 and with Ikaros (17, 21, 26, 45). The interaction of MI-2 with GATA-1 was shown to be indirect and occurs through FOG-1 (21). HDAC1 occupancy to the *Hes1* promoter was insensitive to changes in *Hes1* expression in the three distinct systems - fetal liver EryC, G1E-ER4 or MEL cells (Figures 5A, 5B and 5C). However, FOG-1 and MI-2 occupancy was compromised in Ik<sup>null</sup> EryC, as well as in DMSO-induced MEL cells, suggesting that Ikaros and GATA-1 establish and/or maintain these factors at the *Hes1* promoter (Figures 5D, 5F, 5G, and 5I). This is further supported by the observation that the binding of GATA-1 in tamoxifen-treated G1E-ER4 cells favored the recruitment of FOG-1 and MI-2 (Figures 5E, 5H; Table 3). FOG-1 and MI-2 protein levels are not influenced by the absence of Ikaros or GATA-1 or by DMSO treatment (Figure 5J).

The knockdown of MI-2 has been made to define the importance of this remodeling factor in *Hes1* repression in EryC. The *MI-2* knockdown, obtained independently with two shRNA molecules (shMI-2-1 and shMI-2-2), had no significant effect on the expression levels of *Hes1* in uninduced or tamoxifen-treated G1E-ER4 cells (Figure 5K). Similarly, MI-2 knockdown had no influence on the expression of IKZF1 (Ikaros) or Gata-1-ER in the tamoxifen-treated G1E-ER4 (not shown).

To identify potential mechanism(s) involved in *Hes1* repression, next we investigated epigenetic and transcriptional mechanisms operational at the *Hes1* promoter. Lysine 9 and 14 acetylation of H3 (H3Ac) is generally enriched at active genes. We detected significant increases of this epigenetic mark at the *Hes1* promoter in *Ik<sup>null</sup>* EryC, in non-induced G1E-ER4 cells and in differentiated MEL cells (Figures 6A-6C). Trimethylation of H3 lysine 27 (H3K27me3) was decreased in *Ik<sup>null</sup>* EryC and DMSO-induced MEL cells (Figures 6D and 6F). Furthermore, the analysis in G1E-ER4 cells provided the evidence that GATA-1 induces and/or stabilizes H3K27me3 at the *Hes1* promoter (Figure 6E). Together, Ikaros and GATA-1 can act on chromatin-promoter organization as well as on transcription elongation (4, 6). Therefore, to complement this chromatin analysis we looked at the formation of the preinitiation complex (PIC), which is composed of RNA polymerase II (Pol II) and general transcription factors, at the *Hes1* promoter. Consistent with the higher expression levels of *Hes1*, recruitment of Pol II and TATA-binding protein (TBP) were enhanced in *Ik<sup>null</sup>* EryC, untreated G1E-ER4 cells and in differentiated MEL cells (Figures 6G-6L). The detection of H3Ac, Pol II and TBP to the repressed *Hes1* promoter could be indicative of a mechanism of priming of this promoter for potential activation at latter point during EryC differentiation (5, 23, 61). However, it cannot be excluded that these results account for a mix of active and repressed *Hes1* alleles in the population of cells.

ChIP experiments and results obtained at *Hes1* were validated by the controls and IgG results (Figures 6A-6L).

### **GATA-1-dependent recruitment of PRC2 to the *Hes1* promoter**

The enrichment of H3K27me3 at the repressed *Hes1* promoter (Figures 6D-6F) led us to investigate the recruitment of EZH2, a methyltransferase of the PRC2 required for trimethylation of H3K27 in mammalian cells. In Ik<sup>wt</sup> EryC, tamoxifen-treated G1E-ER4 cells and in uninduced MEL cells, EZH2 was recruited to the repressed *Hes1* promoter (Figures 7A-7C; Table 3). In uninduced G1E-ER4 cells, EZH2 was not recruited to the *Hes1* promoter and hence, H3K27me3 was absent (Figures 6E and 7B). Similarly, SUZ12, another component of PRC2, was only recruited to *Hes1* promoter in the presence of GATA-1 at *Hes1* (Figure 7D; Table 3). EZH2 binding to the *Hes1* promoter was impaired in Ik<sup>null</sup> EryC and was abolished in differentiated MEL cells i.e., when *Hes1* expression was increased (Figures 7A and 7C). The implication of EZH2 in *Hes1* regulation is further supported by the *Hes1* gene expression analysis in G1E-ER4 cells whereby EZH2 is depleted by knockdown (Figures 7E and 7F). In EZH2-depleted G1E-ER4 cells, the *Hes1* expression is maintained after tamoxifen induction, which indicates that the absence of EZH2 impairs the GATA-1-mediated *Hes1* silencing.

EZH2 and SUZ12 can be immunoprecipitated (IP) with GATA-1 (Figure 8A and (62)). The specificity of EZH2 IP was confirmed by SUZ12 detection and CDK9 (positive and negative controls, respectively). Since EZH2 was recruited only to the GATA-1-occupied *Hes1* promoter, we asked whether other hematopoietic factor(s) are required for the GATA-1-EZH2 interaction. Thus, we expressed GATA-1 in non-hematopoietic COS-7 cells and conducted the IP assay. GATA-1-EZH2 IP was detected in this system (Figure 8B). To test whether the DNA template was required for the interaction, we conducted IP analysis with cell lysates treated with DNaseI, RNaseI and ethidium bromide (45). Under these conditions, GATA-1-ER and EZH2 immunoprecipitated together (Figure 8C). Thus, although Ikaros

promotes the recruitment of GATA-1 and EZH2, the interaction between GATA-1 and EZH2 does not require Ikaros, the “ER section” of GATA-1-ER, other hematopoietic factors, or DNA.

### **Ikaros is required for GFI1B recruitment to *Hes1* promoter**

The transcription factor GFI1B interacts with GATA-1 and EZH2 (62). At the *Hes1* promoter, we found two potential GFI1B DNA binding sites. ChIP analysis revealed the enhanced recruitment of GFI1B to the *Hes1* promoter chromatin in EryC, but only when Ikaros and GATA-1 were present (Figures 9A, 9B; Table 3). An IP with  $\alpha$ -GFI1B was conducted in uninduced G1E-ER4, which revealed EZH2 interaction with GFI1B in the absence of GATA-1 (Figure 9C). Thus, GATA-1 is required for GFI1B occupancy at the *Hes1* promoter but, the interaction between GFI1B and EZH2 does not require GATA-1.

Since EZH2 is required for the *Hes1* repression described in here and GFI1B can interact with EZH2, we knocked down GFI1B to define the influence of GFI1B on *Hes1* regulation in EryC. As shown in Figure 9D, the knockdown of GFI1B had no significant effect on *Hes1* expression in uninduced or tamoxifen-treated G1E-ER4 cells. The expression levels of IKZF1 (Ikaros) or GATA-1-ER were also not significantly influenced by the decreased expression of GFI1B in the knockdowns (not shown).

### **Ikaros influence on the Notch pathway in erythroid cells**

Interestingly, other genes of the Notch pathway have also been identified as GATA-1 target in erythroid cells by genome wide analyses (10, 15, 52, 62). *Notch1* is a common target in all these studies and Ikaros is a regulator of *Notch1* in lymphoid cells (18). Like presented

in Figures 10A and 10B, Ikaros also influences the expression of *Notch1* by binding its promoter in EryC. The importance of Ikaros in the Notch pathway regulation is also observed by the increased recruitment of NICD and RBPJ to the *Hes1* promoter in the absence of Ikaros (Figure 10C and 10D). Therefore, our data suggest that the combination of Ikaros and GATA-1 is important for the regulation of different genes of the Notch pathway in EryC.

## **DISCUSSION**

### **Expression levels of *Hes1* during erythroid cell differentiation**

The Notch pathway influences apoptosis in mouse yolk sac and bone marrow EryC (44). Although controversial, it is also reported to affect EryC differentiation (20, 22). In here, we provide the evidence that the Notch target gene *Hes1* has a dynamic regulation during EryC differentiation (Figure 11). The analysis of fetal liver cell subpopulations corresponding to diverse stages of EryC differentiation revealed a sharp decrease of *Hes1* expression from the early progenitor cell (P1) to the enriched proerythroblast stage (P2) of differentiation (Figure 1B). This observation was also made in differentiating G1E-ER4 cells (Figure 1H). However, our results suggest that this repression is not definitive since *Hes1* expression is increased in orthochromatic erythroblasts and in DMSO-treated MEL cells (Figures 1B and 1I). To define whether this decrease of expression is biologically relevant in EryC, we knocked down *Hes1* in MEL cells. The enhanced differentiation of DMSO-induced MEL cells in the absence of HES1, was reminiscent of observations made in fibroblasts and in specific cancers such as rhabdomyosarcomas whereby HES1 inhibition favors cellular differentiation

(47). In the early progenitor population of fetal liver cells, expression levels of HES1 have the opposite effect since then, it is the enhanced expression of HES1 that favors differentiation. A differentiation stage-specific effect of HES1 could explain why opposite results were obtained when the HES1 influence over EryC differentiation has been assessed in different model cell lines (20, 22). Furthermore, *Notch1* downregulation, which should ablate *Hes1* transcription, was previously reported to impair MEL cell differentiation (48). The apparent discrepancy between these and our results could be attributed to the followings: (i) *Notch1* regulates several target genes in erythroid cells and some of these targets might influence MEL cells differently than HES1; (ii) other Notch receptors such as Notch2 are likely involved in *Hes1* regulation in EryC; and/or (iii) *Hes1* is not solely regulated by the Notch pathway. The latter possibility is highlighted in this report, since we provide evidence that Ikaros and GATA-1 are required for *Hes1* silencing at specific steps of EryC differentiation.

### **Regulation of *Hes1* gene by Ikaros and GATA-1 in erythroid cells**

GATA-1 and Ikaros were both reported to influence EryC homeostasis (16, 36, 40, 43, 49, 53, 54, 57, 60). GATA-1 regulates a number of genes in EryC, however, to date only few Ikaros-regulated genes have been identified in these cells (2, 4, 43). While an expression array revealed that the absence of Ikaros causes variable expression of different genes controlling apoptosis in EryC (43), the precise effect of Ikaros on erythroid gene regulation has been studied mainly at the  *$\beta$ -globin* locus (2, 4, 6). Ikaros can physically interact with GATA-1 whereupon these proteins promote silencing of  *$\gamma$ -globin* genes in a developmental-stage specific manner in EryC (4, 6). The combinatorial effect of Ikaros and GATA-1 is also

implicated in silencing of the *Gata2* general promoter in EryC (4, 6). Observations made at the  $\gamma$ -globin and the *Gata2* general promoters led us to propose that when implicated in silencing, Ikaros and GATA-1 nucleate a repressive complex (4).

Our present data demonstrate that GATA-1 and Ikaros are both required for *Hes1* regulation in EryC. Ikaros is directly recruited to the *Hes1* promoter and *Hes1* expression is significantly increased in the absence of Ikaros. This is reminiscent of observations made in lymphoid cells whereby Ikaros is a dominant repressor of *Hes1* (8). Whether or not Ikaros repression of *Hes1* in EryC prevails over Notch activation is unknown; however results presented here indicate that Ikaros facilitates GATA-1 and FOG-1 binding to the *Hes1* promoter and, in the absence of GATA-1, Ikaros is not sufficient to repress *Hes1*.

The mechanism behind the decreased GATA-1 recruitment and subsequent alleviation of *Hes1* repression in differentiated MEL cells as well as in the P4 population of fetal liver cells is unknown. Since it is not likely due to a decreased expression of GATA-1 (Figure 4J), it could be related to post-translational modifications of GATA-1 and/or Ikaros acting on their interaction or on GATA-1 recruitment to chromatin at *Hes1*. Nonetheless, it cannot be excluded that another mechanism, perhaps another transcription factor, could affect the GATA-1 binding to *Hes1* chromatin at late stages of EryC differentiation.

MI-2 is primarily associated with transcriptional repression but when associated with GATA-1 and FOG-1, such as detected at *Hes1*, it can be linked to either gene activation or repression (30). No significant variation in *Hes1* expression was detected when MI-2 was knocked down in G1E-ER4 cells (Figure 5K). The enrichment of H3K27me3 at the repressed *Hes1* promoter prompted us to investigate the possible recruitment of EZH2 and the PRC2.

We found that PRC2 subunits EZH2 and SUZ12 are also recruited in a GATA-1-dependent manner to the repressed *Hes1* promoter in EryC. Furthermore, since GATA-1 and GFI1B can interact and colocalize with EZH2 at different regions of the genome ((62) and in here), we assessed and found that GFI1B binds the repressed *Hes1* promoter in presence of GATA-1 in induced G1E-ER4. GFI1B frequently promotes the recruitment of the histone H3K4 demethylase LSD1 (46), a slight decrease of H3K4me3 at *Hes1* when GFI1B is recruited could be a consequence of LSD1 activity (not shown). However, the knockdown of GFI1B did not significantly affected *Hes1* expression in G1E-ER4 cells. Thus, we show for the first time that GATA-1 is required for the recruitment of the PRC2 subunits EZH2 and SUZ12 as well as GFI1B to a specific promoter (*Hes1*). The implication of PRC2 in *Hes1* regulation is supported by the increased level of H3K27me3 at silenced *Hes1* promoters, and by the increased expression of *Hes1* when EZH2 is knocked down.

Based on our results, we propose a model whereby Ikaros facilitates GATA-1 and FOG-1 recruitment which in turn promote the recruitment of potential repressive factors including MI-2/NuRD, GFI1B and the PRC2 complex (Figure 11). Since the decreased expression of EZH2 significantly affected the expression level of *Hes1*, our result support a model whereby EZH2 and the PRC2 complex are critical for the transient repression of *Hes1* during EryC differentiation. Consequently, GATA-1 is central to *Hes1* repression in EryC. Additionally, results presented in Figure 10 suggest that, like in lymphoid cells (18), Ikaros is implicated in repression of the *Notch1* gene in EryC. Since GATA-1 can bind the *Notch1* locus (15), Ikaros and GATA-1 are likely to influence multiple genes along the Notch pathway. Although it cannot be excluded that a variation of Notch expression induced by Ikaros could also exert an indirect effect on *Hes1* expression, our results undoubtedly



demonstrate the direct recruitment and influence of Ikaros and GATA-1 on *Hes1* gene regulation in EryC.

HES1 can interfere with the capacity of GATA-1 to regulate gene expression (22). Thus the dynamic regulation of *Hes1* during EryC differentiation and, especially, the repression of *Hes1* by GATA-1 in proerythroblast populations, are apparently required for terminal differentiation of EryC. This is further supported by previous studies indicating a requirement for GATA-1 at this stage of EryC differentiation (16, 39). The interplay between HES1 and GATA-1 permits the regulation of both factors, providing a mechanism influencing EryC differentiation.

In summary, our results reveal a non-canonical mechanism of *Hes1* regulation in EryC whereby the facilitated GATA-1 binding to chromatin at the *Hes1* promoter induces the recruitment of FOG-1, GFI1B, the nucleosome remodeling ATPase MI-2, and the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) and consequently, the silencing of *Hes1*. Such *Hes1* repression occurs at a critical stage of EryC differentiation when high-levels of GATA-1 expression are required. Key factors implicated in this newly identified GATA-1-dependent mechanism, including Ikaros, GATA-1, HES1 and EZH2, were reported to be mutated or to exhibit altered expression in different hematological malignancies including leukemia (1, 25, 29, 33-35). Further investigations will be needed to define whether the mutation or altered expression of these factors can collaborate to promote hematological malignancies and in particular, myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic syndromes with marked erythroid dysplasia or even erythroleukemia.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs J.G. Filep, S. Bottardi and E. Drobetsky for critical reading of the manuscript; Dr K. Georgopoulos for the Ik<sup>null</sup> mouse line, Dr M. Weiss for the G1E-2 and the G1E-ER4 cell lines; Dr F. Grosveld for the MEL C88 cell line; V. Bourgoïn for technical assistance; and Dr G. D'Angelo for Wright-Giemsa staining analysis. This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP 97738) held by E.M. J.R. is supported by a Fond de la Recherche du Québec en Santé (FRQS) Doctoral Training Award, and E.M. is scholar of the FRQS.

## REFERENCES

1. **Alcalay, M., N. Meani, V. Gelmetti, A. Fantozzi, M. Fagioli, A. Orleth, D. Riganelli, C. Sebastiani, E. Cappelli, C. Casciari, M. T. Scurpi, A. R. Mariano, S. P. Minardi, L. Luzi, H. Muller, P. P. Di Fiore, G. Frosina, and P. G. Pelicci.** 2003. Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J Clin Invest* 112:1751-1761.
2. **Bank, A.** 2006. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. *Blood* 107:435-443.
3. **Bigas, A., A. Robert-Moreno, and L. Espinosa.** 2010. The Notch pathway in the developing hematopoietic system. *Int J Dev Biol* 54:1175-1188.
4. **Bottardi, S., J. Ross, V. Bourgoïn, N. Fotouhi-Ardakani, B. Affar el, M. Trudel, and E. Milot.** 2009. Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human gamma-globin genes. *Mol Cell Biol* 29:1526-1537.

5. **Bottardi, S., J. Ross, N. Pierre-Charles, V. Blank, and E. Milot.** 2006. Lineage-specific activators affect beta-globin locus chromatin in multipotent hematopoietic progenitors. *EMBO J* 25:3586-3595.
6. **Bottardi, S., F. A. Zmiri, V. Bourgoïn, J. Ross, L. Mavoungou, and E. Milot.** 2011. Ikaros interacts with P-TEFb and cooperates with GATA-1 to enhance transcription elongation. *Nucleic Acids Res* 39:3505-3519.
7. **Bray, S. J.** 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:678-689.
8. **Chari, S., S. E. Umetsu, and S. Winandy.** 2010. Notch target gene deregulation and maintenance of the leukemogenic phenotype do not require RBP-J kappa in Ikaros null mice. *J Immunol* 185:410-417.
9. **Chari, S., and S. Winandy.** 2008. Ikaros regulates Notch target gene expression in developing thymocytes. *J Immunol* 181:6265-6274.
10. **Cheng, Y., W. Wu, S. A. Kumar, D. Yu, W. Deng, T. Tripic, D. C. King, K. B. Chen, Y. Zhang, D. Drautz, B. Giardine, S. C. Schuster, W. Miller, F. Chiaromonte, G. A. Blobel, M. J. Weiss, and R. C. Hardison.** 2009. Erythroid GATA1 function revealed by genome-wide analysis of transcription factor occupancy, histone modifications, and mRNA expression. *Genome Res* 19:2172-2184.
11. **Dumortier, A., R. Jeannet, P. Kirstetter, E. Kleinmann, M. Sellars, N. R. dos Santos, C. Thibault, J. Barths, J. Ghysdael, J. A. Punt, P. Kastner, and S. Chan.** 2006. Notch activation is an early and critical event during T-Cell leukemogenesis in Ikaros-deficient mice. *Mol Cell Biol* 26:209-220.

12. **Elagib, K. E., M. Xiao, I. M. Hussaini, L. L. Delehanty, L. A. Palmer, F. K. Racke, M. J. Birrer, G. Shanmugasundaram, M. A. McDevitt, and A. N. Goldfarb.** 2004. Jun blockade of erythropoiesis: role for repression of GATA-1 by HERP2. *Mol Cell Biol* 24:7779-7794.
13. **Fischer, A., and M. Gessler.** 2007. Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res* 35:4583-4596.
14. **Fraser, P. J., and P. J. Curtis.** 1987. Specific pattern of gene expression during induction of mouse erythroleukemia cells. *Genes Dev* 1:855-861.
15. **Fujiwara, T., H. O'Geen, S. Keles, K. Blahnik, A. K. Linnemann, Y. A. Kang, K. Choi, P. J. Farnham, and E. H. Bresnick.** 2009. Discovering hematopoietic mechanisms through genome-wide analysis of GATA factor chromatin occupancy. *Mol Cell* 36:667-681.
16. **Fujiwara, Y., C. P. Browne, K. Cunniff, S. C. Goff, and S. H. Orkin.** 1996. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12355-12358.
17. **Georgopoulos, K.** 2002. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* 2:162-174.
18. **Gomez-del Arco, P., M. Kashiwagi, A. F. Jackson, T. Naito, J. Zhang, F. Liu, B. Kee, M. Vooijs, F. Radtke, J. M. Redondo, and K. Georgopoulos.** 2010. Alternative promoter usage at the Notch1 locus supports ligand-independent signaling in T cell development and leukemogenesis. *Immunity* 33:685-698.

19. **Hadland, B. K., S. S. Huppert, J. Kanungo, Y. Xue, R. Jiang, T. Gridley, R. A. Conlon, A. M. Cheng, R. Kopan, and G. D. Longmore.** 2004. A requirement for Notch1 distinguishes 2 phases of definitive hematopoiesis during development. *Blood* 104:3097-3105.
20. **Henning, K., T. Schroeder, R. Schwanbeck, N. Rieber, E. H. Bresnick, and U. Just.** 2007. mNotch1 signaling and erythropoietin cooperate in erythroid differentiation of multipotent progenitor cells and upregulate beta-globin. *Exp Hematol* 35:1321-1332.
21. **Hong, W., M. Nakazawa, Y. Y. Chen, R. Kori, C. R. Vakoc, C. Rakowski, and G. A. Blobel.** 2005. FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *EMBO J* 24:2367-2378.
22. **Ishiko, E., I. Matsumura, S. Ezoe, K. Gale, J. Ishiko, Y. Satoh, H. Tanaka, H. Shibayama, M. Mizuki, T. Era, T. Enver, and Y. Kanakura.** 2005. Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J Biol Chem* 280:4929-4939.
23. **Jimenez, G., S. D. Griffiths, A. M. Ford, M. F. Greaves, and T. Enver.** 1992. Activation of the beta-globin locus control region precedes commitment to the erythroid lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10618-10622.
24. **Kawamata, S., C. Du, K. Li, and C. Lavau.** 2002. Overexpression of the Notch target genes *Hes* in vivo induces lymphoid and myeloid alterations. *Oncogene* 21:3855-3863.
25. **Klinakis, A., C. Lobry, O. Abdel-Wahab, P. Oh, H. Haeno, S. Buonamici, I. van De Walle, S. Cathelin, T. Trimarchi, E. Araldi, C. Liu, S. Ibrahim, M. Beran, J. Zavadil, A. Efstratiadis, T. Taghon, F. Michor, R. L. Levine, and I. Aifantis.** 2011. A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. *Nature* 473:230-233.

26. **Koipally, J., A. Renold, J. Kim, and K. Georgopoulos.** 1999. Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO J* 18:3090-3100.
27. **Lam, L. T., C. Ronchini, J. Norton, A. J. Capobianco, and E. H. Bresnick.** 2000. Suppression of erythroid but not megakaryocytic differentiation of human K562 erythroleukemic cells by notch-1. *J Biol Chem* 275:19676-19684.
28. **Lin, T. S., K. Ishiguro, and A. C. Sartorelli.** 1998. Role of gp55 in restoring the sensitivity of Friend murine erythroleukemia cells to erythropoietin by exposure to dimethyl sulfoxide. *Oncol Res* 10:175-184.
29. **Makishima, H., A. M. Jankowska, R. V. Tiu, H. Szpurka, Y. Sugimoto, Z. Hu, Y. Sauntharajah, K. Guinta, M. A. Keddache, P. Putnam, M. A. Sekeres, A. R. Moliterno, A. F. List, M. A. McDevitt, and J. P. Maciejewski.** 2010. Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. *Leukemia* 24:1799-1804.
30. **Miccio, A., Y. Wang, W. Hong, G. D. Gregory, H. Wang, X. Yu, J. K. Choi, S. Shelat, W. Tong, M. Poncz, and G. A. Blobel.** 2010. NuRD mediates activating and repressive functions of GATA-1 and FOG-1 during blood development. *EMBO J* 29:442-456.
31. **Mukherjee, T., W. S. Kim, L. Mandal, and U. Banerjee.** 2011. Interaction between Notch and Hif-alpha in development and survival of Drosophila blood cells. *Science* 332:1210-1213.
32. **Muller, P., J. D. Crofts, B. S. Newman, L. C. Bridgewater, C. Y. Lin, J. A. Gustafsson, and A. Strom.** SOX9 mediates the retinoic acid-induced HES-1 gene expression in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 120:317-326.
33. **Mullighan, C., and J. Downing.** 2008. Ikaros and acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 49:847-849.

34. **Muntean, A. G., Y. Ge, J. W. Taub, and J. D. Crispino.** 2006. Transcription factor GATA-1 and Down syndrome leukemogenesis. *Leuk Lymphoma* 47:986-997.
35. **Nakahara, F., M. Sakata-Yanagimoto, Y. Komeno, N. Kato, T. Uchida, K. Haraguchi, K. Kumano, Y. Harada, H. Harada, J. Kitaura, S. Ogawa, M. Kurokawa, T. Kitamura, and S. Chiba.** 2010. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 115:2872-2881.
36. **Nichogiannopoulou, A., M. Trevisan, S. Neben, C. Friedrich, and K. Georgopoulos.** 1999. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med* 190:1201-1214.
37. **Nudel, U., J. Salmon, E. Fibach, M. Terada, R. Rifkind, P. A. Marks, and A. Bank.** 1977. Accumulation of alpha- and beta-globin messenger RNAs in mouse erythroleukemia cells. *Cell* 12:463-469.
38. **Palis, J., and M. C. Yoder.** 2001. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol* 29:927-936.
39. **Pevny, L., C. S. Lin, V. D'Agati, M. C. Simon, S. H. Orkin, and F. Costantini.** 1995. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* 121:163-172.
40. **Pevny, L., M. C. Simon, E. Robertson, W. H. Klein, S. F. Tsai, V. D'Agati, S. H. Orkin, and F. Costantini.** 1991. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* 349:257-260.
41. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.

42. **Pilon, A. M., S. S. Ajay, S. A. Kumar, L. A. Steiner, P. F. Cherukuri, S. Wincovitch, S. M. Anderson, J. C. Mullikin, P. G. Gallagher, R. C. Hardison, E. H. Margulies, and D. M. Bodine.** 2011. Genome-wide ChIP-Seq reveals a dramatic shift in the binding of the transcription factor erythroid Kruppel-like factor during erythrocyte differentiation. *Blood* 118:e139-148.
43. **Pulte, D., R. A. Lopez, S. T. Baker, M. Ward, E. Ritchie, C. A. Richardson, D. W. O'Neill, and A. Bank.** 2006. Ikaros increases normal apoptosis in adult erythroid cells. *Am J Hematol* 81:12-18.
44. **Robert-Moreno, A., L. Espinosa, M. J. Sanchez, J. L. de la Pompa, and A. Bigas.** 2007. The notch pathway positively regulates programmed cell death during erythroid differentiation. *Leukemia* 21:1496-1503.
45. **Rodriguez, P., E. Bonte, J. Krijgsveld, K. E. Kolodziej, B. Guyot, A. J. Heck, P. Vyas, E. de Boer, F. Grosveld, and J. Strouboulis.** 2005. GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J* 24:2354-2366.
46. **Saleque, S., J. Kim, H. M. Rooke, and S. H. Orkin.** 2007. Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and LSD1. *Mol Cell* 27:562-572.
47. **Sang, L., J. M. Roberts, and H. A. Coller.** 2010. Hijacking HES1: how tumors co-opt the anti-differentiation strategies of quiescent cells. *Trends Mol Med* 16:17-26.
48. **Shelly, L. L., C. Fuchs, and L. Miele.** 1999. Notch-1 inhibits apoptosis in murine erythroleukemia cells and is necessary for differentiation induced by hybrid polar compounds. *J Cell Biochem* 73:164-175.



49. **Simon, M. C., L. Pevny, M. V. Wiles, G. Keller, F. Costantini, and S. H. Orkin.** 1992. Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1- mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 1:92-98.
50. **Singer, D., M. Cooper, G. M. Maniatis, P. A. Marks, and R. A. Rifkind.** 1974. Erythropoietic differentiation in colonies of cells transformed by Friend virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:2668-2670.
51. **Socolovsky, M., M. Murrell, Y. Liu, R. Pop, E. Porpiglia, and A. Levchenko.** 2007. Negative autoregulation by FAS mediates robust fetal erythropoiesis. *PLoS Biol* 5:e252.
52. **Soler, E., C. Andrieu-Soler, E. de Boer, J. C. Bryne, S. Thongjuea, R. Stadhouders, R. J. Palstra, M. Stevens, C. Kockx, W. van Ijcken, J. Hou, C. Steinhoff, E. Rijkers, B. Lenhard, and F. Grosveld.** 2010. The genome-wide dynamics of the binding of Ldb1 complexes during erythroid differentiation. *Genes Dev* 24:277-289.
53. **Takahashi, S., K. Onodera, H. Motohashi, N. Suwabe, N. Hayashi, N. Yanai, Y. Nabesima, and M. Yamamoto.** 1997. Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *J Biol Chem* 272:12611-12615.
54. **Tsai, S. F., E. Strauss, and S. H. Orkin.** 1991. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev* 5:919-931.
55. **Tsiftoglou, A. S., I. S. Vizirianakis, and J. Strouboulis.** 2009. Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life* 61:800-830.
56. **Wang, J. H., A. Nichogiannopoulou, L. Wu, L. Sun, A. H. Sharpe, M. Bigby, and K. Georgopoulos.** 1996. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* 5:537-549.

57. **Weiss, M. J., and S. H. Orkin.** 1995. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9623-9627.
58. **Weiss, M. J., C. Yu, and S. H. Orkin.** 1997. Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol* 17:1642-1651.
59. **Welch, J. J., J. A. Watts, C. R. Vakoc, Y. Yao, H. Wang, R. C. Hardison, G. A. Blobel, L. A. Chodosh, and M. J. Weiss.** 2004. Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. *Blood* 104:3136-3147.
60. **Whyatt, D., F. Lindeboom, A. Karis, R. Ferreira, E. Milot, R. Hendriks, M. de Bruijn, A. Langeveld, J. Gribnau, F. Grosveld, and S. Philipsen.** 2000. An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells. *Nature* 406:519-524.
61. **Wu, W., Y. Cheng, C. A. Keller, J. Ernst, S. A. Kumar, T. Mishra, C. Morrissey, C. M. Dorman, K. B. Chen, D. Drautz, B. Giardine, Y. Shibata, L. Song, M. Pimkin, G. E. Crawford, T. S. Furey, M. Kellis, W. Miller, J. Taylor, S. C. Schuster, Y. Zhang, F. Chiaromonte, G. A. Blobel, M. J. Weiss, and R. C. Hardison.** 2011. Dynamics of the epigenetic landscape during erythroid differentiation after GATA1 restoration. *Genome Res* 21:1659-1671.
62. **Yu, M., L. Riva, H. Xie, Y. Schindler, T. B. Moran, Y. Cheng, D. Yu, R. Hardison, M. J. Weiss, S. H. Orkin, B. E. Bernstein, E. Fraenkel, and A. B. Cantor.** 2009. Insights into GATA-1-mediated gene activation versus repression via genome-wide chromatin occupancy analysis. *Mol Cell* 36:682-695.

63. Zhang, J., M. Socolovsky, A. W. Gross, and H. F. Lodish. 2003. Role of Ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis by a flow cytometry-based novel culture system. *Blood* 102:3938-3946.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1. *Hes1* regulation during erythroid differentiation

(A and B) Ikaros wild type ( $Ik^{wt}$ ) and Ikaros null ( $Ik^{null}$ ) 14.5 dpc fetal livers were collected and sorted on basis of Ter119 and CD71 expression levels. (A) Left: FACS dot plot representation of the four sorted populations from  $Ik^{wt}$  fetal livers; P1: CD71med/Ter119neg/low; P2: CD71high/Ter119neg/low; P3: CD71high/Ter119high; P4: CD71med/Ter119high. Right: Wright-Geimsa-staining of cyospin preparations of sorted fetal liver cells; P1 is enriched in erythroid precursors (BFU-E and CFU-E), P2 is enriched in proerythroblasts and early basophilic erythroblasts, P3 is enriched in basophilic and chromatophilic erythroblasts, P4 is enriched orthochromatic erythroblasts (51) (B) Graphical representation of the relative expression of *Hes1* (y-axis) with corresponding standard deviations in each population. Relative expression was calculated according to Pfaffl (41) using *Actb* as the internal control. (C) Comparative schematic representation of erythroid cell differentiation in different model systems. A schematic view of *Hes1* relative expression levels is indicated in blue. (D, E and H) Untreated (Untr), ethanol (EtOH)-treated or tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 cells were used for expression analyses. (D) Western blot analysis of GATA-1 and GATA-2 expression in nuclear protein extract. Antibodies used for

the immunodetection are indicated under each panel. (E) Agarose gels presenting the semi-quantitative mRNA expression analysis of *Hba-a1*, *Alas2*, *Klfl*, *Bcl2l1* and *Actb*. Neg : Semi-quantitative RT-PCR performed without mRNA template. (H) Bar graph presenting the relative expression (y-axis) of *Hes1* gene measured by qRT-PCR. Corresponding standard deviations are indicated. Relative expression was calculated according to Pfaffl (41) using *Actb* as the internal control. (F, G and I) Untreated (Untr) or DMSO-treated MEL cells were used for analyses. (F) Wright-Geimsa-staining of cytospin preparations of cells induced with DMSO for 0, 2, 4 and 6 days (d). (G) Agarose gels presenting the semi-quantitative mRNA expression analysis of the differentiation marker genes *Hba-a1*, *Hbb-b1*, *Alas2*, *Epor*, *Spfil* (Pu.1) and *Actb* (14, 28, 37). RT-PCR was performed on untreated cells or cells treated with DMSO for different time points as indicated on top of panels. Neg: RT-PCR performed without mRNA template. (I) Bar graph presenting the relative expression (y-axis) of *Hes1* and *Hprt* (negative control) genes measured by qRT-PCR in function of the time in DMSO. Corresponding standard deviations are indicated. Relative expression was calculated according to Pfaffl (41) using *Actb* as the internal control.

### **Figure 2. *Hes1* influence on MEL cell differentiation**

MEL cells were stably transfected with vectors expressing shRNA directed against *Hes1* mRNA (sh*Hes1*: sh327 or sh329) or with a non-specific scrambled shRNA (Sh*Scr*). (A) Western blot analysis of HES1 and GAPDH (control) expression in whole cell extract of uninduced cells. The antibodies used for the immunodetections as well as specific bands and their corresponding molecular weights are presented. (B) Bar graph presenting the relative expression (y-axis) of *Hes1* or *Hprt* (negative control) genes in function of DMSO induction

measured by qRT-PCR. Corresponding standard deviations are indicated. Relative expression was calculated according to Pfaffl (41) using *Actb* as the internal control. (-) : uninduced cells; (+) : cells induced with DMSO for 3 days. (C-D) Graphical representation of the percentage of diaminofluorene (DAF) positive cells (C; y-axis) or benzidine positive cells (D; y-axis) with the corresponding standard deviations in function of time in DMSO (x-axis). Asterisks (\*:  $p < 0.01$ ; \*\*:  $p < 0.005$ ) indicate significant variations between sh327 or sh329 vs. shScr according to Student's t test. (E-F) Bar graphs of the relative expression (y-axis) of *Hba-a1*, *Alas2*, *Epor* or *Trfr2* in function of DMSO induction as described in B. h: hours; Untr: untreated cells. Asterisks (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.001$ ) indicate significant variations between sh329 vs. shScr according to Student's t test.

**Figure 3. Ikaros involvement in erythroid differentiation and *Hes1* regulation in 14.5 dpc fetal liver EryC**

(A and B)  $Ik^{wt}$  and  $Ik^{null}$  total 14.5 dpc fetal livers cells (EryC) were subjected to a viability cell count by trypan blue exclusion. These results were obtained from at least 15 fetal livers of each background. Bar graph of the percentage of viable cells (A) or the number of viable cells (B) per fetal liver for each background with corresponding standard deviations. Asterisks (\*:  $p < 0.001$ ) indicate significant variations between  $Ik^{null}$  vs.  $Ik^{wt}$  according to Student's t test. (C) Bar graph presenting the relative expression (y-axis) of *Hes1* or *Hprt* (negative control) genes in  $Ik^{wt}$  and  $Ik^{null}$  total 14.5 dpc fetal livers cells with corresponding standard deviations. Relative expression was calculated according to Pfaffl (41) using *Actb* as the internal control. (D) FACS dot plot representation of the four sorted populations from  $Ik^{null}$  fetal livers (populations are described in Figure 1A). (E) Bar graph of the percentage of cells

in each sorted populations of  $Ik^{wt}$  and  $Ik^{null}$ . Hash (#;  $p < 0.05$ ) indicate significant variations between  $Ik^{null}$  vs.  $Ik^{wt}$  according to Student's t test.

**Figure 4. Ikaros and GATA-1 recruitment to the *Hes1* promoter in EryC**

(A) Schematic representation of *Hes1* gene. Potential Ikaros (black triangles) or GATA-1 (gray triangles) binding sites, transcription start site (black arrow), stop codon (black box), exons 'E' and amplicons used for ChIP (pro1, pro2 and ORF) are indicated. (B-J) EryC were collected for ChIP and Western blot analyses:  $Ik^{wt}$  or  $Ik^{null}$  total fetal livers (B-D); untreated (Untr) or tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 cells (E-G); and untreated (Untr) MEL cells or MEL cells treated with DMSO for 3 days (DMSO) (H-J). Bar graphs presenting the relative recruitment of Ikaros (B, E and H) or GATA-1 (C, F and I) to the *Hes1* promoter expressed in fold enrichment (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP was performed with  $\alpha$ -Ikaros or  $\alpha$ -GATA-1 and analyzed by qPCR. Fold enrichments were calculated with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formula whereby *Thp* (Tamm-Horsfall protein) promoter was the internal control. *Hes1* was amplified with three different primer sets as described in A; regions amplified for positive control (pos) were  $\beta$ -globin HS2 ( $\alpha$ -GATA-1) and 1G enhancer of *Gata2* ( $\alpha$ -Ikaros) and for negative control (neg) was the *amylase* promoter. ChIP were also performed with isotype-matched immunoglobulin G (IgG; go: goat; ra: rat) and analyzed by qPCR with pro2 primer set. Asterisks (\*;  $p < 0.05$ ) indicate significant variations between  $Ik^{null}$  vs.  $Ik^{wt}$ , Untr. vs. Tmx or Untr vs. DMSO according to Student's t test. (D, G, J) Western blot analyses of GATA-1, Ikaros and Actin (control) expression in whole cell extracts or nuclear extracts for G1E-ER4 cells using TFIID as a control (G). The antibodies used for the immunodetections are indicated.

### Figure 5. Cofactor recruitment to the *Hes1* promoter in EryC

EryC were collected for ChIP and Western blot analyses:  $Ik^{wt}$  or  $Ik^{null}$  total fetal livers (A, D, G and J); untreated (Untr) or tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 cells (B, E, H and J); and untreated (Untr) MEL cells or MEL cells treated with DMSO for 3 days (DMSO) (C, F, I and J). Bar graphs presenting the relative recruitment of HDAC1 (A-C), FOG-1 (D-F) or MI-2 (G-I) to the *Hes1* promoter, expressed in fold enrichment (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP were performed with  $\alpha$ -HDAC1,  $\alpha$ -FOG-1,  $\alpha$ -MI-2 or isotype-matched immunoglobulin G (IgG; white bars; go: goat; rab: rabbit) and analyzed by qPCR as described in Figure 4. Regions amplified for positive control (pos) were -2.8 enhancer of *Gata2* ( $\alpha$ -HDAC1 and  $\alpha$ -MI-2) and  $\beta$ -globin HS2 ( $\alpha$ -FOG-1) and for negative control (neg) was the *amylase* promoter. Asterisks (\*:p < 0.05; \*\*:p < 0.01) indicate significant variations between  $Ik^{null}$  vs.  $Ik^{wt}$ , Untr. vs. Tmx or Untr vs. DMSO according to Student's t test. (J) Western blots of FOG-1, MI-2 and Actin (control) expression in whole cell extracts or in nuclear extracts for G1E-ER4 cells using TFIID as a control. The antibodies used for the immunodetections are indicated. (K) G1E-ER4 cells were stably transfected with vectors expressing shRNA directed against *Mi-2* mRNA (sh MI-2-1 or sh MI-2-2) or with a non-specific scrambled shRNA (shScr). shMI-2-1 and sh MI2-2 express respectively 9% and 15% of normal MI-2 expression level in Tmx-treated G1E-ER4 cells. Relative expression (y-axis) of *Mi-2* or *Hes1* in cells with shScr, sh MI-2-1 or sh MI-2-2 was measured by RT-qPCR in untreated (Untr) or tamoxifen (Tmx)-treated cells. Corresponding standard deviations are indicated. The relative expression was calculated according to Pfaffl (41) using *Actb* as internal control.

**Figure 6. Histone post-translational modifications and PIC assembly on the *Hes1* promoter in EryC**

EryC were collected for ChIP analysis: Ik<sup>wt</sup> or Ik<sup>null</sup> total fetal livers (**A, D, G** and **J**); untreated (Untr) or tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 cells (**B, E, H** and **K**); and untreated (Untr) MEL cells or MEL cells treated with DMSO for 3 days (DMSO) (**C, F, I** and **L**). Bar graphs presenting the relative recruitment of acetylated H3 (H3Ac; **A-C**); trimethylated lysine 27 of H3 (H3K27me3; **D-F**); Pol II (**G-I**) or TBP (**J-L**) to the *Hes1* promoter expressed in fold enrichment (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP were performed with  $\alpha$ -H3Ac,  $\alpha$ -H3K27me3,  $\alpha$ -Pol II,  $\alpha$ -TBP or isotype-matched immunoglobulin G (IgG; white bars; rab: rabbit) and analyzed by qPCR as described in Figure 4. Regions amplified for positive control (pos) were  $\beta$ -globin HS2 ( $\alpha$ -H3Ac), -2.8 enhancer of *Gata2* ( $\alpha$ -H3K27Me3) and  $\beta$ major ( $\alpha$ -Pol II and  $\alpha$ -TBP); and for negative control (neg) was the *amylase* promoter ( $\alpha$ -H3Ac,  $\alpha$ -Pol II and  $\alpha$ -TBP) and  $\beta$ major ( $\alpha$ -H3K27Me3). Asterisks (\*:p < 0.05) indicate significant variations between Ik<sup>null</sup> vs. Ik<sup>wt</sup>, Untr. vs. Tmx or Untr. vs. DMSO, according to Student's t test.

**Figure 7. PRC2 influence on the *Hes1* promoter repression in EryC**

(**A-D**) EryC were collected for ChIP analysis: Ik<sup>wt</sup> or Ik<sup>null</sup> total fetal livers (**A**); untreated (Untr) or tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 cells (**B** and **D**); and untreated (Untr) MEL cells or MEL cells treated with DMSO for 3 days (DMSO) (**C**). Bar graphs presenting the recruitment of EZH2 (**A-C**) or SUZ12 (**D**) to the *Hes1* promoter expressed in fold enrichment (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP were performed with  $\alpha$ -



EZH2,  $\alpha$ -SUZ12 or isotype-matched immunoglobulin G (IgG; white bars; mo: mouse) and analyzed by qPCR as described in Figure 4. Region amplified for positive control (pos) was the 2.8 enhancer of *Gata2* ( $\alpha$ -EZH2 and  $\alpha$ -SUZ12); and for negative control (neg), the NM\_026543 ( $\alpha$ -EZH2,  $\alpha$ -SUZ12)(62). Asterisks (\*:p < 0.05) indicate significant variations between  $Ik^{null}$  vs.  $Ik^{wt}$ , Untr. vs. Tmx or Untr. (-) vs. DMSO, according to Student's t test. (E) Western blot analysis of EZH2 knockdown in G1E-ER4. The  $\alpha$ -EZH2 and  $\alpha$ -actin (control) antibodies were used for the immunodetections. The sh381 and sh382 are shRNA against *EZH2* mRNA; the shScr is a non-specific shRNA (scramble). (F) Bar graph presenting the relative expression (y-axis) of *Hes1* gene in G1E-ER4 cells with sh381, sh382 or scr. Asterisks (\*:p < 0.05) indicate significant variations in *Hes1* expression in G1E-ER4 shScr vs. G1E-ER4 sh381 and G1E-ER4 sh382. Standard deviations are indicated.

### **Figure 8. Immunoprecipitations of GATA-1 and PRC2 components**

Western blot presenting results obtained after immunoprecipitation (IP) with the  $\alpha$ -EZH2,  $\alpha$ -GATA-1 or the  $\alpha$ -IgG (isotype-matched immunoglobulin G; mo: mouse, ra: rat) as indicated on the top of each panel. IP were made in tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 (A), in COS7 cells engineered to ectopically express GATA-1 protein (B) or tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 treated with ethidium bromide (EtBr), RNaseI and DNaseI (C). Protein interactions were revealed by immunodetection with specific antibodies:  $\alpha$ -EZH2,  $\alpha$ -GATA-1,  $\alpha$ -SUZ12,  $\alpha$ -CKD9. Specific bands and molecular weights are respectively specified on the right and the left sides of panels. Dot (•) is pointing at a non-specific band. GATA-1-ER : GATA-1-ER fusion protein; FH-GATA-1: Flag-HA-GATA-1 fusion protein.

**Figure 9. GFI1B influence in the *Hes1* promoter regulation in EryC**

(A-C) EryC were collected for ChIP and Western Blot analysis: Ik<sup>wt</sup> or Ik<sup>null</sup> total fetal livers (A); untreated (Untr) or tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 cells (B and C) Bar graphs of the recruitment of GFI1B (A and B) to the *Hes1* promoter expressed in fold enrichment (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP were performed with  $\alpha$ -GFI1B or isotype-matched immunoglobulin G (IgG; white bars; go: goat) and analyzed by qPCR as described in Figure 4. Region amplified for positive control (pos) was the *Gfi1b* promoter and for negative control (neg) was the the *Car1* promoter (46). Asterisks (\*:p < 0.05) indicate significant variations between Ik<sup>null</sup> vs. Ik<sup>wt</sup> or Untr. vs. Tmx according to Student's t test. (D) G1E-ER4 cells were stably transfected with vectors expressing shRNA directed against *Gfi1b* mRNA (sh GFI1B-1 or sh GFI1B-2) or with a non-specific scrambled shRNA (shScr). When compared with the normal *Gfi1b* expression levels detected in untreated or Tmx-treated G1E-ER4 cells, the expression of *Gfi1b* is significantly down-regulated in the sh GFI1B-1 and sh GFI1B-2 stable populations of G1E-ER4 cells. Relative expression (y-axis) of *Gfi1b* or *Hes1* in cells with shScr, Sh Gfi1b-1 or Sh Gfi1b-2 was measured by qRT-PCR in untreated (Untr) or tamoxifen (Tmx)-treated cells. Corresponding standard deviations are indicated. The relative expression was calculated according to Pfaffl (41) using *Actb* as internal control.

**Figure 10. Ikaros influence on *Notch1* gene in EryC**

(A) Bar graph of the relative expression (y-axis) of *Notch1* in Ik<sup>null</sup> vs. Ik<sup>wt</sup> EryC. Corresponding standard deviation are provided. The relative expressions were calculated according to Pfaffl (41) using *Actb* as the internal control. *Hprt* was the negative control. (B-D) Bar graphs of the recruitment of Ikaros (A), Notch intracellular domain (NICD) (B) or

RBPJ (**D**) to *Notch1* (**B**) or *Hes1* (**C** and **D**) promoter expressed in fold enrichment (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP were performed with  $\alpha$ -Ikaros,  $\alpha$ -NICD,  $\alpha$ -RBPJ or isotype-matched immunoglobulin G (IgG; white bars; go: goat; rab: rabbit) and analyzed by qPCR as described in Figure 4. Asterisks (\*:p < 0.05) indicate the significant variations between Ik<sup>null</sup> vs. Ik<sup>wt</sup> according to Student's t test.

**Figure 11. Model: Influence of Ikaros and GATA-1 on the Notch pathway in EryC**

(A) Ikaros is recruited to *Hes1* gene where it facilitates GATA-1 chromatin binding. Then, GATA-1 promotes the recruitment of different factors/complexes with the capacity to repress gene transcription and hence, represses the *Hes1* gene. Ikaros, GATA-1 and EZH2 are required for *Hes1* repression. (B) The recruitment of Ikaros and GATA-1 interfere with the recruitment of RBPJ and the Notch-activating complex (NAC) to the *Hes1* promoter (Figure 10). The repression of *Notch1* by Ikaros leads to a decreased-level of NICD, a critical component of the NAC released upon cleavages of the Notch receptor after binding of a Notch ligand (Figure 10). Since HES1 interferes with GATA-1 activity in the nucleus (22), the repression of *Notch1* and *Hes1* by Ikaros and GATA-1 favors high-concentration of free GATA-1 that can bind to its target genes.

**Table 1. Oligonucleotides used for RT-qPCR analysis**

Specificity (murine cDNA)	Symbol	direction	Sequence 5'-3'
Hairy and enhancer of split 1	<i>Hes1</i>	F R	ACACCGGACAAACCAAAGAC ATGCCGGGAGCTATCTTTCT
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	<i>Hprt</i>	F R	CACAGGACTAGAACACCTGC GCTGGTGAAAAGGACCTC
Actin beta	<i>Actb</i>	F R	ATCGTGGGCCCGCCCTAGGCACCA TCCATGTCGTCCCAGTTGGTAACAA
Hemoglobin alpha adult chain	<i>Hba-a1</i>	F R	AACTTCAAGCTCCTGAGCCA GGCAGCTTAACGGTACTTGG
Hemoglobin beta adult major chain	<i>Hbb-b1</i>	F R	AACGATGGCCTGAATCACTT ACGATCATATTGCCAGGAG
Aminolevulinic acid synthase	<i>Alas2</i>	F R	GCAGCAGCTATGTTGCTACG ACAGGTTGGTCCTTGAGTGG
Kruppel-like factor 1	<i>Klf1</i>	F R	ACCACCCTGGGACAGTTTCT GAAGGGTCCTCCGATTTCAG
BCL2-like 1	<i>Bcl2l1</i>	F R	GGGATGGAGTAAACTGGGGT TGCAATCCGACTCACCAATA
Erythropoietin receptor	<i>Epor</i>	F R	TACCTCCCCTCCACCTCAC GCTCTGAGTCTGGGACAAGG
Transcription factor Pu.1	<i>Pu.1</i>	F R	CACGTCCTCGATACTCCCAT GCTGGGGACAAGTTTGATA
Transferrin receptor 2	<i>Trfr2</i>	F R	CTGCCGCTAGACTTCGGCCG CGCCGCACGGATGTAGTCCC
Notch gene homolog 1	<i>Notch1</i>	F R	TGTTGTGCTCCTGAACAACG GTGGGAGACAGAGTGGGTGT

**Table 2. Oligonucleotides used for ChIP analysis**

Specificity (murine genomic DNA)	Symbol	direction	Sequence 5'-3'
Hairy and enhancer of split 1 gene promoter	<i>Hes1</i>	F R	GGAAGTTTCACACGAGCCGT GCACCAGCTCCAGATCCTGT
Tamm-Horsfall protein (uromodulin) gene promoter	<i>Thp</i>	F R	GGTGGATGGTGTGGTCACAAC GGTCTTGACACACCAGCTTT
Pancreatic alpha-amylase promoter	<i>Amy2</i>	F R	TCAGTTGTAATTCTCCTTGTAGGG CCTCCCATCTGAAGTATGTGGGTC
Hypersensitive site 2 from $\beta$ globin locus	HS2	F R	CCTTGCCTGTTCTGCTCA CACATGTGACCTGTCTGCCAG
Hemoglobin beta adult major chain gene promoter	<i><math>\beta</math>maj</i>	F R	CAGTGAGTGGCACAGCATCC CAGTCAGGTGCACCATGATGT
<i>Gata2</i> -2.8kb enhancer	<i>Gata2</i> -2.8	F R	GCATGGCCCTGGTAATAGCA CAGCCGCACCTTCCCTAA
<i>Gata2</i> promoter 1G	<i>Gata2</i> 1G	F R	AGATACCCAGAAGGTGCACGTC GCAGACCCTGCACCCCT
Kit oncogene gene promoter	<i>c-kit</i>	F R	CACCTCCACCATAAGCCGAAT CTCCTAGACAATAAAGGACAACCA
Notch gene homolog 1 promoter	<i>Notch1</i>	F R	GCATGAGAGGCTGTGTTGACG TGGCTGTGTCCGACTTAGGTG

**Table 3. Expression of transcription factor and cofactors in G1E-ER4 cells**

<b>Factor</b>	<b>mRNA ratio (Tmx/Untr.)</b>
<i>Ezh2</i>	0.99 ± 0.24
<i>Mi-2</i>	0.53 ± 0.13
<i>Gfi1b</i>	1.07 ± 0.18
<i>Suz12</i>	0.62 ± 0.15

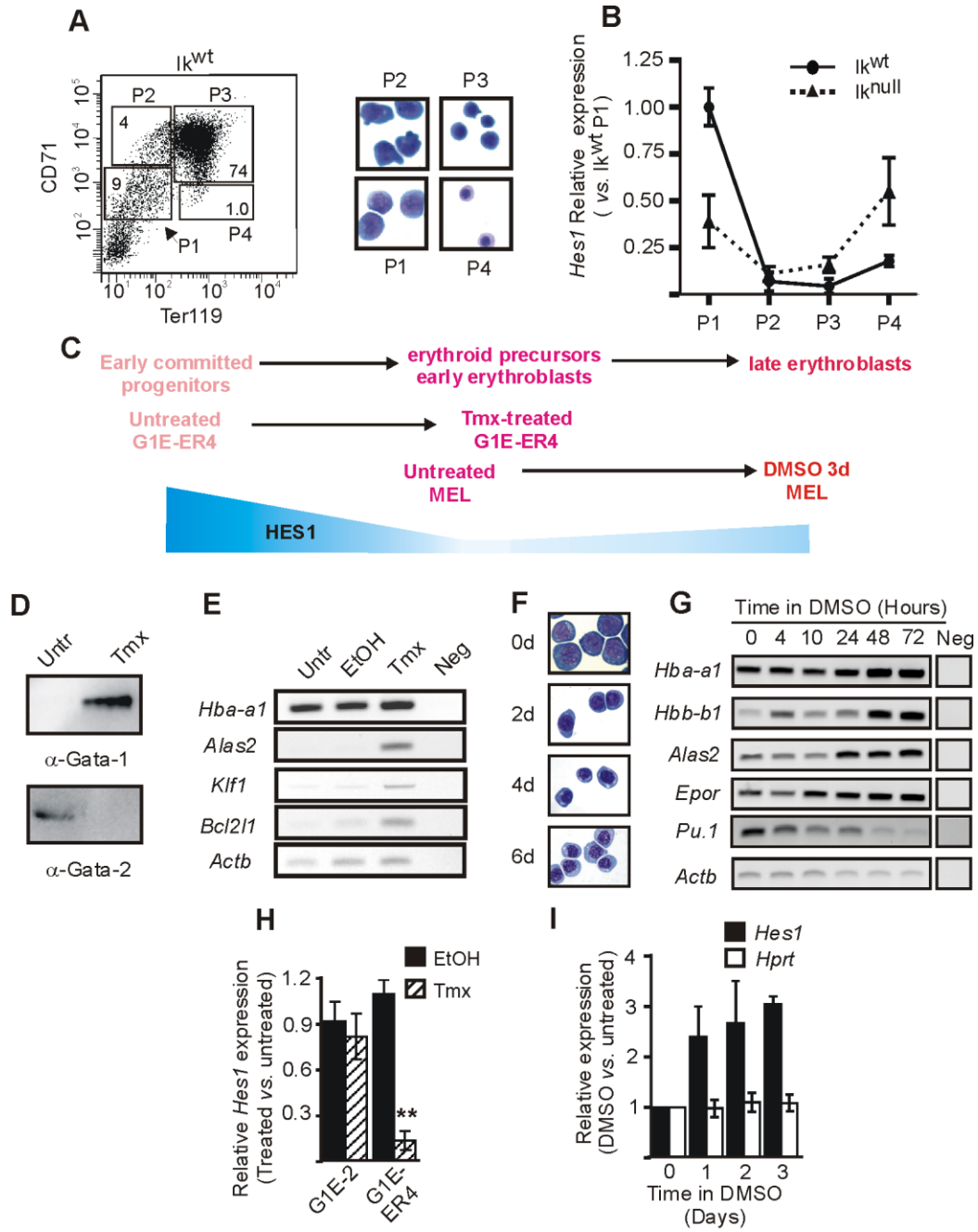
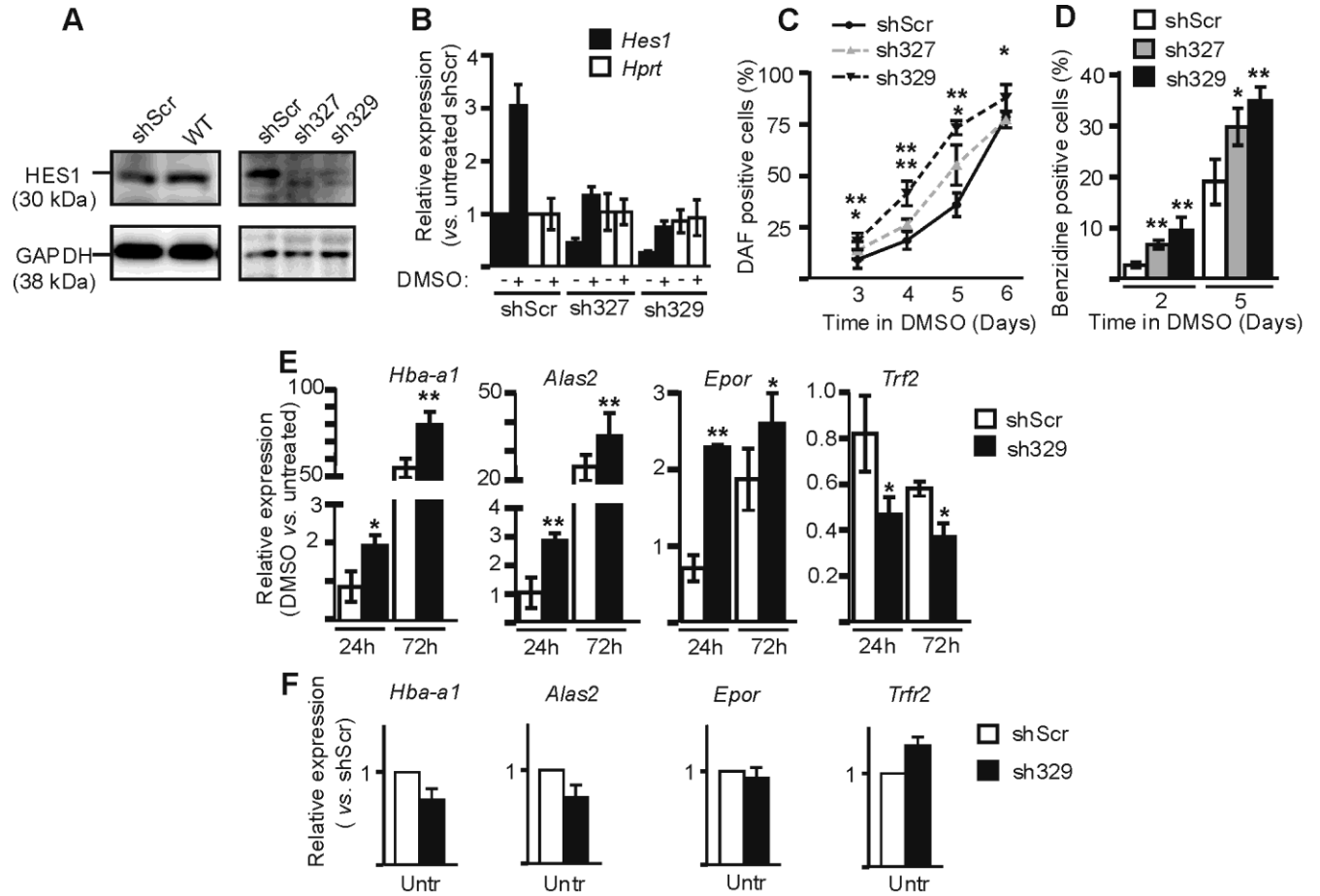
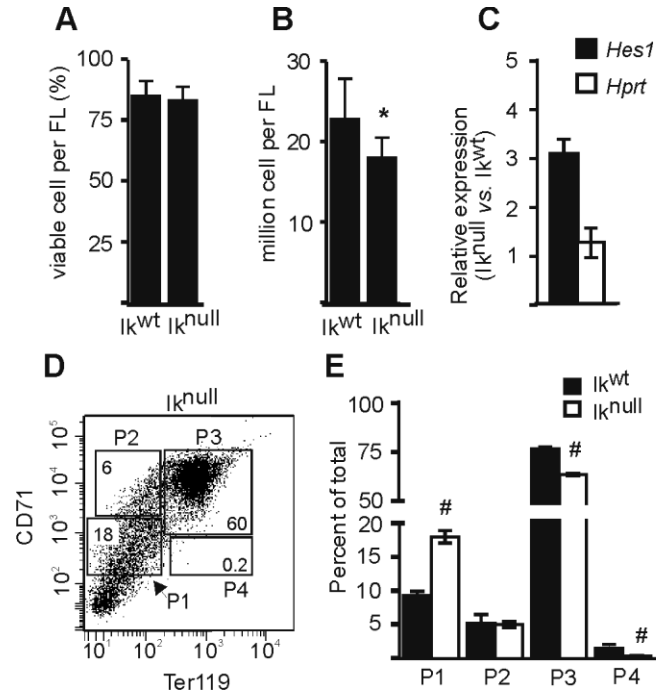


Figure 1. *Hes1* regulation during EryC differentiation

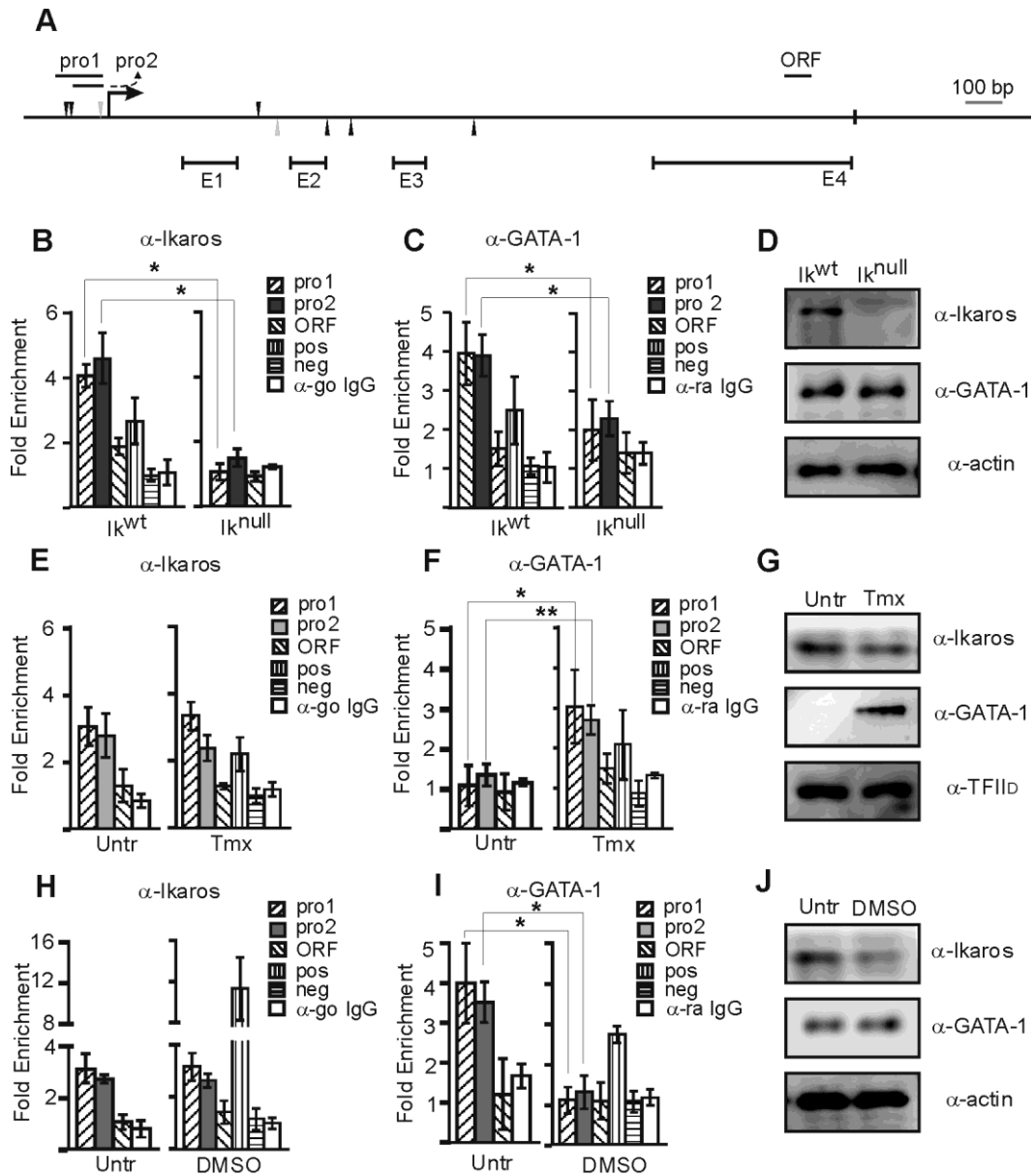


**Figure 2. *Hes1* influence on MEL cell differentiation**

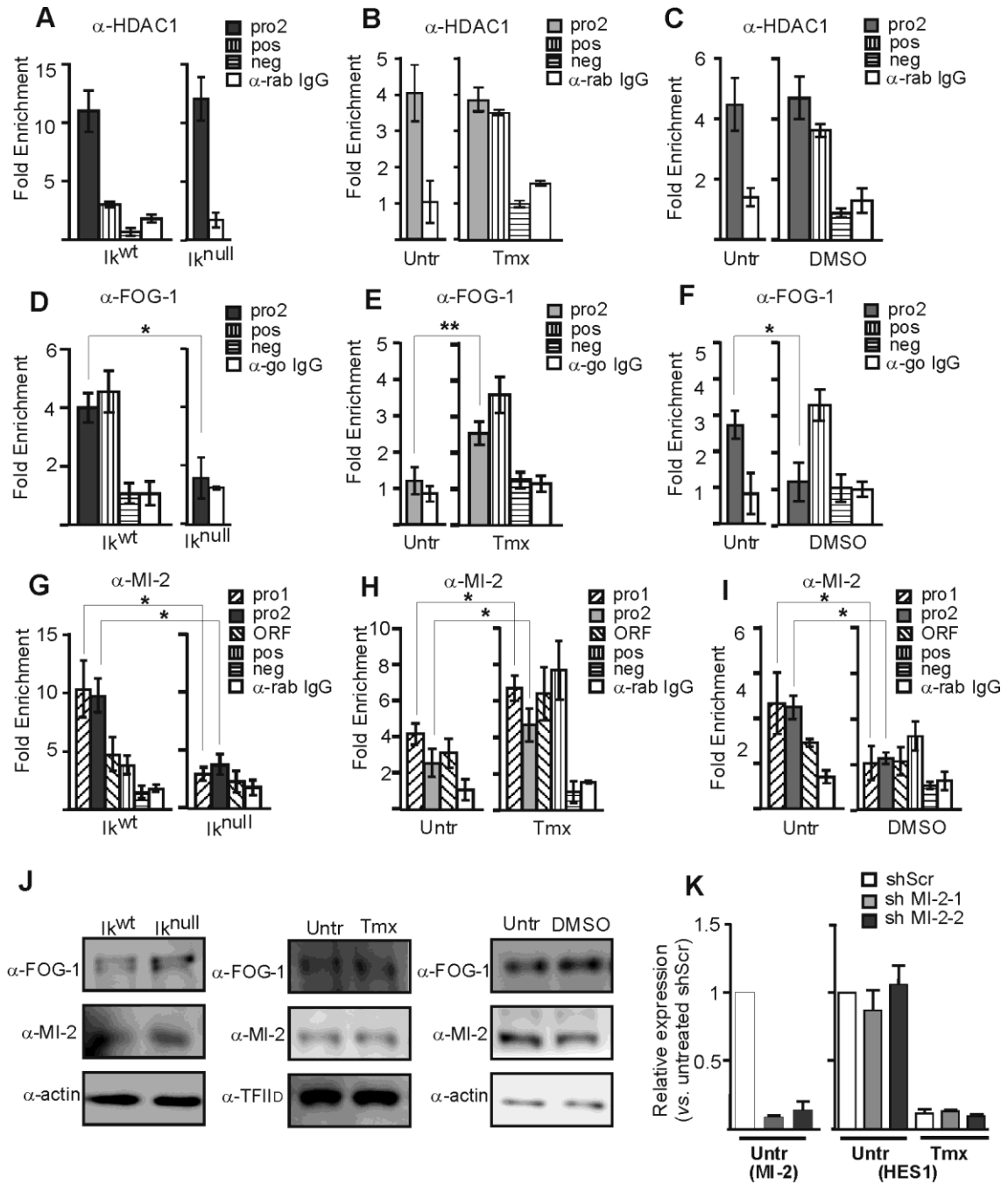




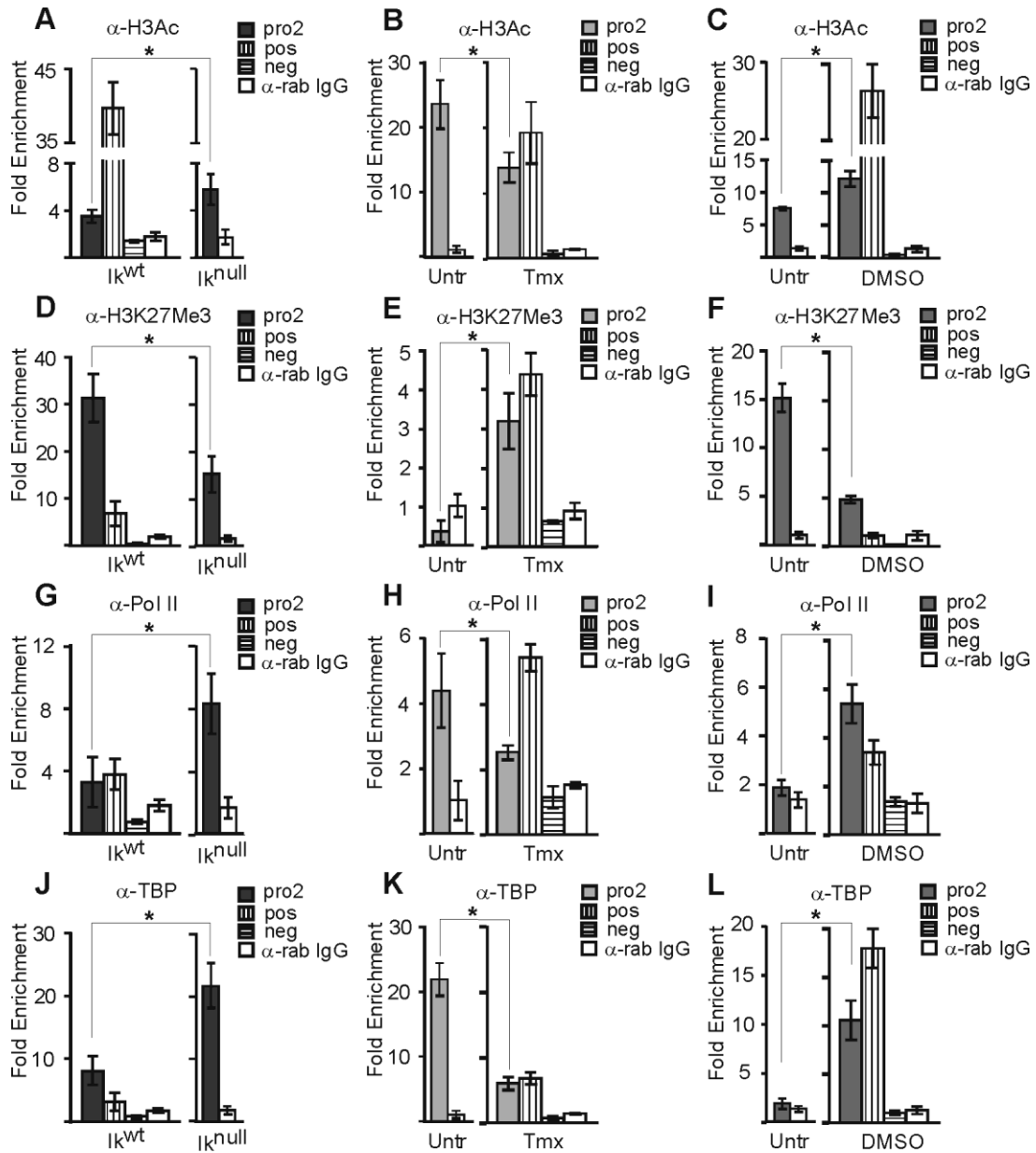
**Figure 3. Ikaros involvement in erythroid differentiation and *Hes1* regulation in 14.5 dpc fetal liver EryC**



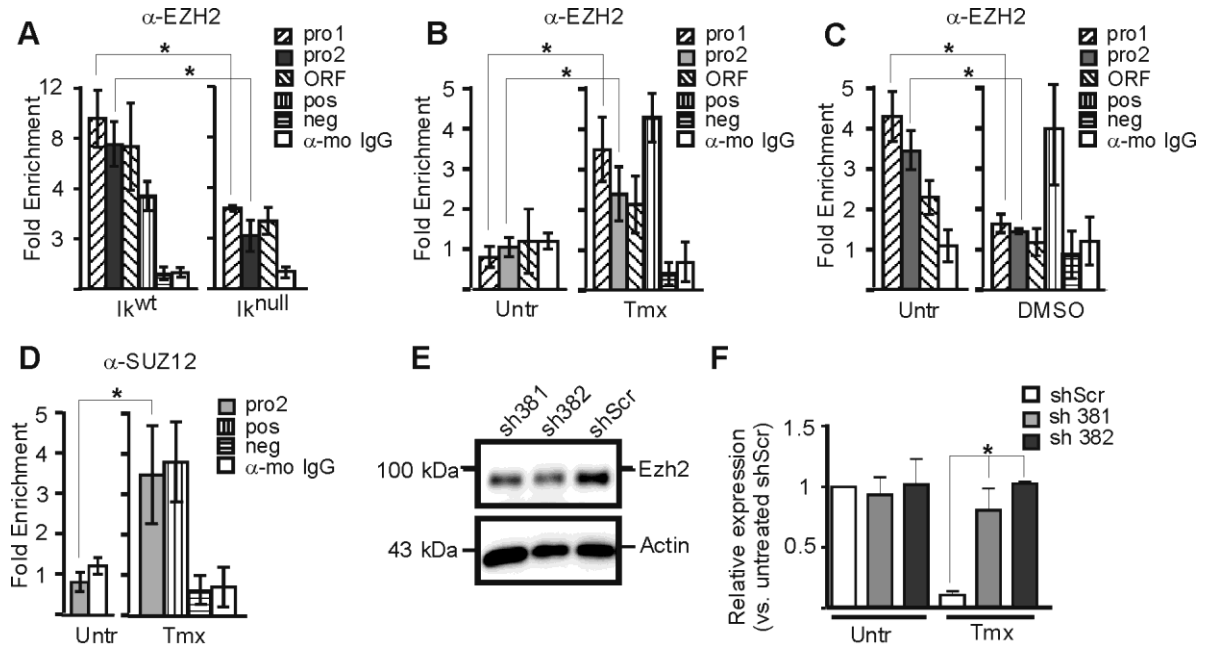
**Figure 4. Ikaros and GATA-1 recruitment to the *Hes1* promoter in EryC**



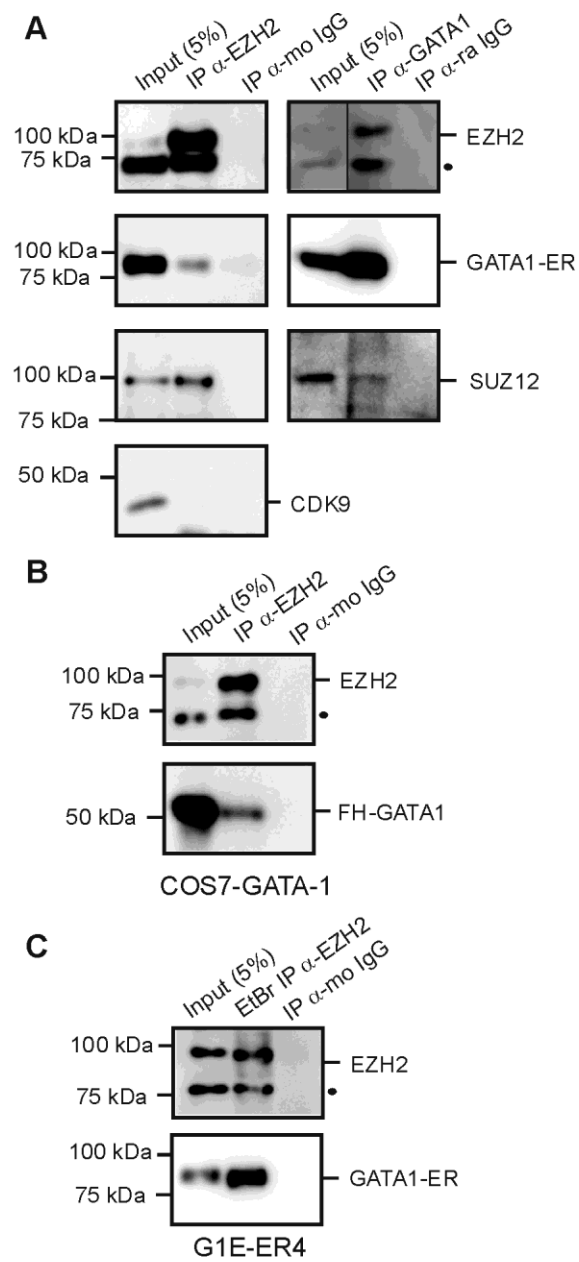
**Figure 5. Cofactor recruitment to the *Hes1* promoter in EryC**



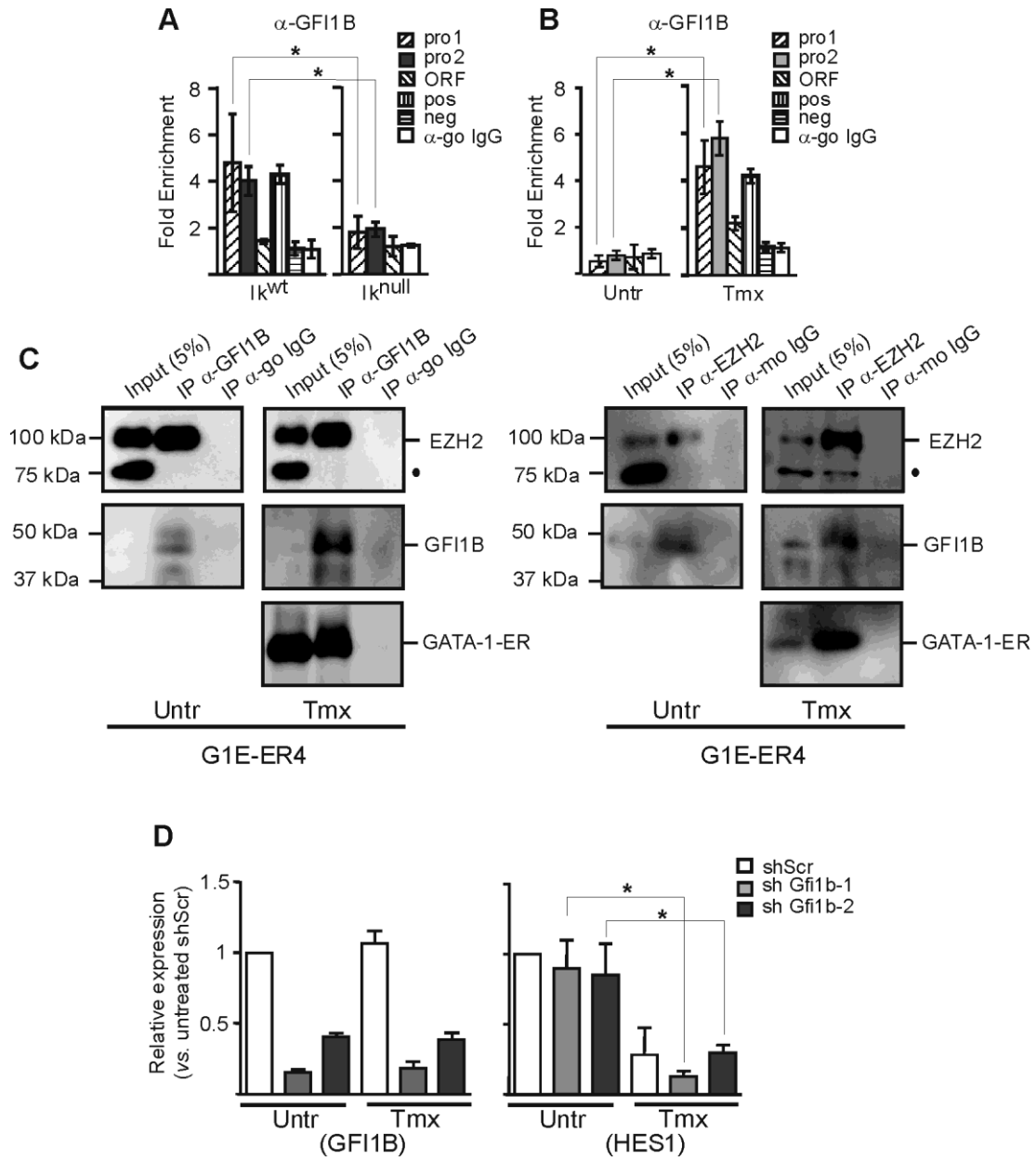
**Figure 6. Histone post-translational modifications and PIC assembly on the *Hes1* promoter in EryC**



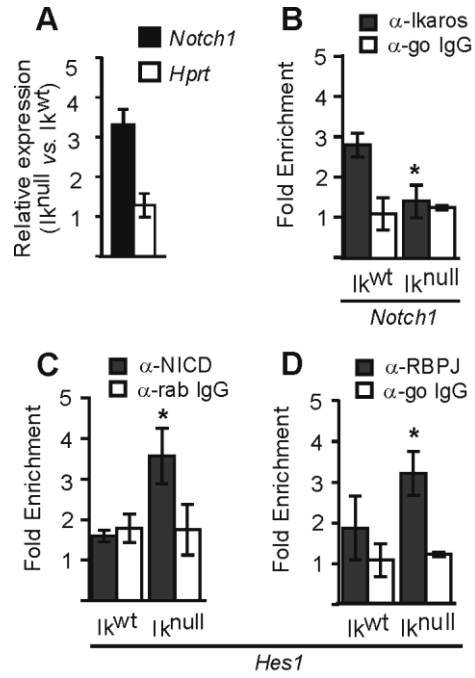
**Figure 7. PRC2 influence on the *Hes1* promoter repression in EryC**



**Figure 8. Immunoprecipitations of GATA-1 and PRC2 components**

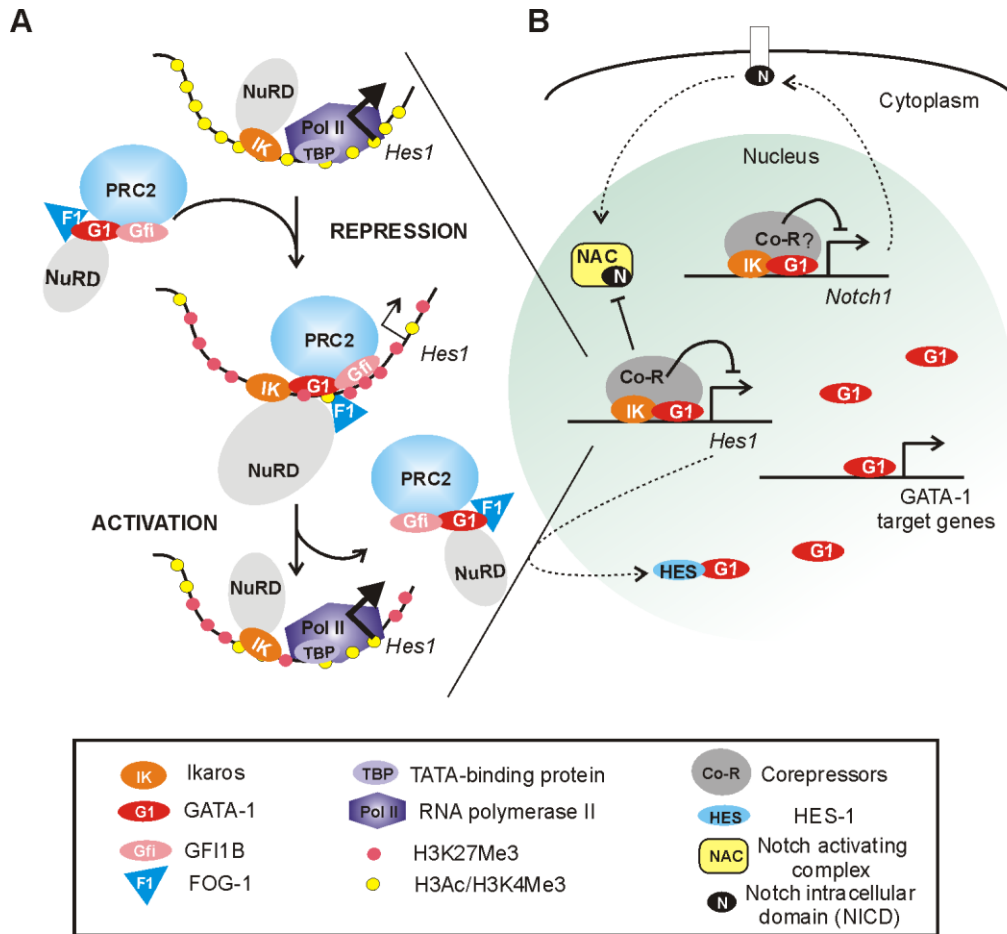


**Figure 9. GFI1B influence in the *Hes1* promoter repression in EryC**



**Figure 10. Ikaros influence on *Notch1* gene in EryC**





**Figure 11. Model: Influence of Ikaros and GATA-1 on the Notch pathway in erythroid cells**

## **Chapitre 3. Résultats 2**

### **Bimodal transcription activation during erythropoiesis : Ikaros controls the expression of Notch target genes and thereby, influences cell homeostasis**

Participation majoritaire pour la conceptualisation des expériences, la production des résultats. L'interprétation des résultats et la rédaction du manuscrit ont été faites avec mon directeur de thèse.

**Bimodal transcription activation during erythropoiesis : Ikaros controls the expression of Notch target genes and thereby, influences cell homeostasis**

Lionel Mavoungou<sup>1</sup>, Stefania Bottardi<sup>1</sup>, Helen Pak<sup>1</sup>, Farah A. Zmiri<sup>1</sup>, Yahia A. Lakehal<sup>1</sup> and Eric Milot<sup>1#</sup>

<sup>1</sup> Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center and Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

# To whom correspondence should be addressed : Eric Milot, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center and Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

Running title: Ikaros and Notch signalling competition triggers bimodal gene activation

**Keywords :** Transcription, Ikaros, Notch signalling, chromatin, erythropoiesis, homeostasis

## ABSTRACT :

The Notch signalling pathway is a critical regulator in hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis. This pathway can promote the activation of different sets of genes according to the cell type or upon stress induction. It remains unclear how the set of genes activated in different conditions and cell type is defined. Ikaros was previously reported to delineate the repertoire of genes activated by Notch in T-cell lineage, and to influence the expression of *Notch1* and the Notch target gene *Hes1* in erythroid and lymphoid cells. In here, we assessed the relevance of the genetic link between Ikaros and Notch in the control of erythroid cell homeostasis. We demonstrated that the presence of Ikaros is required to prevent overexpression of *Bcl2l1* and *Cdkn1a* upon the Notch pathway activation. More precisely, we identified a novel bimodal transcriptional activation mechanism of gene regulation whereby Ikaros compete with Notch to maintain the expression of *Bcl2l1* and *Cdkn1a* at physiological levels. In the absence of Ikaros and particularly upon the Notch pathway activation, the chromatin binding of RBP-J $\kappa$  and the Notch Internal Cleaved Domain (NICD) forces the overexpression of *Bcl2l1* by endorsing an increased rate of transcription elongation and by influencing the nature of the transcription elongation complex recruited. A transcriptome analysis demonstrated that the bimodal transcriptional activation mechanism imposed by Ikaros and RBP-J $\kappa$ -NICD characterizes the expression of many other genes in erythroid cells and thereby, could influence several essential biological processes for erythroid cells production. Thus, we identified a bimodal mechanism of transcriptional activation whereby, Ikaros provides a controlled activation of different Notch-target genes to prevent their overexpression, which could disrupt normal hematopoiesis and favor malignancies.

## INTRODUCTION:

Notch signalling is particularly important for hematopoietic stem/progenitor cells interactions with their niche (environment) (1), and to influence accordingly cell proliferation, differentiation and apoptosis (2). Disruption or abnormal expression of Notch receptors (Notch 1 to 4) is therefore detrimental and can induce haematological malignancies (3, 4). Indeed, the abnormal regulation of the Notch pathway is common in T cell Acute Lymphocytic Leukaemia (T-ALL;(5-7)). Additionally, it is linked to multiple cases of Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL), a non-curable form of leukaemia characterised by the disruption of apoptosis mechanisms (8-11). Using patient samples, it has been demonstrated that impediment of the Notch pathway with  $\gamma$ -secretase inhibitors enhances apoptosis and thus, could provide a strategy against T-ALL progression (12) and CLL (13) However, complications related to such treatments (14) point to the necessity to improve this potential therapeutic strategy by: (i) acquiring additional insights on molecular mechanisms involved in the Notch pathway regulation and (ii) establishing the importance of Notch in control of hematopoietic cell apoptosis, which has been linked to the increased expression of specific genes coding for factors involved in regulation of apoptosis, in particular *Bcl2l1* that encodes the anti-apoptotic factor *Bcl2l1* that encodes the anti-apoptotic factor Bcl-X<sub>L</sub> (15, 16).

The precise regulation of *Bcl2l1* expression is critical in hematopoietic cells. Indeed, when overexpressed, Bcl-X<sub>L</sub> can act as an oncogene and collaborate with other factors such as c-Myc to induce leukaemia (17). Additionally, *Bcl2l1* overexpression characterises *Polycythemia vera* with JAK2V617F mutation (18), a form of myeloproliferative neoplasm

characterized by the overproduction of erythroid cells (18, 19). Alternatively, *Bcl2l1* down-regulation is common to myelodysplastic syndrome with refractory anemia (20) and the conditional knockout of *Bcl2l1* in mouse hematopoietic cells results in severe anemia (21). In fact, in erythroid cells Bcl-X<sub>L</sub> is the primary regulator of apoptosis (22). Then the transcription factor GATA1, which is required for differentiation of erythroid cells, is a critical regulator of *Bcl2l1* expression (23). Consequently, in absence of GATA1 erythropoiesis is blocked at the proerythroblast stage of differentiation and it is characterized by an increased in apoptosis (24, 25).

We previously reported that GATA1 and the tumour suppressor Ikaros can interact together and collaborate to regulate different genes including *Notch1* as well as the Notch target gene *Hes1*, during erythropoiesis (26-29)(Bottardi et al., submitted). Ikaros is reported to influence apoptosis in erythroid cells (30) and to participate in *Bcl2l1* regulation in lymphoid cells (31). The potential implication of Ikaros in *Bcl2l1* regulation in hematopoietic progenitors and erythroid cells remains to be determined.

Ikaros is best known for its importance during lymphopoiesis since mice homozygous for the Ikaros null mutation (*Ik*<sup>null</sup>) are characterized by severe defects in lymphoid cell formation (32) and succumb to leukaemia or lymphoma with 100% penetrance (33, 34). However, Ikaros controls gene expression in hematopoietic progenitors and in the cells of different hematopoietic lineages (35-40). It contains four N-terminal zinc fingers involved in DNA binding, a conserved bipartite activation domain, and two C-terminal zinc-fingers involved in interactions with self and other proteins (28,41-45). The Ikaros encoding gene, *Ikzf1*, can produce several isoforms of this protein by mean of nascent RNA alternative

splicing (46). Ikaros isoforms differ in the number of N-terminal zinc fingers. Short Ikaros isoforms are reported to behave as dominant-negative proteins upon homodimerization with the long (functional) isoforms of Ikaros and upon heterodimerization with proteins interacting with Ikaros (46). The over-expression of dominant negative isoforms of Ikaros frequently characterized malignant haematopoiesis, especially childhood T- and B-ALL (47-52).

In addition to modulate gene expression by influencing chromatin and promoter organization of specific genes (46), Ikaros also controls the transcription elongation of target genes (27, 28) (Bottardi et al., submitted) and interacts with CDK9, the catalytic subunit of the Positive Transcription Elongation Factor b (P-TEFb) (28, 53). In mammals, P-TEFb is the main activity competent to reactivate the promoter-proximal paused Pol II and thus, to promote productive transcription elongation (53). P-TEFb can phosphorylate the C-terminal domain (CTD) of the large subunit of Pol II on Ser2 as well as the negative elongation units, DSIF and NELF (54). Thus, Ikaros favors the chromatin recruitment of Cdk9/P-TEFb and productive transcription elongation of target genes (27). Interestingly, although not required, GATA factors (including GATA1) facilitate this interaction between Ikaros and CDK9 (28).

Results presented here are providing the evidence that Ikaros is a positive regulator of *Bcl2l1* expression in erythroid cells, and additionally, it is required to avoid *Bcl2l1* overexpression upon Notch pathway induction, which otherwise is disrupting apoptosis control and, consequently, can promote hematopoietic malignancies. Indeed, Ikaros and Notch

are both favouring high levels of *Bcl2l1* expression but in erythroid cells, the binding of RBP-J $\kappa$  transcription factor and the Notch internal cleaved domain (NICD) to *Bcl2l1* is prevented by Ikaros. In the absence of Ikaros and particularly upon the Notch pathway activation, the chromatin binding of RBP-J $\kappa$  and NICD forces the overexpression of *Bcl2l1* by endorsing the promoter reorganization and influencing the nature of the transcription elongation complex recruited. This “bimodal mechanism of transcription activation” whereby Ikaros and RBP-J $\kappa$  are competing to activate genes was also detected at the *Cdkn1a* gene (P21<sup>CIP/WAF</sup> encoding gene), another regulator reported to be critical in erythroid cells (55). Finally, a genome wide analysis demonstrated that the Ikaros- and RBP-J $\kappa$ -NICD-dependent bimodal expression pattern found at *Bcl2l1* and *Cdkn1a* also characterizes other genes in erythroid cells.

## **RESULTS AND CONCLUSION:**

### **The influence of Ikaros on erythroid cell homeostasis is related to the increased expression of Bcl-X<sub>L</sub> and P21<sup>CIP/WAF1</sup>**

First, we assessed whether Ikaros could influence the regulation of few genes encoding factors critical for the control of apoptosis or proliferation in EryC. Among others, we tested *Bcl2l1*, which encodes the anti-apoptotic factor Bcl-X<sub>L</sub>, an important regulator of apoptosis in EryC, and *Cdkn1a* that encodes P21<sup>CIP/WAF</sup>, a regulator of proliferation in stress conditions in different cells, including EryC (56). These genes were also selected since their expression is reported to be affected by the Notch pathway (4, 57, 58). According to the erythroid differentiation markers CD71 and Ter119 (59), fetal liver EryC were sorted in 4 populations,



P1 to P4 (Fig. 1A, 1B). As indicated in Figure 1C and Supp Fig 1A, the expression of *Bcl2l1* and *Cdkn1a*, was dramatically increased during EryC differentiation (Fig. 1C; Fig S1A). Interestingly, Ikaros is involved in the regulation of *Bcl2l1* and *Cdkn1a* since their expression is significantly enhanced when Ikaros is absent ( $\text{Ik}^{\text{null}}$  vs.  $\text{Ik}^{\text{WT}}$  EryC; Fig. 1D, 1E).

These results and the importance of *Bcl2l1* in the control of apoptosis in EryC ((60); and Fig. 1F, 1G; Fig. S1B) led us to investigate the influence of Ikaros on apoptosis in these cells. The influence of Ikaros on apoptosis control in EryC was assessed with the  $\text{Ik}^{\text{WT}}$  or  $\text{Ik}^{\text{null}}$  fetal liver EryC, treated or not with cisplatin to induce apoptosis. The monitoring of apoptosis by Annexin V and determination of the mitochondrial trans-membrane potential with CMX-Ros indicated that, in presence but also in absence of the cisplatin treatment, percentage of EryC undergoing apoptosis was lower in  $\text{Ik}^{\text{null}}$  than in  $\text{Ik}^{\text{WT}}$  cells (Fig. 1H, 1I; Fig. S1C). Thus, like in bone marrow cells (30), the survival of EryC extracted from fetal liver is improved in the absence of Ikaros ( $\text{Ik}^{\text{null}}$  vs  $\text{Ik}^{\text{WT}}$ ; Fig. 1H, 1I). This survival increase correlates with the enhancement of *Bcl2l1* expression in the  $\text{Ik}^{\text{null}}$  EryC.

### **Ikaros is critical for the organization of distinct *Bcl2l1* and *Cdkn1a* regulatory loci**

ChIP-seq data in distinct lineages, notably pro-B lymphocytes (Pro-B cells) and Double Positive T lymphocytes (DP T cells) have shown that Ikaros was directly recruited to *Bcl2l1* and *Cdkn1a* genes but also that Ikaros was recruited as several loci throughout these genes. This recruitment was detected as well at the promoter as at distinct localizations inside the Open Reading Frame (ORF) (Fig. 2A). To determine whether Ikaros and the RBP-J $\kappa$ -NICD could compete to regulate different genes and thereby,

influence homeostasis of hematopoietic cells, we investigated their influence on the *Bcl2l1* and *Cdkn1a* genes in fetal liver EryC (at 14.5 day *post coitus*).

The analysis of *Bcl2l1* and *Cdkn1a* gene sequences led to the identification of consensus DNA-binding sequences that can be used either by Ikaros or RBP-J $\kappa$ -NICD (Fig 2B). Interestingly, the expression of NICD is enhanced in the absence of Ikaros whereas RBP-J $\kappa$  expression remains constant (Fig. 2C). The recruitment of Ikaros as well as RBP-J $\kappa$  and NICD to *Bcl2l1* and *Cdkn1a* genes was assessed by Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay in EryC (Fig. 2D-F; Fig. S2A, S2B). Interestingly, we detected Ikaros recruitment inside *Bcl2l1* ORF, at a potential internal enhancer sequence localized at +2.2 kb after the gene TSS, just next to an Ikaros consensus DNA-binding sequence. At *Cdkn1a* locus, Ikaros recruitment was detected at the gene promoter. Thus, Ikaros was recruited to these genes in Ik<sup>WT</sup> EryC. However, in Ik<sup>null</sup> EryC the absence of Ikaros resulted in the significant augmentation of RBP-J $\kappa$  and NICD recruitment thus, suggesting that Ikaros precludes the efficient RBP-J $\kappa$ -NICD recruitment and hence, regulation of the *Bcl2l1* and *Cdkn1a* genes when it is present in EryC. The Ikaros-restrictive binding of RBP-J $\kappa$ -NICD at these genes was further supported by results obtained with the sequential ChIP (re-ChIP) assay, which suggests that NICD is only recruited to the *Bcl2l1* promoter when Ikaros is absent (in Ik<sup>null</sup> EryC) (Fig. 2G).

GATA1 regulates *Bcl2l1* and *Cdkn1a* genes in EryC, and it also interacts with Ikaros (55, 61). The potential influence of Ikaros on GATA1 recruitment to *Bcl2l1* and *Cdkn1a* genes was therefore assessed in Ik<sup>WT</sup> and Ik<sup>null</sup> fetal liver EryC. We found that, like previously reported at other genes (26, 29) , the absence of Ikaros impairs the chromatin recruitment of GATA1 at *Bcl2l1* and *Cdkn1a* in EryC (Fig. 2H; Fig. S2C). However, we demonstrated that

Ikaros can bind to *Bcl2l1* and *Cdkn1a* genes even when GATA1 is absent in the nucleus of the erythroid model cell line G1E-ER4 (Fig. S2D, S2E), thus indicating a preeminent role for Ikaros in the organization of distinct loci of these genes (*Bcl2l1* +2.2kb region, *Cdkn1a* promoter) in EryC. Similarly, the recruitment of Mi2 (remodelling subunit of the NuRD (62)), which is an interacting partner of Ikaros (63) and GATA1 (64, 65), was only significant recruited to the analyzed loci of these genes in the Ik<sup>WT</sup> EryC whereas the recruitment of BRG1, a chromatin remodelling factor that can interact with IKAROS and GATA1 (42, 66), remains constant with or without Ikaros (Fig. 2H, 2I). Next, we assessed whether the increased expression of *Bcl2l1* and *Cdkn1a* in Ik<sup>null</sup> EryC could be related to a variation of the chromatin organization at these loci. ChIP assay was used to test whether Ikaros could influence the enrichment of the histone post-translational modifications H3K4m3 (67), which usually characterized transcriptionally active promoters, and H3K27me3, which is associated with Polycomb repressed transcription (67). Although Ikaros and GATA1 can promote the chromatin recruitment of the H3K27 methyltransferase EZH2 (29, 68), no significant variation of H3K27me3 could be detected at the *Bcl2l1* +2.2kb locus and *Cdkn1a* promoter in Ik<sup>WT</sup> vs. Ik<sup>null</sup> EryC (Fig. 2K). The H3K4me3 enrichment to these genes Transcriptional Start Sites (TSS) is not influenced by the presence or absence of Ikaros (Fig. 2J). Since Ikaros was previously found to influence transcription elongation in hematopoietic cells (26-28), to find out how Ikaros presence or absence could influence the expression levels of *Bcl2l1* and *Cdkn1a* genes, we then probe their chromatin of open reading frame (ORF). The enrichment of H3K79me2 and H3K36me3 was particularly tested since these marks are characteristic of particular mechanisms of transcription elongation. We found that H3K36me3 is highly enriched in the *Bcl2l1* and *Cdkn1a* ORF in the Ik<sup>WT</sup> but not in the Ik<sup>null</sup> EryC. Thus, in absence

or presence of Ikaros, the chromatin of these promoters is characterized by H3K4me3 but not by H3K27me3. However, the detection of H3K36 and H3K79 methylation suggests that the mechanisms of transcription elongation could be different when Ikaros is present or not at these target genes.

### **Expression levels and preferential Super Elongation Complex (SEC) complex implicated.**

Next we investigated the mechanism of transcription elongation of *Bcl2l1* and *Cdkn1a* genes in Ik<sup>WT</sup> and Ik<sup>null</sup> EryC. Indeed, the chromatin variations detected at the target genes are related to mechanism of transcription elongation, and Ikaros can interact and control the recruitment of positive-transcription elongation factor B (P-TEFb) to specific genes and hence, participate in the control of promoter-proximal paused Pol II at these genes (27, 28)( Bottardi et al., submitted). Interestingly, the presence of Ikaros (Ik<sup>WT</sup> EryC) or RBP-Jκ-NICD (Ik<sup>null</sup> EryC) at *Bcl2l1* and *Cdkn1a* promoters did not significantly affect the recruitment of CDK9/P-TEFb and Ser2 phosphorylated Pol II (Pol II CTD) (Fig. 3A, 3B; Fig. S3A, S3B). This result suggests that, unlike demonstrated at other genes (Bottardi et al., submitted), release of promoter-proximal paused Pol II at *Bcl2l1* and *Cdkn1a*, is not impaired in the absence of Ikaros.

The highly active fraction of the P-TEFb is associated to the Super Elongation Complexes (SECs; SET1/MLL, COMPASS-like complex) in metazoan (69), and recent reports indicated that the ability of the different H3K4 methyltransferases included into the SECs can be variable and hence, influences differently the chromatin organization, and potentially the transcription elongation (70-72). Indeed, in addition to include the P-TEFb, the SECs also contain the ELL (11-19 Lysine-Rich Leukaemia) factor that influences the transcription elongation rate (69, 73, 74). Thus, we assessed whether the expression

variation detected when Ikaros or RBP-J $\kappa$ -NICD is bound to *Bcl2l1* and *Cdkn1a* promoters could correlate with a modification in the SEC recruited to these genes. In mammalian cells six different SECs have been identified (69). Based on their K3K4 methyltransferase activity as well as their homology with the *Drosophila* COMPASS complexes, the mammalian SECs can be ordered in three groups: the SET1A and SET1B group; the MLL1 and MLL2 group; and the MLL3 and MLL4 group (69). In addition to the SET1/MLL methyltransferase included in each SEC, few other proteins are specific to either one of the three groups of SECs. Among these are CFP-1, a factor specific to the SET1A and SET1B containing complexes; HCF-1, which is specific to the SET1A, SET1B, MLL1 and MLL2 complexes; and UTX, a H3K27 demethylase associated with the MLL3 and MLL4 complexes (75). To determine whether the SEC recruitment could vary when Ikaros or RBP-J $\kappa$ -NICD was bound to *Bcl2l1* and *Cdkn1a* chromatin in EryC, ChIP assay was conducted with antibodies specific for these factors. First, to assess the presence and frequency of SEC loaded at the target genes, the detection of RBBP5, a factor common to all SECs (69) was determined by ChIP assay at the gene TSS and within the ORF. Like CDK9 and Pol II, a tendency towards the increment of RBB5 occupancy could be detected in the ORF of target genes in Ik<sup>null</sup> EryC but, this variation was not significant (Fig. 3C). The nature of the SEC loaded when Ikaros or RBP-J $\kappa$ -NICD is present, was then determined by the detection of factors specific to the different groups of SEC (see above). Interestingly, the switch from Ikaros to RBP-J $\kappa$ -NICD recruitment and variations in levels of target gene expression correlated with the modification of the SEC preferentially recruited to these genes. Indeed, UTX and MLL4 are enriched to *Bcl2l1* and *Cdkn1a* when Ikaros is present (Fig. 3D, 3E; Fig. S3C, S3D) but, when RBP-J $\kappa$ -NICD is bound to these genes, HCF-1, CFP-1 and SET1A are instead significantly enriched (Fig. 3F-H; Fig. S3E). The expression of these factors is not modified in the absence of Ikaros (Fig. S3F). The preferential recruitment of some SECs over others when Ikaros or RBP-J $\kappa$  are recruited to *Bcl2l1* and

*Cdkn1a* genes is also supported by three other lines of evidences. First, the re-ChIP (sequential ChIP; (76)) analysis made demonstrated the co-recruitment of RBBP5 and UTX but not CFP-1 I $k^{WT}$  EryC, and the co-recruitment on RBBP5 and CFP-1 but not UTX in I $k^{null}$  EryC (Fig. 3I). Second, the co-immunoprecipitation assay (co-IP) led us to detect the interaction of Ikaros with MLL4, UTX and MLL1 but not with SETD1A in EryC (Fig. 3J; Fig. S3G, S3H). Interestingly, using the same conditions also in EryC, we could detect the co-IP of NICD with MLL4, MLL1 but also with SETD1A (Fig. 4A, 4B). Thus, the results presented here strongly suggest the preferential interaction of Ikaros with some of the SECs over others in fetal liver EryC, and that the increased expression of *Bcl2l1* as well as *Cdkn1a*, which is observed when RBP-J $\kappa$ -NICD is recruited, correlates with the preferential binding of the SETD1A-containing SEC over the MLL4-containing SEC. Third, the enrichment of H3K79me2, which is deposited by DOT1L, is detected when RBP-J $\kappa$ -NICD is recruited and DOT1L is a frequent partner of the SETD1A and SETD1B SECs but less frequently, of the MLL-containing SECs (Fig. 4C) (77). Furthermore, H3K79me2 is reported to antagonize the H3K36me3 deposition (by SETD2) during transcription elongation (78), and H3K36me3 is present at the ORF of the target genes when MLL4 is abundant but not when it is SETD1A (Fig. 4D).

To assess whether the variation in expression could be related to a modification of the rate of the RNA Pol II progression within the ORF, the EryC were treated for two hours with the CDK9 (catalytic subunit of P-TEFb) inhibitor Flavopiridol (FVP; at 100 nM(79)), which blocks transcription elongation (Fig. 4E, time “0”). After this treatment the cells were “washed” and cultured without FVP, which results in the partial release of promoter-proximal paused Pol II and allows transcription elongation (79). The production of primary transcripts at different time points was quantified by RT-qPCR. Four regions located within the *Bcl2l1* ORF were selected for this analysis (Fig. 2A). The regions +1 Kb and +60 Kb are located within exons and thus, will provide an indication of the accumulation of primary

transcripts but also, mRNA. However, the regions +20Kb and +30Kb will be indicative of the primary transcript production only (but not mRNA accumulation) since they are located in an intron. At the time point t=60 minutes after the FVP wash, the accumulation of RNA molecules covering the gene ORF regions analyzed was greater in the  $Ik^{null}$  EryC (Fig. 4E), suggesting that when RBP-J $\kappa$ -NICD and the SETD1A SEC are recruited to *Bcl2l1*, the rate of transcription elongation is greater than when Ikaros and the MLL4 SEC occupy this gene. This was further supported by the abolition of the variation of *Bcl2l1* primary transcript production (at 60 minutes) upon the addition of camptothecin (Fig. 4F), a Topoisomerase 1 inhibitor reported to decrease the rate of elongation to 1kb/minute (80). Thus, the analysis of primary RNA synthesis suggest that the *Bcl2l1* rate of transcription elongation is greater in the  $Ik^{null}$  EryC, when RBP-J $\kappa$  and NICD are recruited. These results suggest that the control of *Bcl2l1* gene rate of elongation by Ikaros vs RBP-J $\kappa$ -NICD is critical to control the overall expression level of *Bcl2l1* in haematopoietic cells.

### **Ikaros protects from Notch signalling overactivation**

The results presented above suggest that Ikaros acts as a regulator, that prevents the “over-activation” of specific target genes of the Notch pathway, which otherwise could promote haematopoiesis disruption and malignancies. To test this possibility, fetal liver EryC were co-cultured with the bone marrow-derived stromal cell line OP9 expressing or not the Notch ligand Delta-Like 1 (respectively, OP9-DL1 cells or OP9 cells) (Fig. 5A) (81). After 48 hours of this co-culture, more than 60% of the fetal liver cells were Ter119+ (EryC; Fig. S5). At this time point, no significant variation in the percentage of Ter119+ cells was detected when we compared the fetal liver cells cultured on the OP9 cells or the OP9-DL1 cells.

The characterization of *Bcl2l1* regulation was made when the EryC are co-cultured with the OP9 cells in order to define whether this co-culture system could be used to study the potential influence of the bimodal transcription activation imposed by Ikaros and RBP-Jκ-NICD on the EryC transcriptome. When fetal liver EryC were cultured 48 hours with the OP9 cells, the expression levels of *Bcl2l1* and *Cdkn1a* were increased in *Ik<sup>null</sup>* compared to *Ik<sup>WT</sup>* EryC, thus indicating that such as detected in non-cultured fetal liver EryC (see above), the absence of Ikaros also resulted in the increased expression of these genes. Interestingly, the expression of these genes was only mildly affected when *Ik<sup>WT</sup>* EryC were cultured with the OP9-DL1 cells *i.e.*, when the Notch pathway was activated by the DL1 ligand (Fig. 5B, 5C), but the expression of *Bcl2l1* and *Cdkn1a* was significantly enhanced in *Ik<sup>null</sup>* EryC cultured with the OP9-DL1 cells (Fig. 5B, 5C).

The analysis of some critical transcriptional regulators of *Bcl2l1* was produced by ChIP. As expected, the NICD recruitment was significantly improved in the absence of Ikaros at the +2.2kb locus (Fig. 5D, 5E). The culture of the EryC population with the OP9 or the OP9-DL1 cells did not affect the preferential recruitment of MLL4 to *Bcl2l1* when Ikaros was present, or SETD1A, when RBP-Jκ-NICD was replacing Ikaros (in *Ik<sup>null</sup>* EryC) (Fig. 5F, 5G). The MLL4 enrichment to *Bcl2l1* did not significantly change in the *Ik<sup>WT</sup>* EryC cultured with the OP9-DL1 but, the SETD1A binding was enhanced in the *Ik<sup>null</sup>* EryC cultured with OP9-DL1 vs. OP9 cells (Fig. 5F, 5G). Since H3K79me2 is deposited by DOT1L, a component of SETD1A and SETD1B SECs but not of the MLL containing SECs (82), we looked for the enrichment of this histone modification at *Bcl2l1* in the *Ik<sup>WT</sup>* and *Ik<sup>null</sup>* EryC cultured with OP9 or OP9-DL1. The enrichment of H3K79me2 followed the increased recruitment of SETD1A in the different culture that we made (Fig. 5H), and hence, support the preferential recruitment of the SETD1A when Ikaros is replaced by RBP-Jκ-NICD at *Bcl2l1* gene. Alternatively, the enrichment of H3K36me3, which is deposited by SETD2 (83), correlated with MLL4 enrichment at the *Bcl2l1* ORF (Fig. 5I). Thus, the



bimodal transcriptional activation of *Bcl2l1* imposed by Ikaros and RBP-J $\kappa$ -NICD, is maintained when the EryC are cultured with OP9 and OP9-DL1 cells. Furthermore, these results demonstrate that the *Bcl2l1* response to the Notch pathway activation is significantly increased when Ikaros is absent. The increased of *Bcl2l1* expression imposed by RBP-J $\kappa$ -NICD when Ikaros is absent is most likely not limited to EryC since, the increased expression of *Bcl2l1* has been detected in double positive thymocytes of Ik<sup>null</sup> mice (31), and in a myeloid cell line whereby the dominant negative isoform Ik6 was overexpressed (84). Furthermore, the *Bcl2l1* (Bcl-X<sub>L</sub>) overexpression can collaborate with oncogenes like c-Myc to promote leukaemia (17). Thus, the maintenance of the bimodal mechanism of transcription imposed by Ikaros and Notch on *Bcl2l1* is most likely critical to avoid deregulation of haematopoiesis and leukaemia.

### **Effect of the bimodal transcriptional activation imposed by Ikaros vs RBP-J $\kappa$ -NICD on the transcriptome of hematopoietic cells.**

To determine whether the gene bimodal regulation imposed by Ikaros and RBP-J $\kappa$ -NICD regulates multiple genes in hematopoietic cells when the Notch pathway is activated or not, we used fetal liver EryC and performed a comparative analysis of High-Throughput Sequencing (RNA-Seq). To identify genes with an increased expression when Ikaros is depleted in EryC, we compared the results obtained when the Ik<sup>null</sup> and Ik<sup>WT</sup> EryC are cultured on OP9 cells. Similarly, to determine whether Ikaros depletion could have a general effect and influence the EryC transcriptome when the Notch pathway is activated by external signals, we cultured the Ik<sup>null</sup> and Ik<sup>WT</sup> EryC on OP9-DL1 cells and searched for genes differentially expressed in Ter119+ cells. For each analysis, we sorted genes with a log<sub>2</sub> fold change  $\geq 1$  (e.g., expressed 2 times more in Ik<sup>null</sup> compared to Ik<sup>WT</sup> EryC). The Ik<sup>null</sup>-OP9 versus Ik<sup>WT</sup>-OP9 analysis indicated that 1260 genes are overexpressed in the Ik<sup>null</sup> EryC ( $\beta+\chi$ ; Fig 6A), whereas the

$Ik^{null}$ -OP9-DL1 versus  $Ik^{WT}$ -OP9-DL1 analysis specified that 1491 genes are overexpressed in the  $Ik^{null}$  EryC ( $\alpha+\chi$ ; Fig. 6A). The high number of differentially expressed genes suggests a major effect of Ikaros on the EryC transcriptome. The majority of genes overexpressed are common to both comparative analyses (1052 genes;  $\chi$  set of genes), suggesting that the expression of these genes is enhanced by the absence of Ikaros independently of the extrinsic Notch signalling (Fig. 6A). Genes differentially expressed were analyzed with the bioinformatic clustering software DAVID (85) to define which cellular processes are the most likely affected by Ikaros depletion. The biological processes with overexpressed genes in Ikaros deficient EryC are various, and since a large number of genes are overexpressed in both culture conditions, i.e., EryC cultured with OP9 or, cultured with OP9-DL1 cells, most biological processes identified with the largest p values are common to both comparative analyses (Fig. 6B, 6C). Interestingly, the analyses of the effect of Ikaros mutation when there is external Notch signalling or not, pointed to the significant increased expression of multiple genes important for biological functions characteristic of other hematopoietic lineages or cell types, such as: inflammation, various processes specific to lymphoid cells and, angiogenesis (Fig. 6B, 6C). We also identified 208 genes ( $\beta$  set of genes) specifically overexpressed in  $Ik^{null}$  EryC (vs  $Ik^{WT}$  EryC) when cultured with OP9 cells, but not when cultured with OP9-DL1 cells (Fig. S6A), and 439 genes overexpressed uniquely in  $Ik^{null}$  EryC (vs  $Ik^{WT}$  EryC) ( $\alpha$  set of genes) when there is an external Notch signalling (cultured with OP9-DL1 cells but not with the OP9 cells) (Fig. S6B). Interestingly, many of the 208 genes specifically overexpressed in  $Ik^{null}$  EryC when cultured with OP9 cells can influence cell to cell communication or ion transport/homeostasis (Fig. 6D), and among the 439 genes that are overexpressed in  $Ik^{null}$  EryC only when there is an external Notch signalling (cultured on OP9-DL1 cells), many genes are involved in biological processes characteristic of leukocytes and/or lymphocytes activities including differentiation, activation, proliferation and inflammation (Fig. 6E). Thus, these results suggest that Ikaros is required

in EryC to prevent the activation of multiple genes that normally characterize leukocytes and/of lymphocytes. Hence, these results suggest that Ikaros is involved in the definition of EryC transcriptome and cell identity.

We then made an attempt to identify genes with the distinctive expression pattern detected at *Bcl2l1* and *Cdkn1a* (see above), which is characterized by an additive transcriptional activation when the extrinsic Notch signalling is combined with the absence of Ikaros (Log2 fold change  $\geq 1$ ) (Fig. 6F). The expression of this group of genes is likely to be disturbed in hematopoietic cells when Ikaros is mutated or abnormally regulated, and the Notch pathway is activated after a stress such as inflammation, hypoxia and different forms of leukaemia.

The RNA-Seq analysis also indicated that the *Bcl2l1* expression is characterized by the additive transcriptional activation when the extrinsic Notch signalling is combined with the absence of Ikaros since *Bcl2l1* expression is increased in  $\text{Ik}^{\text{null}}$  EryC (vs  $\text{Ik}^{\text{WT}}$  EryC) cultured with the OP9 cells (log2fold difference (0.54) = 1.45 fold difference), and in the  $\text{Ik}^{\text{null}}$  EryC (vs  $\text{Ik}^{\text{WT}}$  EryC) cultured with the OP9-DL1 cells (log2fold difference(0.59) = 1.50 fold difference). However, the fold differences that we obtained are below the cut off that we chose for the analysis of the RNA-Seq results, hence *Bcl2l1* is beyond the list of represented genes but nonetheless, shows a tendency of expression variation corresponding to the pattern of bimodal transcriptional activation. The genes included in this list can be separated in distinct groups according to the cellular function that they influence. Interestingly, many membrane proteins *Ltc4s*, *Lox*, *Olfml3*, *Itgax* or *Mmp13* are included in the list of gene with the particular pattern of bimodal transcriptional activation. The abnormal regulation of these genes is likely to modify the cell interaction with the niche. Furthermore, the effect of the overactivation of some of these genes in EryC, like *Ggt5*, *Cxcl16*, *Ltc4s*, *IL6* and *C1qa*, is unclear since their expression is normally associated with inflammation (86, 87). Similarly, the overexpression of *Aldh1a3*, *Cxcl16*,

Ltcs4, Lox, Sema4ac, Olfm13, Itgax and Mmp13 should promote metastasis (88-93). Thus, these results suggest that upon disruption of Ikaros and extracellular Notch signalling, the EryC transcriptome gets disorganised which should promote the overall loss of the cell identity.

Therefore, in here we are providing the first evidence of a bimodal mechanism of gene activation whereby, Ikaros provides a controlled activation of different Notch-target genes to prevent their overactivation, which could disrupt normal haematopoiesis and favor malignancies. Based on results that we obtained, we are proposing a model (Fig. 7) whereby Ikaros and the RBP-J $\kappa$  along with NICD are competing to activate some of the Notch target genes including *Bcl2l1* and *Cdkn1a* genes in EryC. When Ikaros is present, the Pol II elongation complex is characterized by the recruitment of MLL4 and UTX, and the ORF chromatin is characterized by H3K36me3, thus suggesting that the SEC containing MLL4 is a preferential accompanying partner of Ikaros at *Bcl2l1* and *Cdkn1a* in EryC. Alternatively, when Ikaros is absent, the recruitment of RBP-J $\kappa$ -NICD is enhanced and it is accompanied by SETD1A, CFP-1, HCF-1. The chromatin of the gene ORF is then marked by H3K79me2, which is deposited by the methyltransferase DOT1L a component of the SETD1A or SETD2B SEC. Thus, our results suggest that the rate of elongation is enhanced when we detect multiple factors characteristic of the SETD1A containing SEC. It has been reported before that H3K79me2 deposition could favor the progression of Pol II along the gene ORF, hence we posit that the bimodal transcriptional activation imposed by Ikaros and Notch is a mechanism of expression level control whereby the determination of the rate of elongation is central. The overall goal of Ikaros in this bimodal transcriptional activation is to promote the expression of the target genes but at the same time, to prevent the overactivation of some of the Notch target genes which otherwise, could disrupt haematopoiesis and induce malignancies.

## **Material and Methods :**

### **Mouse line**

$Ik^{null}$  mouse model is characterized by the deletion of the c-terminal part of Ikaros which results in Ikaros protein instability then absence of Ikaros protein in the whole organism (32). Heterozygous  $Ik^{null}$  male and female were bred and homozygote  $Ik^{wt}$  or  $Ik^{null}$  14.5 dpc fetal liver cells were isolated. Animal experiments were conducted in accordance with the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines and approved by the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal care committee.

### **Cell lines**

Fetal liver cells were isolated from E14.5 stage embryos, and resuspended in PBS. G1E-ER4 (GATA-1 null cell line expressing an inducible GATA-1-ER protein) (94) were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco) containing 13% Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma), 1.7% penicillin-streptomycin (PS; Wisent), 2U/mL erythropoietin (Eprex), 1.1 mM 1-thioglycerol (sigma M6145) and 0.5% conditioned medium from a kit ligand producing CHO cell line. To induce nuclear accumulation of GATA-1-ER, tamoxifen (Sigma) was added to the medium (final concentration: 1  $\mu$ M) for 24h.

For the OP9/OP9-DL1 coculture system. E14.5 embryos fetal liver cells were isolated and put on stromal OP9 or OP9-DL1 cells containing plate in a medium composed by  $\alpha$ -MEM (Gibco), 20% FBS (Sigma), 1% penicillin-streptomycin (PS; Wisent), 2U/mL erythropoietin (Eprex). The coculture was maintained 48 hours then fetal liver cells were isolated through a 40 $\mu$ m filter for following experiments. For elongation rate assay, fetal liver cells were treated for 2 hours with 100nM flavopiridol (FVP), then washed and collected at different times after FVP release. For cells with an additional Camptothecin

treatment, 15 minutes before FVP release, 10ng/ml Camptothecin were added to fetal liver cells, and after FVP release, 10ng/ml Camptothecin were maintained with incubated cells.

### **Assessment of Apoptosis**

Apoptosis was assessed with flow cytometry using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated annexin-V (BD Biosciences) or by mitochondrial transmembrane potential measurement, which was monitored with flow cytometry using the lipophilic fluorochrome chloromethyl-X-rosamine (CMXRos; Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions.

### **RT-PCR and quantitative RT-PCR**

Total RNA was isolated by Trizol (Invitrogen) and used for cDNA synthesis with oligo(dT) for mRNA or random primers for primary transcripts (pre-mRNA) and SuperScript Reverse Transcriptase III (Invitrogen). Semi-quantitative PCR or quantitative real-time PCR (qPCR) were carried out with specific primers (Table 1). The primer set specific for *Actb* or *RNU-2* were internal controls, respectively for mRNA and pre-mRNA whereas the primer set specific for *Hprt* was an additional control. The transcripts were either detected on agarose gel with AlphaImager (Cell Biosciences) (semi-quantitative analyses) or stained with SYBR Green (Invitrogen) and analyzed with the iCycler iQ™ (BioRad) system (quantitative analyses). For quantification, the equation of Pfaffl (95) was employed:

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

$E_{target}$ : target qPCR efficiency;  $E_{ref}$ : control qPCR efficiency; CP: crossing point;  $\Delta CP_{target}$ : CP deviation of reference sample vs. test sample target gene transcript;  $\Delta CP_{ref}$ : CP deviation of reference sample vs. test sample control transcript. Primers used are listed in table 1 and table 2.

Unpaired ‘Student’s t test’ was used to determine the levels of statistical significance (p-value).

### **Western blot analysis and protein Co- Immunoprecipitation**

Western Blot was performed as described previously (Ross et al, 2012). Antibodies used were : MLL1, GAPDH (Millipore); Ikaros (H-100), GATA-1 (N6), MI-2 (H-242), SETD1A (N-17), MLL4 (H-300), and RBPJ (D-20) (SantaCruz); H3K79me2 (Cell Signalling) and activated Notch1, RBBP5, UTX (Abcam).

Co-Immunoprecipitations (Co-IP) were carried out as described before (28). Antibodies used for protein Co-Immunoprecipitations are : H3K27me3 MLL1, (Millipore); Ikaros (H-100), GATA-1 (N6), MI-2 (H-242), SETD1A (N-17), MLL4 (H-300), BRG1 (H-88), Cdk9 (C-20) and RBPJ (D-20) (SantaCruz); H3K79me2 (Cell Signalling) and activated Notch1, RBBP5, UTX (Abcam).

### **Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and quantitative Real-Time PCR assays**

The ChIP assay was carried out following manufacturer’s instruction (Millipore) and as described previously (29). Antibodies used for ChIP were directed against H3K27me3, H3K4me3, H3K36me3, MLL1 (Millipore); Pol II CTD (Covance), Ikaros (E-20), GATA-1 (N6), MI-2 (H-242), SETD1A (N-17), MLL4 (H-300), BRG1 (H-88), Cdk9 (C-20) and RBPJ (D-20) (SantaCruz); H3K79me2 (Cell

Signalling) and activated Notch1, RBBP5, UTX, CFP-1 (Abcam).. Quantification was carried out according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (96) : Fold enrichment =  $2^{-[(Ct\ ChIP_{test} - Ct\ input_{test}) - (Ct\ ChIP_{control} - Ct\ input_{control})]}$

Ct: threshold cycle; Ct ChIP: Ct value for ChIP sample; Ct input: Ct value for input sample; test: primer set of interest; control: internal control primer set. Primers used are listed in table 1.

Unpaired 'Student's t test' was used to determine the levels of statistical significance (p-value).

### **Sequential ChIP**

For sequential ChIP assay, bound material from the first ChIP was eluted with 80  $\mu$ l of 50 mM Tris [pH 8.0], 10 mM EDTA, 1% SDS for 30 min at 37°C under constant agitation. The procedure was repeated twice. Eluates were pooled and diluted 10 times in dilution buffer (Millipore) and samples were subjected to a second immunoprecipitation, eluted and processed as previously reported (29).

### **Cell sorting**

14.5 dpc fetal livers cells were collected, washed and resuspended in PBS/5% heat-inactivated FBS (PBS/FBS). Cells were incubated for 30 minutes on ice with rat  $\alpha$ -Ter119,  $\alpha$ -rat fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated (BD Pharmingen) and phycoerythrin (PE)-conjugated  $\alpha$ -CD71 (Biolegends), then sorted by high-speed fluorescence-activated cell sorting (FACS Vantage; Becton Dickinson).

### **RNA-Seq**



Fetal Liver RNA was extracted by Trizol method followed by a purification with RNeasy column kit (Qiagen) as instructed by the manufacturer. cDNA was synthesized with SuperScript III (Invitrogen), purified (Cleanup kit, Qiagen) and a second strand synthesis was performed, then prepared for the Illumina sequencing following to standard procedures.

### **Detection of differentially expressed genes**

After a quality control using FASTQC, and realizing the alignment with TopHat. Differentially expressed genes, were detected using Cuffdiff and DESeq package. To consider biological variability, three biological replicates were used for each condition. A fold difference of at least two and and pvalue <0.05 were used as cutoffs to identify differentially expressed genes.

### **Figure legends :**

Figure 1 : IKAROS AFFECTS ERYTHROID CELL APOPTOSIS. **A,B)** FACS analysis of erythroid cells subpopulations according to the cell surface markers CD71 and Ter119. **C)** Expression analysis of the apoptosis regulator genes *Bax*, *Bak*, *Bcl-2* and *Bcl2l1* in P1, P2, P3 and P4 sub-populations; y axis: mRNA enrichment levels relative to P1 values; results were obtained from three independent experiments; **D)** Western Blots of Ik<sup>WT</sup> or Ik<sup>null</sup> total cell lysates obtained from E14.5 fetal liver EryC; **E)** Relative expression of *Bcl2l1*, *Cdkn1a* and *Hprt* (control) in fetal liver cells of Ik<sup>WT</sup> or Ik<sup>null</sup> mice, such as detected by RT-qPCR assay; *β-Actin* was used as the internal control; y axis: mRNA enrichment levels relative to Ik<sup>WT</sup> fetal liver cell values; the results were obtained from three

independent experiments; **F, H**) CMX-Ros apoptosis assay, **F**)  $I\kappa^{WT}$  EryC were treated with the Bcl-X<sub>L</sub> inhibitor ABT-737 at the indicated concentrations or with DMSO, as a control; **H**)  $I\kappa^{WT}$  and  $I\kappa^{null}$  EryC were treated for 24 hours with cisplatin at the indicated concentrations or with H<sub>2</sub>O as a control; these results were obtained from three independent experiments; **G, I**) Annexin V apoptosis assay; **G**)  $I\kappa^{WT}$  EryC were treated with Bcl-X<sub>L</sub> inhibitor ABT-737 at concentrations indicated or with DMSO as a control; **I**)  $I\kappa^{WT}$  and  $I\kappa^{null}$  EryC were treated for 24 hours with cisplatin or with H<sub>2</sub>O as a control ; results were obtained from three independent experiments. \*: p value  $\leq 0.05$ .

Figure 2 : IKAROS IS CRITICAL FOR *BCL2L1* PROMOTER ORGANIZATION. **A**) Representative image of Ikaros ChIP-seq data in pro-B and double positive (DP) T lymphocytes. **B**) Schematic representation of *Bcl2l1* gene with the potential Ikaros/RBP-J $\kappa$  consensus DNA binding sites; **C**) Western Blots of total cell lysates obtained from  $I\kappa^{WT}$  or  $I\kappa^{null}$  fetal liver EryC; **D-F**) ChIP experiments carried out with the antibodies indicated on top of each panel; y-axis: fold enrichments of *Bcl2l1* promoter region relative to *Thp* promoter (internal control), and input samples are plotted as the mean  $\pm$  SD of the measurements; a value of 1 corresponding to the dotted line indicates no enrichment; positive control: *Hes1* for anti-Ikaros ChIP, *Hey1* for anti-NICD and anti-RBP-J $\kappa$  ChIPs, negative control: *Amylase*. These results were obtained from 4 or more independent experiments ( $n \geq 4$ ); **G**) Re-ChIP experiments were performed in  $I\kappa^{WT}$  (left panel) or  $I\kappa^{null}$  (right panel) fetal liver EryC. For the  $I\kappa^{WT}$  EryC, the anti-Ikaros was used as primary antibody and the secondary antibody was raised against Cdk9 (positive control) (27), NICD, or IgG (negative control). For the  $I\kappa^{null}$  EryC re-ChIP, the anti-NICD was used as primary antibody and the secondary antibody was raised against RBP-J $\kappa$  (positive control), Ikaros, or IgG (negative control);  $n \geq 3$ ; **H-L**) ChIP experiments carried out with the antibodies indicated on top of each panel; y-axis: fold enrichments of *Bcl2l1* promoter, Transcriptional Start Site (TSS) or

Open Reading Frame (ORF) region relative to *Thp* promoter (internal control), and input samples are plotted as the mean  $\pm$  SD of the measurements; a value of 1 corresponding to the dotted line indicates no enrichment;  $n \geq 4$ . Pro: promoter region; ORF: +42 Kb region located within the open reading frame region; positive control (pos): *Hes1* for anti-Gata-1, anti-Mi-2 and anti-H3K27me3 ChIPs,  *$\beta$ -Globin* for anti-H3K4me3 ChIP and  *$\beta$ -Globin HS2* for anti-BRG1 ChIP, negative control (neg): *Amylase*. These results were obtained with 4 or more independent experiments ( $n \geq 4$ ); p value  $\leq 0.05^*$ .

Figure 3 : DETERMINATION OF THE SUPER ELONGATION COMPLEX IMPLICATED. **A-H**) ChIP assays were carried out with the antibodies labelled on the top of each panel, y-axis: fold enrichments of *Bcl2l1* Transcriptional Start Site (TSS) and the +42Kb region of the Open Reading Frame (ORF) relative to *Thp* promoter and input samples are plotted as the mean  $\pm$  SD of the measurements; a value of 1 corresponding to the dotted line indicates no enrichment; positive control (pos):  *$\beta$ -Globin* for anti-Cdk9, anti-Pol II CTD, anti-MLL4 and anti-UTX ChIPs, *Cdc25a* for anti-HCF-1, anti-CFP-1 and anti-SETD1A ChIPs, negative control (neg): *Amylase*. The results were obtained from four or more independent experiments; **I**) Re-ChIP experiments were performed in  $Ik^{WT}$  fetal liver (left panel) or  $Ik^{null}$  fetal liver cells (right panel). For  $Ik^{WT}$  and  $Ik^{null}$  cells anti-RBBP5 were used as a primary antibodies and the secondary antibodies were Cdk9 (control), UTX, CFP-1 or IgG (control); These results were obtained with three independent experiments; **J**) Western Blots probed with Ikaros, MLL1, MLL4, SETD1A or RBBP5 (positive control) antibodies following co-immunoprecipitations in  $Ik^{WT}$  fetal liver cells carried out with MLL1, MLL4, SETD1A antibodies or isotype-matched immunoglobulins (IgG); these results were obtained from three independent experiments ( $n \geq 4$ ). \*: p value  $\leq 0.05$ .

Figure 4: SWITCH FROM IKAROS TO NOTCH INFLUENCES THE *BCL2L1* RATE OF TRANSCRIPTION ELONGATION. **A)** Western Blots probed with NICD or SETD1A antibodies following co-immunoprecipitations in  $Ik^{WT}$  fetal liver cells carried out with NICD or SETD1A antibodies or the isotype-matched immunoglobulins (IgG); **B)** Western Blots probed with NICD antibodies following co-immunoprecipitations carried out with MLL1 or MLL4 antibodies or the isotype-matched immunoglobulins (IgG); these results were obtained from three independent experiments; **C,D)** ChIP assays were carried out with the antibodies labelled on the top of each panel; *y*-axis: fold enrichments of *Bcl2l1* Transcriptional Start Site (TSS) and the +42Kb region of the Open Reading Frame (ORF) relative to *Thp* promoter and input samples are plotted as the mean  $\pm$  SD of the measurements; a value of 1 corresponding to the dotted line indicates no enrichment; positive control (pos): *GATA1* for and anti-H3K79me2 and anti-H3K36me3 ChIPs, negative control (neg): *Amylase*; these results were obtained from four or more independent experiments ( $n \geq 4$ ); **E)** Primary transcripts expression analysis in  $Ik^{WT}$  and  $Ik^{null}$  in untreated fetal liver cells, or treated fetal liver cells with Flavopiridol. The analysis was performed after at 0, 30 and 60 minutes after the release from Flavopiridol. cDNA samples were used as templates for qPCR with *Bcl2l1+1Kb*, *Bcl2l1+20Kb*, *Bcl2l1+30Kb*, *Bcl2l1+50Kb* specific primer sets; *RNU-2* was used as the internal control. The +20Kb and +30Kb regions are located within the first intron and hence, are specifically addressing the levels of *Bcl2l1* pre-mRNA. *y* axis: pre-mRNA enrichment levels relative to P1 values; these results are representative of three independent experiments; **F)** Primary transcripts expression analysis in  $Ik^{WT}$  and  $Ik^{null}$  in untreated fetal liver cells, or treated fetal liver cells with Flavopiridol and camptothecin. The analysis was performed at 0, 30 and 60 minutes after the release from Flavopiridol but, in presence of 10ng/ml Camptothecin; cDNA samples were used as templates for qPCR with *Bcl2l1+1Kb*, *Bcl2l1+20Kb*, *Bcl2l1+30Kb*, *Bcl2l1+50Kb* specific primer sets; *RNU-2* was used as the internal

control; y axis: pre-mRNA enrichment levels relative to  $Ik^{WT}$  untreated values; these results are representative of three independent experiments. \*: p value  $\leq 0.05$ .

Figure 5 : IKAROS PROTECTS FROM NOTCH SIGNALLING OVERACTIVATION. **A)** Schematic representation fetal liver cells co-cultured on OP9/OP9-DL1 cells; **B)** Western Blots of  $Ik^{WT}$  or  $Ik^{null}$  total cell lysates obtained from E14.5 fetal liver EryC; **C)** Expression analysis of *Bcl2l1* and *Cdkn1A* in P3 sub-population. The expression level of these and the *Hprt* gene (control) is compared with  *$\beta$ -Actin* (internal control); y axis: mRNA enrichment levels relative to  $Ik^{WT}$  cells on OP9 cells values; these results were obtained from three independent experiments; **D-I)** ChIP assays were carried out with the antibodies indicated on the top of each panel, , y-axis: fold enrichments detected at *Bcl2l1* promoter for ChIPs with Ikaros and NICD antibodies, TSS region for ChIPs with MLL4 and SETD1A antibodies, and ORF region (+42Kb) for H3K79me2 and H3K36me3 antibodies, relative to *Thp* promoter and input samples are plotted as the mean  $\pm$  SD of the measurements; a value of 1 corresponding to the dotted line indicates no enrichment; these results were obtained from 4 or more independent experiments ( $n \geq 4$ ). \*: p value  $\leq 0.05$  .

Figure 6 : EFFECT OF THE BIMODAL TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION IMPOSED BY IKAROS VS RBP-J $\kappa$ -NICD ON THE TRANSCRIPTOME OF HEMATOPOIETIC CELLS. **A)** Venn Diagram representing the overexpressed genes ( $\geq 2$ fold) in  $Ik^{null}$  vs  $Ik^{WT}$  P3 subpopulation of fetal liver cells co-cultured with OP9-DL1 cells ( $\alpha+\beta$ ) or overexpressed ( $\geq 2$ fold) in  $Ik^{null}$  vs  $Ik^{WT}$  P3 subpopulation cells co-cultured with OP9 cells ( $\beta+\chi$ ); **B)** DAVID bioinformatic analysis of overexpressed genes in  $Ik^{null}$  vs  $Ik^{WT}$  P3 subpopulation of cells co-cultured with OP9 cells ( $\beta+\chi$ ); **C)** DAVID bioinformatic analysis of  $Ik^{null}$  versus  $Ik^{WT}$  P3 subpopulation of cells ( $\geq 2$ fold) co-cultured with

OP9-DL1 cells ( $\alpha+\beta$ ); **D**) DAVID bioinformatic analysis of 208 genes that are overexpressed in  $Ik^{null}$  vs  $Ik^{WT}$  P3 subpopulation of cells ( $\geq 2$ fold) uniquely when they are co-cultured with OP9 cells (but not on OP9-DL1 cells) ( $\beta$ ); **E**) DAVID bioinformatic analysis of 439 genes that are overexpressed in  $Ik^{null}$  vs  $Ik^{WT}$  P3 subpopulation of cells uniquely when they are co-cultured with OP9-DL1 cells, but not on OP9 cells ( $\alpha$ ); **F**) Heatmap of genes presenting a bimodal transcriptional activation pattern *i.e.*, characterized by an additive transcriptional activation when the extrinsic Notch signalling is combined with the absence of Ikaros, but with an unchanged expression in  $Ik^{WT}$  cells on OP9-DL1.

Figure 7 : SCHEMATIC REPRESENTATION OF *BCL2L1* AND *CDKN1A* BIMODAL TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION. Ikaros is competing with the RBP-J $\kappa$  along with NICD to activate and determine the expression level of some genes targeted by RBP-J $\kappa$ -NICD, including *Bcl2l1* and *Cdkn1a* genes in EryC. When Ikaros is present the RNA Pol II elongation complex is characterized by high-level recruitment of MLL4 and UTX, and the gene ORF chromatin is marked by H3K36me3. The transcription elongation machinery is then characterized by the SEC containing MLL4. Alternatively, when Ikaros is absent, the recruitment of RBP-J $\kappa$ -NICD is enhanced and it is accompanied by SETD1A, CFP-1 and HCF-1. The chromatin of the gene ORF is then marked by H3K79me2, which is deposited by the methyltransferase DOT1L a partner of the SETD1A or SETD1B containing SEC. Thus, our results suggest that the bimodal transcription activation mechanism define the expression level of *Bcl2l1* by the control of the elongation rate, which is enhanced when we detect factors characteristic of the SETD1A containing SEC. Small arrow indicates normal expression level and large arrow represents overexpression resulting from the bimodal activation mechanism. Only factors or histone post-translational modifications that were tested and differentially recruited ( $Ik^{WT}$  vs  $Ik^{null}$ ) are indicated. Nucleosomes are presented as large red circles; K4= H3K4me3, K36=H3K36me3,

K79=H3K79me2; MLL4 complex and SETD1A complex: respectively, MLL4 containing or SETD1A containing complex.

Supplementary figure 1: ERYTHROID APOPTOSIS REGULATION. **A)** Expression analysis of *Cdkn1a* in P1, P2, P3 and P4 sub-populations; y axis: mRNA enrichment levels relative to P1 values; These results were obtained from three independent experiments; **B)** Representative experiment of CMX-Ros apoptosis assay with  $Ik^{WT}$  EryC treated with the Bcl-X<sub>L</sub> inhibitor ABT-737 at concentrations indicated or with DMSO, as a control; **C)** Representative experiment of CMX-Ros apoptosis assay with  $Ik^{WT}$  and  $Ik^{null}$  EryC treated for 24 hours with cisplatin at the concentrations indicated or with H<sub>2</sub>O as a control.

Supplementary figure 2: DETERMINATION OF THE IKAROS INFLUENCE ON *CDKN1A* PROMOTER ORGANIZATION. **A-C)** ChIP experiments carried out in fetal liver cells with the antibodies indicated on top of each panel; y-axis: fold enrichments of *Cdkn1a* promoter region relative to *Thp* promoter (internal control), and input samples are plotted as the mean  $\pm$  SD of the measurements; a value of 1 corresponding to the dotted line indicates no enrichment; **D,E)** ChIP experiments carried out in G1E-JC4 cells with the antibodies indicated on top of each panel; y-axis: fold enrichments of *Bcl2l1* promoter region relative to *Thp* promoter (internal control), and input samples are plotted as the mean  $\pm$  SD of the measurements; a value of 1 corresponding to the dotted line indicates no enrichment.

Supplementary figure 3: ELONGATION COMPLEXES AT THE *CDKN1A* GENE AND THEIR INTERACTIONS. **A-F)** The ChIP experiments were carried out with the antibodies indicated on top of

each panel; *y*-axis: fold enrichments of *Cdkn1a* promoter region for anti-Pol II CTD, Cdk9, MLL4, UTX, SETD1A ChIPs, relative to *Thp* promoter (internal control), and input samples are plotted as the mean  $\pm$  SD of the measurements; a value of 1 corresponding to the dotted line indicates no enrichment; These results are representative of four independent experiments; **G**) Western Blots of Ik<sup>WT</sup> or Ik<sup>null</sup> total cell lysates obtained from E14.5 fetal liver EryC; **H**) Western Blots probed with Ikaros and UTX antibodies following co-immunoprecipitations in Ik<sup>WT</sup> fetal liver cells carried out with UTX antibody or isotype-matched immunoglobulins (IgG); **I**) Western Blots probed with MLL1, MLL4, SETD1A, Ikaros and RBBP5 antibodies following co-immunoprecipitations in Ik<sup>WT</sup> fetal liver cells carried out with Ikaros antibody or isotype-matched immunoglobulins; results shown are representative of three independent experiments.

Supplementary figure 4: DISTRIBUTION OF FETAL LIVER SUBPOPULATIONS WHEN CO-CULTURED WITH OP9/OP9-DL1 CELLS. FACS analysis of erythroid cells subpopulations according to the cell surface markers CD71 and Ter119 after 48h of coculture of fetal liver cells and OP9/OP9-DL1 cells; These results are representative of three independent experiments.

Supplementary figure 5: HEATMAPS OF  $\alpha$  AND  $\beta$  SETS OF GENES. **A**) Representative Heatmap of 208 genes composing the  $\beta$  set of genes, which are characterized by their overexpression in Ik<sup>null</sup> EryC (vs Ik<sup>WT</sup> EryC) when cultured with OP9 cells, but not when cultured with OP9-DL1 cells; **B**) Representative Heatmap of 439 genes composing the  $\alpha$  set of genes, Which are characterized by their overexpression uniquely in Ik<sup>null</sup> EryC (vs Ik<sup>WT</sup> EryC) when there is an external Notch signalling (cultured with OP9-DL1 cells but not with the OP9 cells).

## ACKNOWLEDGEMENTS



We thank Drs J.G. Filep, D. El Kebir for technical assistance; Dr K. Georgopoulos for the Ik<sup>null</sup> mouse line, Dr M. Weiss for the G1E-ER4 cell lines; This study was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) held by E.M.

## REFERENCES

1. Pajcini KV, Speck NA, Pear WS. Notch signalling in mammalian hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2011;25(10):1525-32.
2. Chadwick N, Nostro MC, Baron M, Mottram R, Brady G, Buckle AM. Notch signalling induces apoptosis in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*. 2007;25(1):203-10.
3. Nefedova Y, Gabrilovich D. Mechanisms and clinical prospects of Notch inhibitors in the therapy of hematological malignancies. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2008;11(6):210-8.
4. Nefedova Y, Sullivan DM, Bolick SC, Dalton WS, Gabrilovich DI. Inhibition of Notch signalling induces apoptosis of myeloma cells and enhances sensitivity to chemotherapy. *Blood*. 2008;111(4):2220-9.
5. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JPt, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2004;306(5694):269-71.
6. Lin C, Zheng H, Wang C, Yang L, Chen S, Li B, et al. Mutations increased overexpression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell International*. 2012;12(1):13.

7. Jeannot R, Mastio J, Macias-Garcia A, Oravec A, Ashworth T, Geimer Le Lay AS, et al. Oncogenic activation of the Notch1 gene by deletion of its promoter in Ikaros-deficient T-ALL. *Blood*. 2010;116(25):5443-54.
8. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2011;365(26):2497-506.
9. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(7):1389-401.
10. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101-5.
11. Fegan C, Pepper C. Apoptosis deregulation in CLL. *Adv Exp Med Biol*. 2013;792:151-71.
12. Tosello V, Ferrando AA. The NOTCH signalling pathway: role in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia and implication for therapy. *Therapeutic advances in hematology*. 2013;4(3):199-210.
13. Nwabo Kamdje AH, Bassi G, Pacelli L, Malpeli G, Amati E, Nichele I, et al. Role of stromal cell-mediated Notch signalling in CLL resistance to chemotherapy. *Blood cancer journal*. 2012;2(5):e73.
14. van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, van den Born M, Vooijs M, Begthel H, et al. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*. 2005;435(7044):959-63.

15. Gonzalez-Garcia M, Perez-Ballester R, Ding L, Duan L, Boise LH, Thompson CB, et al. bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development*. 1994;120(10):3033-42.
16. Li M, Chen F, Clifton N, Sullivan DM, Dalton WS, Gabrilovich DI, et al. Combined inhibition of Notch signalling and Bcl-2/Bcl-xL results in synergistic antimyeloma effect. *Molecular cancer therapeutics*. 2010;9(12):3200-9.
17. Kelly PN, Grabow S, Delbridge AR, Strasser A, Adams JM. Endogenous Bcl-xL is essential for Myc-driven lymphomagenesis in mice. *Blood*. 2011;118(24):6380-6.
18. Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernandez-Luna JL. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *The New England journal of medicine*. 1998;338(9):564-71.
19. Garcon L, Rivat C, James C, Lacout C, Camara-Clayette V, Ugo V, et al. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood*. 2006;108(5):1551-4.
20. Boudard D, Vasselon C, Bertheas MF, Jaubert J, Mounier C, Reynaud J, et al. Expression and prognostic significance of Bcl-2 family proteins in myelodysplastic syndromes. *American journal of hematology*. 2002;70(2):115-25.
21. Rhodes MM, Kopsombut P, Bondurant MC, Price JO, Koury MJ. Bcl-x(L) prevents apoptosis of late-stage erythroblasts but does not mediate the antiapoptotic effect of erythropoietin. *Blood*. 2005;106(5):1857-63.
22. Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Nakayama K, et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*. 1995;267(5203):1506-10.

23. Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood*. 1999;94(1):87-96.
24. Weiss MJ, Keller G, Orkin SH. Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes & development*. 1994;8(10):1184-97.
25. Weiss MJ, Orkin SH. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(21):9623-7.
26. Bottardi S, Ross J, Bourgoïn V, Fotouhi-Ardakani N, Affar el B, Trudel M, et al. Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human gamma-globin genes. *Mol Cell Biol*. 2009;29(6):1526-37.
27. Bottardi S, Zmiri FA, Bourgoïn V, Ross J, Mavoungou L, Milot E. Ikaros interacts with P-TEFb and cooperates with GATA-1 to enhance transcription elongation. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(9):3505-19.
28. Bottardi S, Mavoungou L, Bourgoïn V, Mashtalir N, Affar EB, Milot E. Direct Protein Interactions Are Responsible for Ikaros-GATA and Ikaros-Cdk9 Cooperativeness in Hematopoietic Cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2013;33(16):3064-76.
29. Ross J, Mavoungou L, Bresnick EH, Milot E. GATA-1 utilizes Ikaros and polycomb repressive complex 2 to suppress Hes1 and to promote erythropoiesis. *Mol Cell Biol*. 2012;32(18):3624-38.
30. Pulte D, Lopez RA, Baker ST, Ward M, Ritchie E, Richardson CA, et al. Ikaros increases normal apoptosis in adult erythroid cells. *American journal of hematology*. 2006;81(1):12-8.
31. Zhang J, Jackson AF, Naito T, Dose M, Seavitt J, Liu F, et al. Harnessing of the nucleosome-remodeling-deacetylase complex controls lymphocyte development and prevents leukemogenesis. *Nat Immunol*. 2012;13(1):86-94.

32. Wang JH, Nichogiannopoulou A, Wu L, Sun L, Sharpe AH, Bigby M, et al. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity*. 1996;5(6):537-49.
33. Avitahl N, Winandy S, Friedrich C, Jones B, Ge Y, Georgopoulos K. Ikaros sets thresholds for T cell activation and regulates chromosome propagation. *Immunity*. 1999;10(3):333-43.
34. Winandy S, Wu P, Georgopoulos K. A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell*. 1995;83(2):289-99.
35. Yoshida T, Ng SY, Georgopoulos K. Awakening lineage potential by Ikaros-mediated transcriptional priming. *Current opinion in immunology*. 2010;22(2):154-60.
36. Georgopoulos K, Moore DD, Derfler B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science*. 1992;258(5083):808-12.
37. Ramirez J, Lukin K, Hagman J. From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Current opinion in immunology*. 2010;22(2):177-84.
38. Francis OL, Payne JL, Su RJ, Payne KJ. Regulator of myeloid differentiation and function: The secret life of Ikaros. *World journal of biological chemistry*. 2011;2(6):119-25.
39. Dumortier A, Kirstetter P, Kastner P, Chan S. Ikaros regulates neutrophil differentiation2003 2003-03-15 00:00:00. 2219-26 p.
40. Malinge S, Thiollier C, Chlon TM, Dore LC, Diebold L, Bluteau O, et al. Ikaros inhibits megakaryopoiesis through functional interaction with GATA-1 and NOTCH signalling. *Blood*. 2013;121(13):2440-51.
41. John LB, Ward AC. The Ikaros gene family: transcriptional regulators of haematopoiesis and immunity. *Mol Immunol*. 2011;48(9-10):1272-8.

42. Kim J, Sif S, Jones B, Jackson A, Koipally J, Heller E, et al. Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity*. 1999;10(3):345-55.
43. Koipally J, Georgopoulos K. Ikaros-CtIP interactions do not require C-terminal binding protein and participate in a deacetylase-independent mode of repression. *J Biol Chem*. 2002;277(26):23143-9.
44. Popescu M, Gurel Z, Ronni T, Song C, Hung KY, Payne KJ, et al. Ikaros stability and pericentromeric localization are regulated by protein phosphatase 1. *J Biol Chem*. 2009;284(20):13869-80.
45. Sridharan R, Smale ST. Predominant interaction of both Ikaros and Helios with the NuRD complex in immature thymocytes. *J Biol Chem*. 2007;282(41):30227-38.
46. Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):162-74.
47. Jager R, Gisslinger H, Passamonti F, Rumi E, Berg T, Gisslinger B, et al. Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2010;24(7):1290-8.
48. Rebollo A, Schmitt C. Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunology and cell biology*. 2003;81(3):171-5.
49. Iacobucci I, Storlazzi CT, Cilloni D, Lonetti A, Ottaviani E, Soverini S, et al. Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP). *Blood*. 2009;114(10):2159-67.
50. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*. 2008;453(7191):110-4.

51. Nakayama H, Ishimaru F, Avitahl N, Sezaki N, Fujii N, Nakase K, et al. Decreases in Ikaros activity correlate with blast crisis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer research*. 1999;59(16):3931-4.
52. Sun L, Goodman PA, Wood CM, Crotty ML, Sensel M, Sather H, et al. Expression of aberrantly spliced oncogenic ikaros isoforms in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(12):3753-66.
53. Peterlin BM, Price DH. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell*. 2006;23(3):297-305.
54. Zhou Q, Li T, Price DH. RNA polymerase II elongation control. *Annual review of biochemistry*. 2012;81:119-43.
55. Papetti M, Wontakal SN, Stopka T, Skoultchi AI. GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation. *Cell Cycle*. 2010;9(10):1972-80.
56. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998;394(6692):485-90.
57. Sionov RV, Kfir-Erenfeld S, Spokoini R, Yefenof E. A role for bcl-2 in notch1-dependent transcription in thymic lymphoma cells. *Advances in hematology*. 2012;2012:435241.
58. Perumalsamy LR, Nagala M, Sarin A. Notch-activated signalling cascade interacts with mitochondrial remodeling proteins to regulate cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(15):6882-7.
59. Koulis M, Pop R, Porpiglia E, Shearstone JR, Hidalgo D, Socolovsky M. Identification and analysis of mouse erythroid progenitors using the CD71/TER119 flow-cytometric assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011(54).

60. Motoyama N, Kimura T, Takahashi T, Watanabe T, Nakano T. bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(11):1691-8.
61. Gregory TYCMAOSHBGAWMJ. GATA-1 and Erythropoietin Cooperate to Promote Erythroid Cell Survival by Regulating bcl-xL Expression. *Blood*. 1999;94(1):87-96.
62. Bowen NJ, Fujita N, Kajita M, Wade PA. Mi-2/NuRD: Multiple complexes for many purposes. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*. 2004;1677(1-3):52-7.
63. Koipally J, Renold A, Kim J, Georgopoulos K. Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO Journal*. 1999;18(11):3090-100.
64. Hong W, Nakazawa M, Chen YY, Kori R, Vakoc CR, Rakowski C, et al. FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *EMBO Journal*. 2005;24(13):2367-78.
65. Rodriguez P, Bonte E, Krijgsveld J, Kolodziej KE, Guyot B, Heck AJR, et al. GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO Journal*. 2005;24(13):2354-66.
66. Xu Z, Meng X, Cai Y, Koury MJ, Brandt SJ. Recruitment of the SWI/SNF protein Brg1 by a multiprotein complex effects transcriptional repression in murine erythroid progenitors. *The Biochemical journal*. 2006;399(2):297-304.
67. Zhou VW, Goren A, Bernstein BE. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat Rev Genet*. 2011;12(1):7-18.
68. Yu M, Riva L, Xie H, Schindler Y, Moran TB, Cheng Y, et al. Insights into GATA-1-mediated gene activation versus repression via genome-wide chromatin occupancy analysis. *Mol Cell*. 2009;36(4):682-95.



69. Smith E, Lin C, Shilatifard A. The super elongation complex (SEC) and MLL in development and disease. *Genes & development*. 2011;25(7):661-72.
70. Tang Z, Chen WY, Shimada M, Nguyen UT, Kim J, Sun XJ, et al. SET1 and p300 act synergistically, through coupled histone modifications, in transcriptional activation by p53. *Cell*. 2013;154(2):297-310.
71. Cheng J, Blum R, Bowman C, Hu D, Shilatifard A, Shen S, et al. A Role for H3K4 Monomethylation in Gene Repression and Partitioning of Chromatin Readers. *Molecular Cell*. 2014;53(6):979-92.
72. Hu D, Gao X, Morgan MA, Herz HM, Smith ER, Shilatifard A. The MLL3/MLL4 branches of the COMPASS family function as major histone H3K4 monomethylases at enhancers. *Mol Cell Biol*. 2013;33(23):4745-54.
73. Shilatifard A. Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1998;12(14):1437-46.
74. Luo Z, Lin C, Shilatifard A. The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(9):543-7.
75. Morgan MA, Shilatifard A. Drosophila SETs its sights on cancer: Trr/MLL3/4 COMPASS-like complexes in development and disease. *Mol Cell Biol*. 2013;33(9):1698-701.
76. de Medeiros RB. Sequential chromatin immunoprecipitation assay and analysis. *Methods in molecular biology*. 2011;791:225-37.
77. Nguyen AT, Zhang Y. The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes & development*. 2011;25(13):1345-58.

78. Zhu X, He F, Zeng H, Ling S, Chen A, Wang Y, et al. Identification of functional cooperative mutations of SETD2 in human acute leukemia. *Nat Genet.* 2014;46(3):287-93.
79. Chao SH, Price DH. Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(34):31793-9.
80. Veloso A, Biewen B, Paulsen MT, Berg N, Carmo de Andrade Lima L, Prasad J, et al. Genome-wide transcriptional effects of the anti-cancer agent camptothecin. *PLoS One.* 2013;8(10):e78190.
81. Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity.* 2002;17(6):749-56.
82. Lee JS, Shukla A, Schneider J, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, et al. Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell.* 2007;131(6):1084-96.
83. Duns G, van den Berg E, van Duivenbode I, Osinga J, Hollema H, Hofstra RM, et al. Histone methyltransferase gene SETD2 is a novel tumor suppressor gene in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 2010;70(11):4287-91.
84. Yagi T, Hibi S, Takanashi M, Kano G, Tabata Y, Imamura T, et al. High frequency of Ikaros isoform 6 expression in acute myelomonocytic and monocytic leukemias: implications for up-regulation of the antiapoptotic protein Bcl-XL in leukemogenesis. *Blood.* 2002;99(4):1350-5.
85. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57.
86. Wehr A, Baeck C, Heymann F, Niemietz PM, Hammerich L, Martin C, et al. Chemokine receptor CXCR6-dependent hepatic NK T Cell accumulation promotes inflammation and liver fibrosis. *J Immunol.* 2013;190(10):5226-36.

87. Kruttgen A, Rose-John S. Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrome. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2012;32(2):60-5.
88. Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, et al. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells*. 2011;29(1):32-45.
89. Deng L, Chen N, Li Y, Zheng H, Lei Q. CXCR6/CXCL16 functions as a regulator in metastasis and progression of cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1806(1):42-9.
90. Ngora H, Galli UM, Miyazaki K, Zoller M. Membrane-bound and exosomal metastasis-associated C4.4A promotes migration by associating with the alpha(6)beta(4) integrin and MT1-MMP. *Neoplasia*. 2012;14(2):95-107.
91. Cox TR, Bird D, Baker AM, Barker HE, Ho MW, Lang G, et al. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res*. 2013;73(6):1721-32.
92. Lenci RE, Rachakonda PS, Kubarenko AV, Weber AN, Brandt A, Gast A, et al. Integrin genes and susceptibility to human melanoma. *Mutagenesis*. 2012;27(3):367-73.
93. Wang X, Cao X. Regulation of metastasis of pediatric multiple myeloma by MMP13. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014.
94. Weiss MJ, Yu C, Orkin SH. Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol*. 1997;17(3):1642-51.
95. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.

96. Haring M, Offermann S, Danker T, Horst I, Peterhansel C, Stam M. Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant methods*. 2007;3:11.

**Table1 . Primers used for ChIP experiments and pre-mRNA expression**

Specificity (murine genomic DNA)	Symbol	direction	Sequence 5'-3'
Bcl2l1 +2.2	<i>pro</i>	F	CCTGCTTGCTGTCGCCGGA
		R	ACTACAACCAACCCACCCCCTT
Bcl2l1 TSS	<i>TSS</i>	F	GGCCTCAGCCCACCCACCCG
		R	TGAGGCCGAGCCCAAGGCGG
Bcl2l1 ORF	<i>ORF</i>	F	AGCTGCTGCCTGCACTCCTGTGG
		R	TGGGAGGCAGTGGGGGAAGGGG

Bcl2l1 +1	<i>Bcl2l1</i>	F	GCTTGCAAGTTCCTCCCGGTC
	+1	R	ACACTAGGGCGTTTTGCGGC
Bcl2l1 +10	<i>Bcl2l1</i>	F	CCATGGGCCCCTCCATCACT
	+10	R	AGCTTGGAGCCAATGCAGGC
Bcl2l1 +20	<i>Bcl2l1</i>	F	ACAGGTGGCCAGGTGGCTTA
	+20	R	GCCCTGGTCAAAGGGAAGGC
Bcl2l1 +30	<i>Bcl2l1</i>	F	AGTCATAGGGTGCTGGGCTCC
	+30	R	GCAGCTGCTGAGAGCCTGAC
Bcl2l1 +40	<i>Bcl2l1</i>	F	AGGAGAGGCTGCTGTGGACC
	+40	R	ATGCTGTAGCACCTGTGCC
Bcl2l1 +50	<i>Bcl2l1</i>	F	TGTGTGAGGAGCTGCTGGCT
	+50	R	GGGAGGGAGCATCAGGCTGT
Cdkn1a pro	<i>Cdkn1a</i>	F	CGGAGACCAGCAGCAAAATCG
	pro	R	TGACACATACACCCCCAGGCAC
Cdkn1a TSS	<i>Cdkn1a</i>	F	TGCGTGACAAGAGAATAGCCCAG
	TSS	R	TGCAGTTGGCGTCGAGCTGC
Amylase	<i>Amyl</i>	F	TCAGTTGTAATTCTCCTTGTAGGG
		R	CCTCCCATCTGAAGTATGTGGGTC
$\beta$ major	<i><math>\beta</math>maj</i>	F	CAGTGAGTGGCACAGCATCC
		R	CAGTCAGGTGCACCATGATGT
$\beta$ globin HS2	<i><math>\beta</math>HS2</i>	F	CCTTGCCTGTTCTCTGCTCA
		R	CACATGTGACCTGTCTGCCAG
Hes1	<i>Hes1</i>	F	CTCTTCTCCCATTTGGCTGA
		R	GCACCAGCTCCAGATCCTGT
E2F1	<i>E2F1</i>	F	CCCTGGTCCCACCCTCCGTC
		R	CGCCGAACGCCTCCTCCATT
GATA1	<i>GATA1</i>	F	TCCCTGCTGCTTTCTGTCTT
		R	AGGTGACACCCAGAGTGGAC

**Table2 . Primers used for mRNA expression**

Specificity (murine mRNA)	Symbol	direction	Sequence 5'-3'
Bcl2l1	<i>Bcl2l1</i>	F	GGGATGGAGTAAACTGGGGT
		R	TGCAATCCGACTCACCAATA
Cdkn1a	<i>Cdkn1a</i>	F	TGTCTTGCACTCTGGTGTCTG
		R	ATCTGCGCTTGGAGTGATAGA
Bax	<i>Bax</i>	F	CACGTGACCGTGGTGCGCCG

		R	CCGCTCCCAAGCTGCTCCCCG
		F	GCGTGGTTTGACCGGCTTCCTGGG
Bak	<i>Bak</i>	R	GGGCTGCCACCCAACCGCCTC
		F	CGGAGGCTGGGATGCCTTTGTGG
Bcl-2	<i>Bcl-2</i>	R	CCCCGACCAGGGCCAGGCTGA
		F	CACAGGACTAGAACACCTGC
Hprt	<i>Hprt</i>	R	GCTGGTGAAAAGGACCTC

---

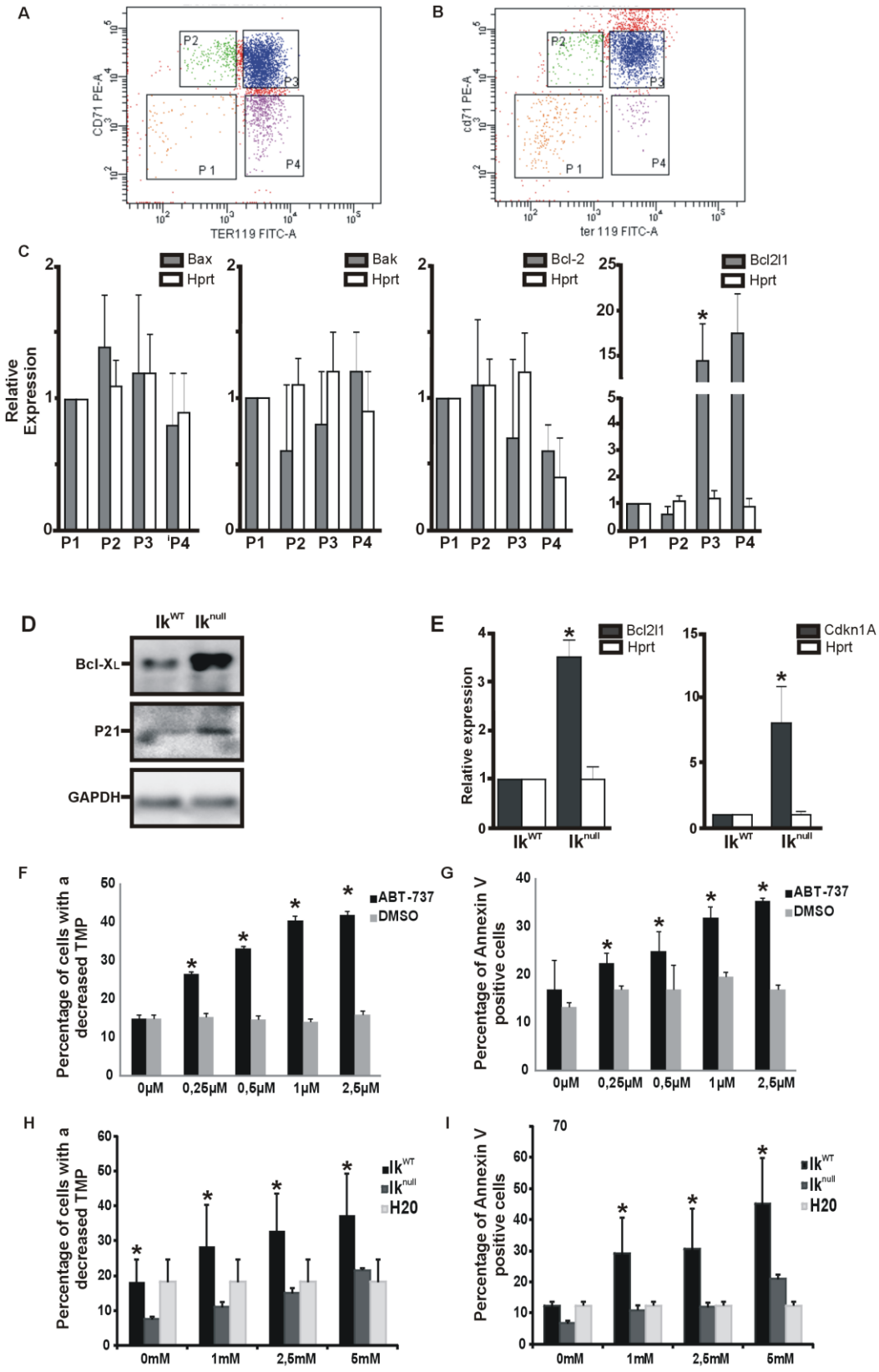


Figure 1 : IKAROS AFFECTS ERYTHROID CELL APOPTOSIS

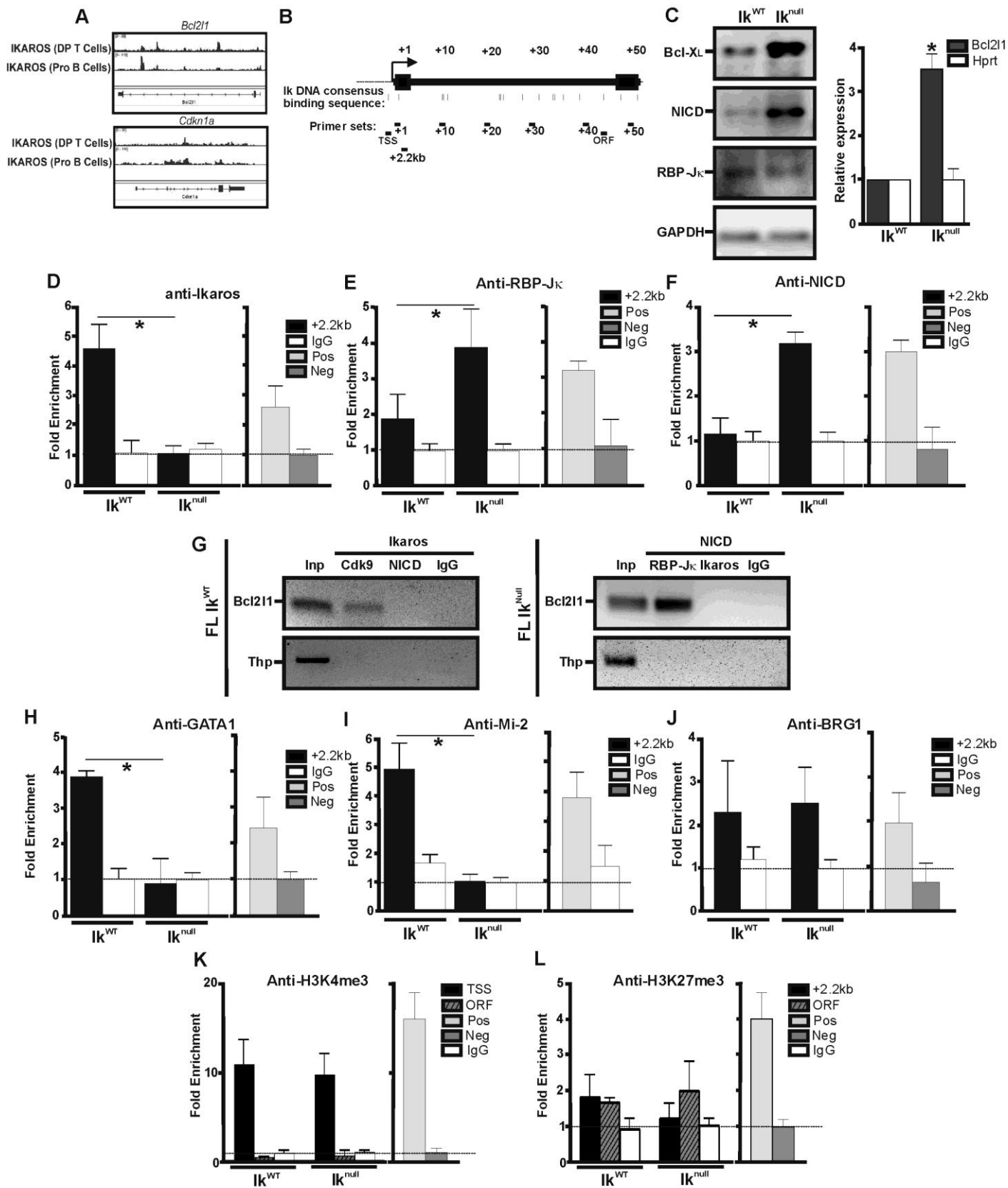


Figure 2 : IKAROS IS CRITICAL FOR *BCL2L1* PROMOTER ORGANIZATION



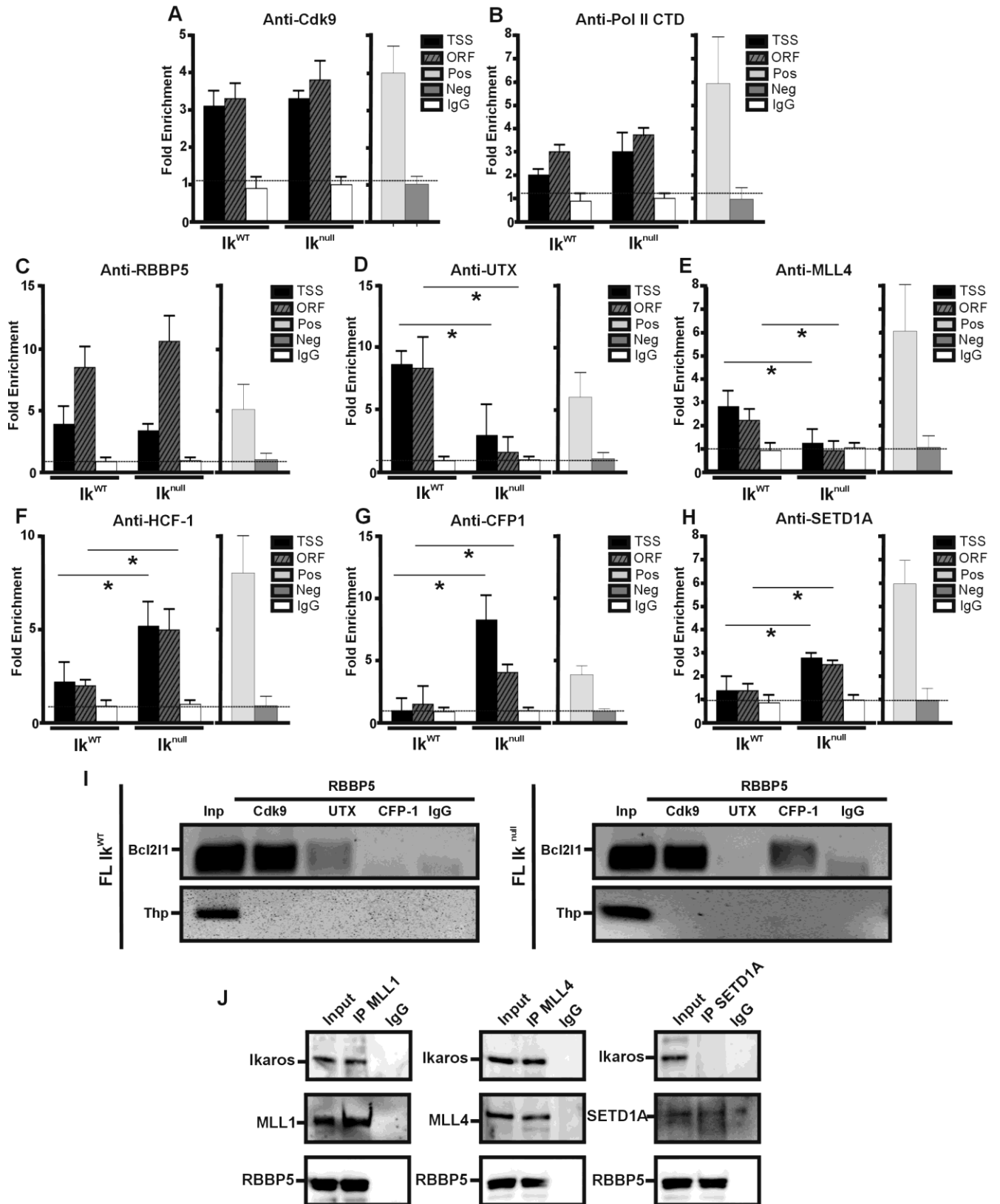


Figure 3 : DETERMINATION OF THE SUPER ELONGATION COMPLEX IMPLICATED

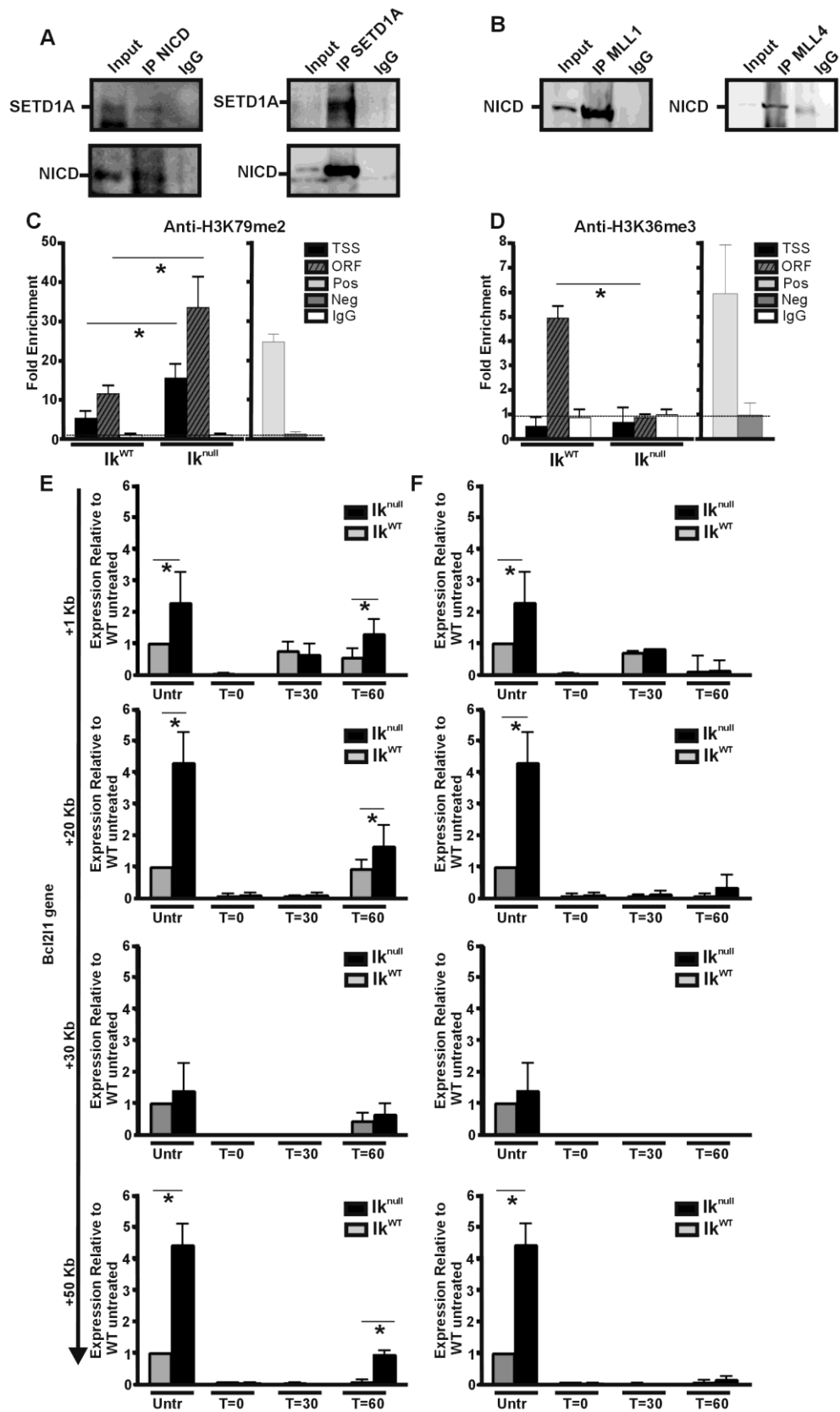


Figure 4 : SWITCH FROM IKAROS TO NOTCH INFLUENCES THE *BCL2L1* RATE OF TRANSCRIPTION ELONGATION

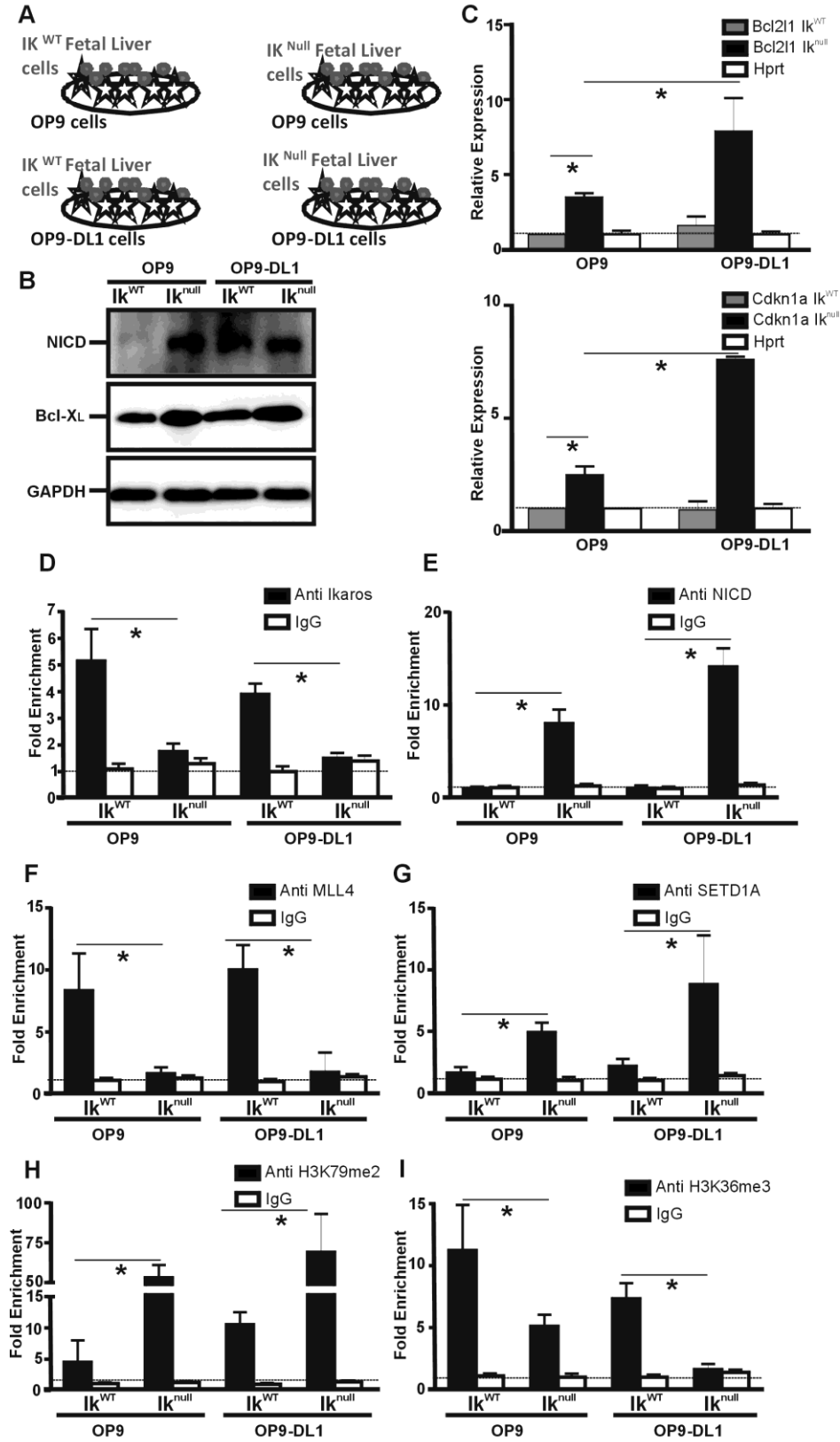
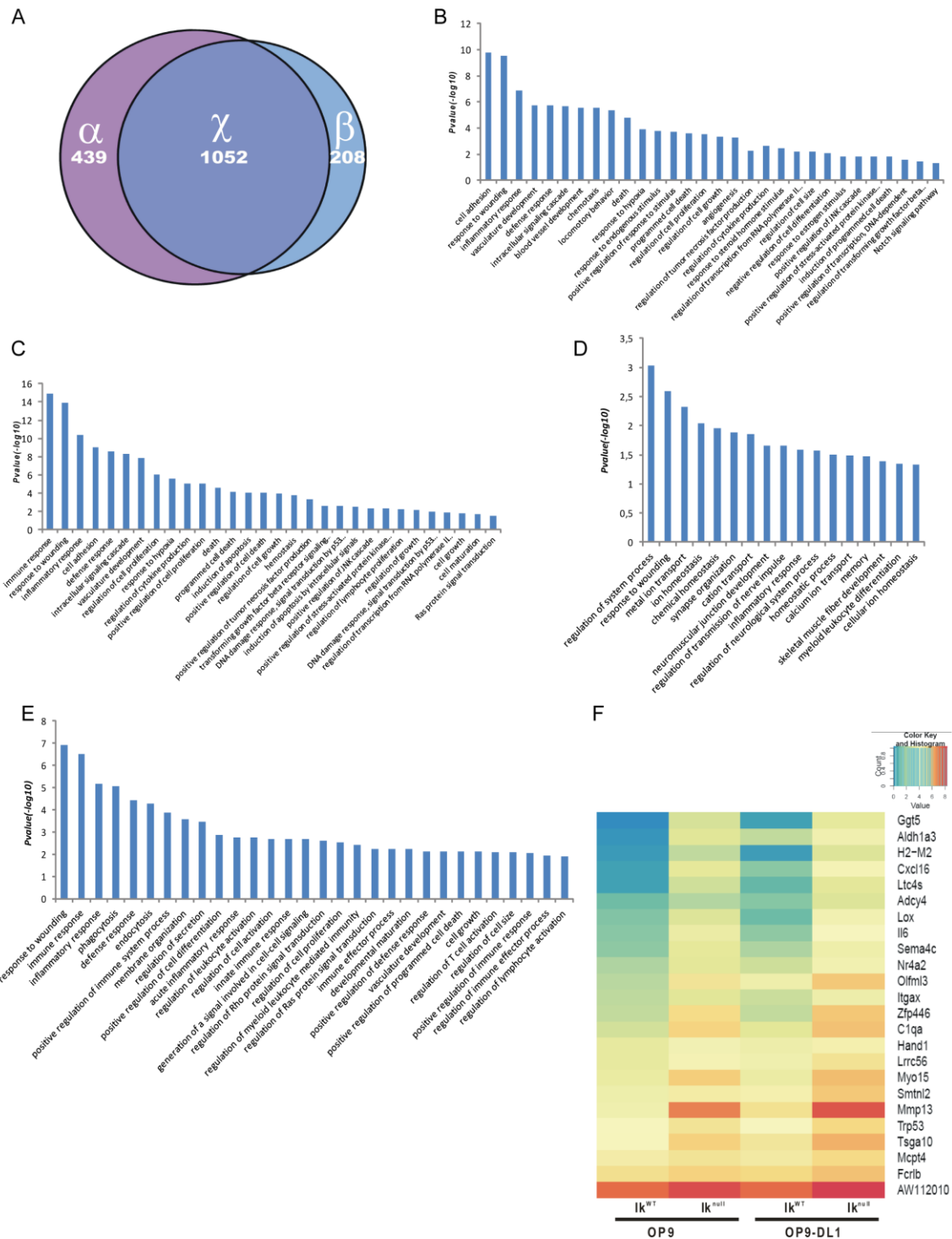
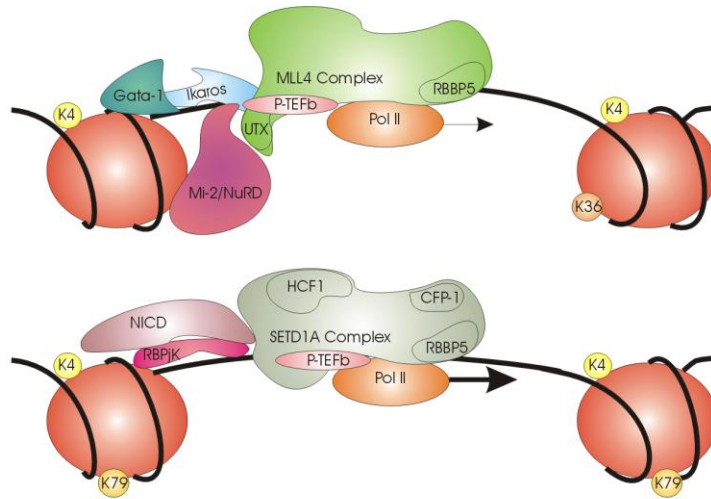


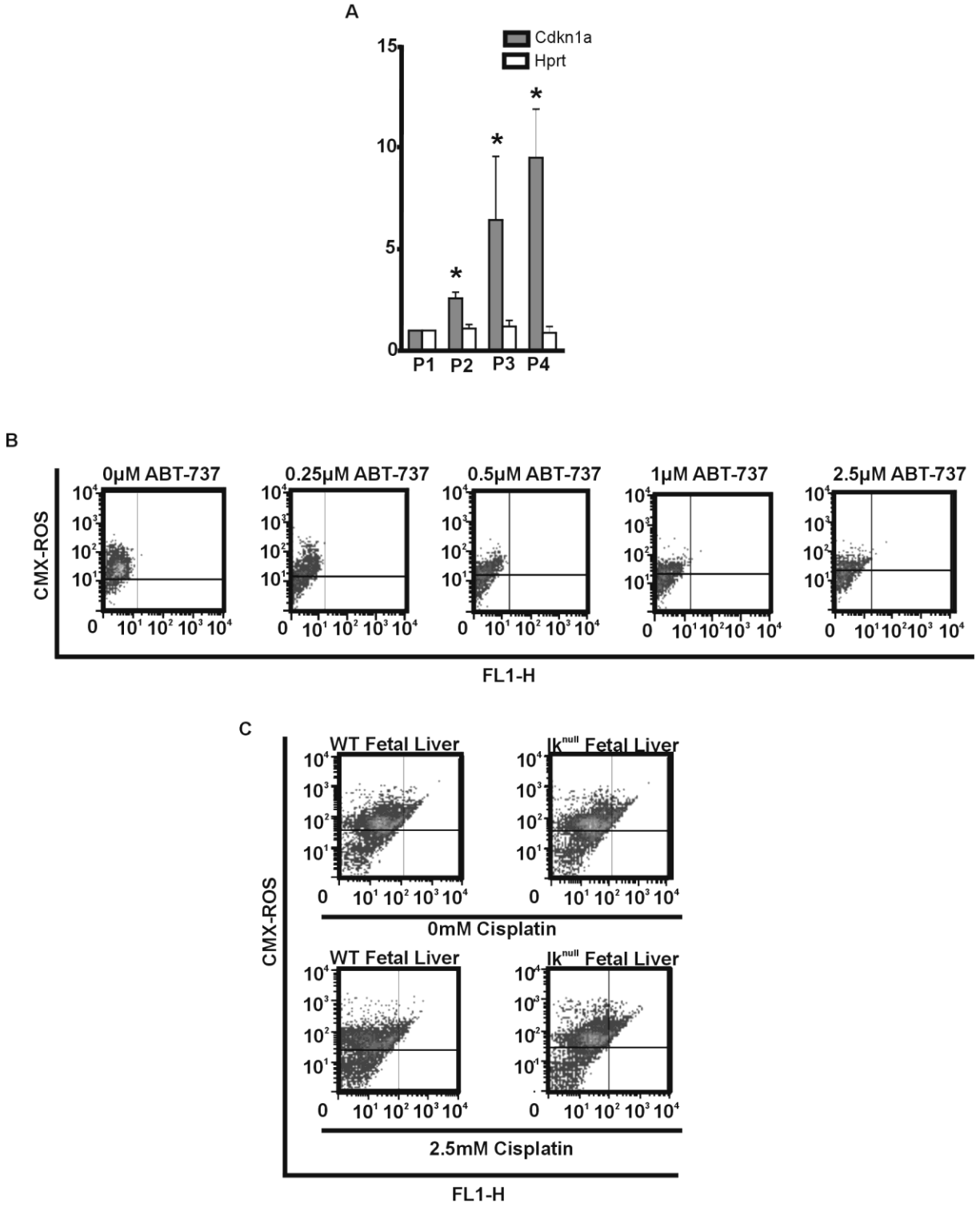
Figure 5 : IKAROS PROTECTS FROM NOTCH SIGNALLING OVERACTIVATION



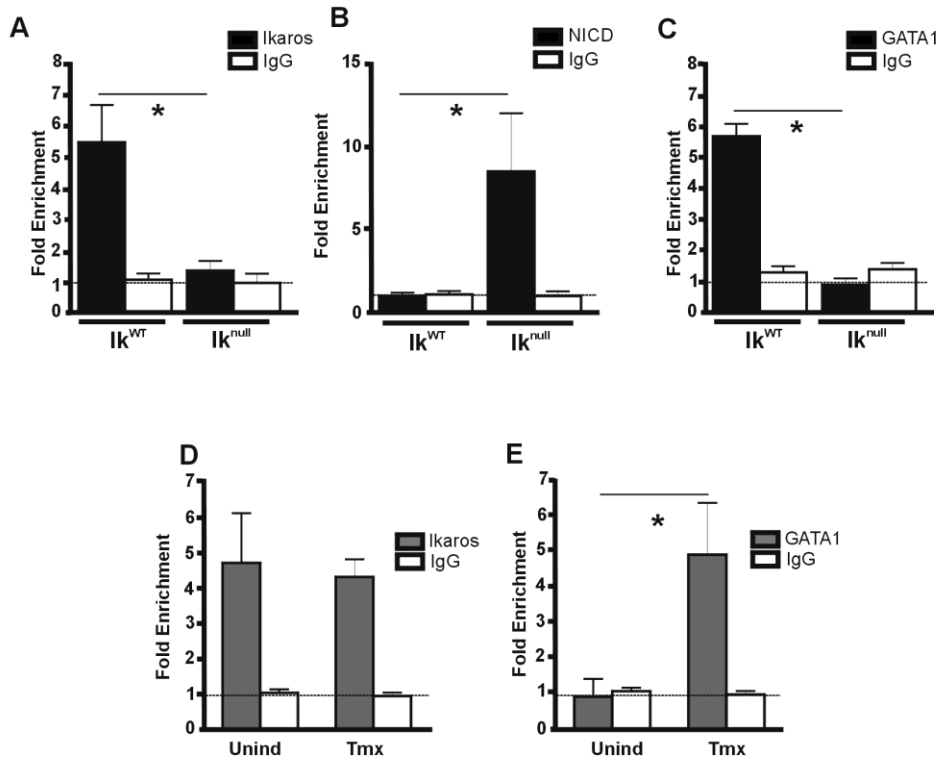
**Figure 6 : EFFECT OF THE BIMODAL TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION IMPOSED BY IKAROS VS RBP-J<sub>K</sub>-NICD ON THE TRANSCRIPTOME OF HEMATOPOIETIC CELLS**



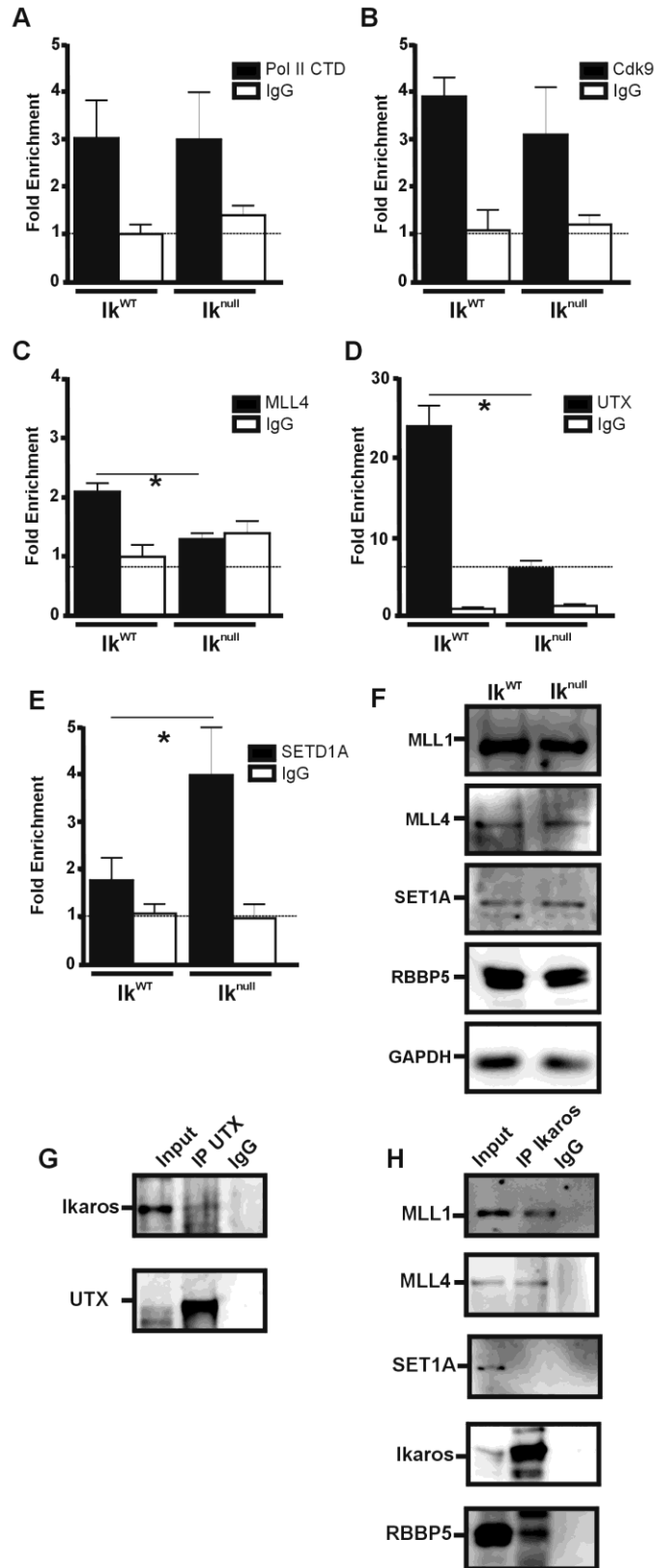
**Figure 7 : SCHEMATIC REPRESENTATION OF *BCL2L1* AND *CDKN1A* BIMODAL TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION**



Supplementary figure 1: ERYTHROID APOPTOSIS REGULATION

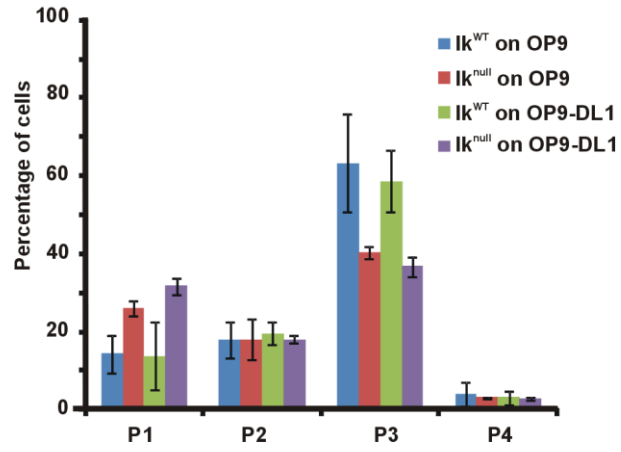


Supplementary figure 2: DETERMINATION OF THE IKAROS INFLUENCE ON *CDKN1A* PROMOTER ORGANIZATION

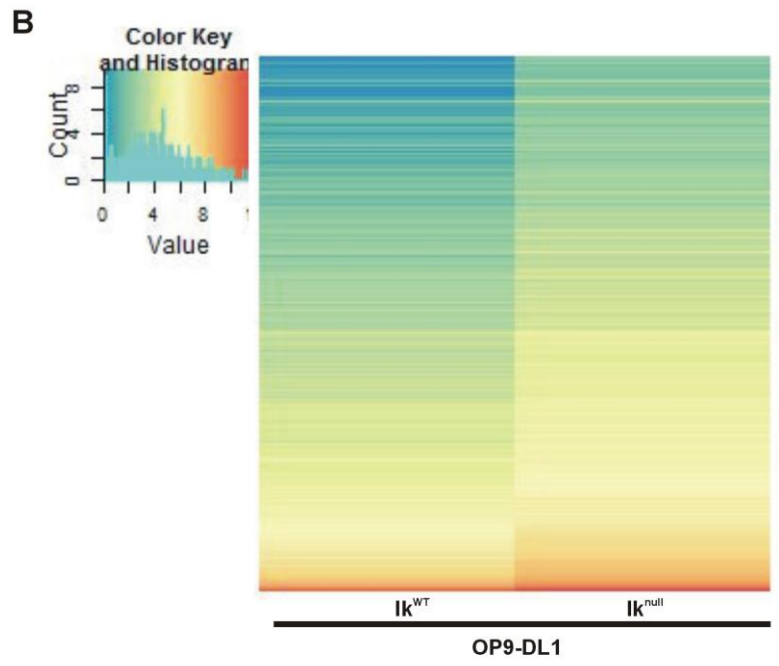
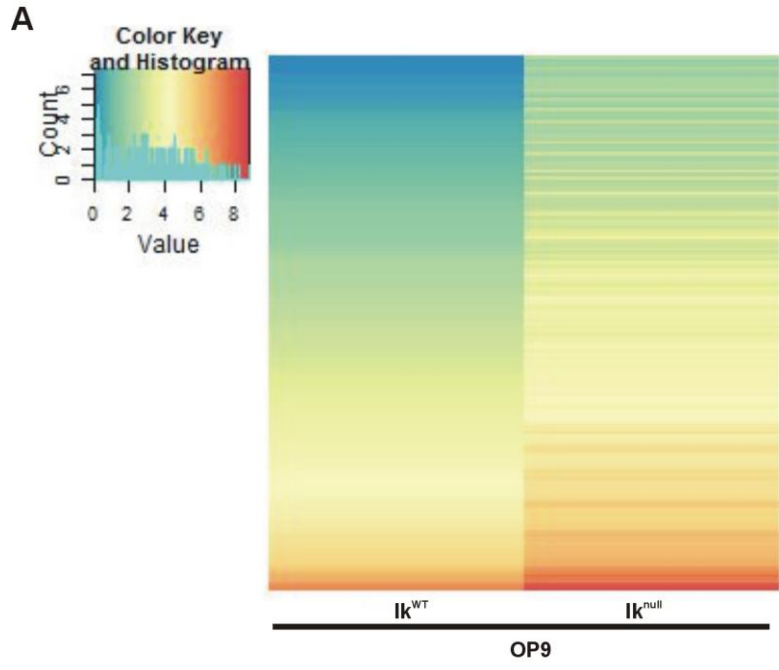


Supplementary figure 3: ELONGATION COMPLEXES AT THE CDKN1A GENE AND THEIR INTERACTIONS





Supplementary figure 4 : FETAL LIVER SUBPOPULATION ON OP9/OP9-DL1 SYSTEM



Supplementary figure 5: HEATMAPS OF  $\alpha$  AND  $\beta$  SETS OF GENES

## Chapitre 4. Discussion

### 4.1- L'interaction Ikaros/Notch

#### 4.1.1- La régulation de la voie Notch par Ikaros se produit à plusieurs niveaux

L'interaction Ikaros/Notch est de plus en plus reconnue pour son importance au cours de l'hématopoïèse. Au niveau érythroïde nous avons démontré qu'Ikaros pouvait exercer une régulation directe de l'expression Hes1, la cible la plus caractéristique du récepteur Notch activé (204). Nous avons mis en évidence qu'afin de favoriser la progression de la différenciation érythroïde, Ikaros recrute GATA1 pour réprimer Hes1 à l'aide du complexe Polycomb PRC2. La régulation de Hes1 par Ikaros a aussi été observée dans les lymphocytes, sans que les conséquences de cette régulation n'aient été totalement caractérisées, cependant, dans ce cas de figure aussi, Ikaros prend le dessus sur Notch pour réguler l'expression du gène, qui, dès lors, perd sa capacité à répondre à la suractivation du récepteur Notch (157).

Comme dans les cellules lymphoïdes (222), nos travaux ont permis de démontrer qu'Ikaros a la capacité de se lier directement au gène Notch1 et de le réguler dans les cellules érythroïdes (157). Il avait été observé qu'en l'absence d'Ikaros, Notch1 est surexprimé dans les cellules lymphoïdes (221) et surtout que plusieurs promoteurs alternatifs s'activent et favorisent d'une part une augmentation d'expression de Notch1 et d'autre part une augmentation de l'activation de la voie Notch car certains de ses promoteurs alternatifs se situent après le site de clivage de Notch1, générant des formes activées de Notch1 (225).

Ces données impliquent une régulation du signal Notch à différents niveaux. Les cibles de Notch sont contrôlables par Ikaros, ce qui permet de moduler l'activité de la voie de

signalisation. Mais en plus de cette modulation, le contrôle direct de l'expression du récepteur Notch1 permet d'ajouter un niveau de sensibilité à la régulation de la voie de signalisation. Par conséquent, Ikaros semble moduler la réponse au signal mais influence aussi la capacité des cellules érythroïdes à répondre à une activation extrinsèque du signal Notch.

#### 4.1.2- La dominance d'Ikaros sur Notch

Notre étude a mis en évidence un effet dominant d'Ikaros sur certaines cibles de la voie Notch. Que ce soit sur *Hes1*, *Cdkn1a* ou sur *Bcl2l1*, ces gènes montrent que l'expression d'Ikaros est suffisante pour que le facteur de transcription prenne place sur des gènes qui, autrement, sont des cibles de RBP-Jκ. Ces données sont en accord avec le fait qu'Ikaros et RBP-Jκ reconnaissent des séquences consensus partiellement similaires sur l'ADN (222), et concordent avec le fait qu'il puisse exister une compétition entre les deux pour les mêmes sites de liaison. L'utilisation du système de culture OP9/OP9-DL1 a permis de démontrer que même en suractivant la voie Notch, Ikaros reste en place sur *Bcl2l1* et *Cdkn1A*. RBP-Jκ et le fragment interne de Notch (NICD) ne semblent pas être en mesure de déplacer Ikaros une fois que celui-ci est lié à ses gènes cibles. Des études sur *Hes1* dans les lymphocytes suggèrent aussi qu'Ikaros y exerce un effet dominant (222). De plus l'utilisation de la technique de ChIP-seq dans des lymphocytes T a permis de mettre en évidence qu'Ikaros se lie et réprime l'expression de plusieurs gènes ciblés et activés par Notch (226). Par conséquent, l'expression d'Ikaros a un effet dominant sur l'activation de la voie Notch.

Ikaros pourrait-il exercer un effet de dominance sur d'autres voies de signalisation? Une étude récente a mis en évidence qu'Ikaros régule directement des gènes cibles de l'interleukine 7 (IL-7), et que cette régulation est indispensable à la différenciation des lymphocytes pré-pro B

en lymphocytes pré B (227). Dans ce cas là, Ikaros exerce un effet dominant sur le signal de l'IL-7 en l'atténuant.

D'autres voies de signalisation sont importantes au cours de l'hématopoïèse, comme la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B, requise au cours de la lymphopoïèse pour la survie des précurseurs de lymphocytes T, des précurseurs et lymphocytes B et des lymphocytes B matures (228), mais inhibant l'érythropoïèse en réprimant l'expression des gènes érythroïdes (229). La séquence consensus reconnue sur l'ADN par le NF- $\kappa$ B est partiellement similaire à celle reconnue par RBP-J $\kappa$  et Ikaros (230). Il serait intéressant de déterminer s'il existe aussi un effet de compétition entre Ikaros et NF- $\kappa$ B. L'ensemble des données publiées sur Ikaros et les voies de signalisation hématopoïétiques suggèrent que de façon plus large, Ikaros participe au contrôle de la réponse des cellules hématopoïétiques à différentes voies de signalisation. L'intérêt de cette action pourrait être de permettre aux cellules d'effectuer une régulation fine de l'activité des voies de signalisation modulées par Ikaros, et à éviter une suractivation des voies dans certains cas.

#### **4.2- L'interaction Ikaros/Notch dans la différenciation**

L'anémie observée dans les souris Ikaros<sup>null</sup> a été le premier élément laissant supposer un effet d'Ikaros sur la différenciation érythroïde (145). Il était proposé que ce soit un effet indirect du désordre hématologique qui caractérise les souris Ikaros<sup>null</sup> (145). Nous avons démontré que l'effet d'Ikaros dans les cellules érythroïdes est, du moins en partie, associé à sa capacité de réguler la voie Notch. Les études précédentes sur Notch et l'érythropoïèse présentaient des contradictions liées aux modèles d'études utilisés (212-215). Pour résumer, l'ensemble de ces données montre d'une part l'effet favorable de Notch pour l'engagement dans la voie

érythroïde, et d'autre part l'effet défavorable de Notch pour la progression de la différenciation une fois que les cellules sont engagées dans le lignage érythroïde. Notre étude montre que la voie Notch interfère avec la différenciation érythroïde via Hes1, et qu'en temps normal, le rôle d'Ikaros est de protéger la continuité de la différenciation érythroïde en empêchant la voie Notch d'interférer avec le processus.

#### **4.3- L'interaction Ikaros/Notch dans la régulation de l'apoptose**

Le premier élément que nous ayons observé concernant la régulation de l'apoptose par Ikaros est qu'il active l'expression de *Bcl2l1* de façon plus modérée que Notch. Il est probable que ce phénomène permette à la cellule de rester sensible aux signaux d'apoptose qu'elle perçoit de son environnement. Par contre, le niveau de surexpression observé lorsqu'Ikaros est absent suggère que l'induction de l'apoptose suite à un dommage cellulaire ainsi que la régulation de l'homeostasie des cellules érythroïdes par l'apoptose ne soit alors, plus possible. Par ailleurs, Ikaros n'influence pas l'apoptose des cellules érythroïdes uniquement via le contrôle de l'expression de *Bcl2l1*. En effet, nos données de RNA-seq ont révélé que l'apoptose est l'un des processus physiologiques les plus affectés par la délétion d'Ikaros. Différents gènes liés à l'apoptose (*Bcl2l2*, *Mcl1*) dont l'expression varie chez les mutants Ikaros<sup>null</sup>, suggèrent que ce facteur de transcription joue un rôle majeur dans la réponse cellulaire aux signaux apoptotiques.

Il est probable que la fonction d'Ikaros dans le contrôle de l'apoptose observé dans les EryC soit, en fait, important dans toutes les cellules hématopoïétiques. En effet, il a été démontré qu'Ikaros est essentiel à la survie des lymphocytes T au cours de leur étape de sélection, et que sa perte de fonction y mène à une apoptose massive et donc à une perte accrue de lymphocytes

T issus de cette étape. Ikaros semble permettre le maintien de l'expression des anti-apoptotiques à un niveau suffisant pour qu'une partie physiologiquement acceptable de lymphocytes survive, sans pour autant générer des cellules présentant une résistance anormale aux signaux apoptotiques (231). Cependant, il est essentiel de noter que pendant de la sélection des lymphocytes T, le signal Notch est abrogé (232) et que donc les éléments reliés à l'apoptose ne sont pas sous son contrôle.

L'effet anti-apoptotique de la voie Notch en l'absence d'Ikaros est potentiellement important dans les leucémies lymphoïdes aiguës caractérisées par la perte de fonction d'Ikaros. En effet, les mutations gain de fonction de la voie Notch sont fréquemment associées à la perte de fonction d'Ikaros (220, 221), et dans ce type de leucémies, l'expression de *Bcl2l1* est fréquemment accrue (121). Il a récemment été observé par ChIP-seq qu'Ikaros se lie à *Bcl2l1* dans les cellules lymphoïdes et que chez les mutants Ikaros<sup>null</sup> l'expression de *Bcl2l1* est augmentée (166). L'ensemble de ces éléments suggèrent que l'activation bimodale de *Bcl2l1* (avec Ikaros ou Notch lorsqu'Ikaros est muté) pourrait s'appliquer aux lymphocytes et particulièrement aux cellules néoplasiques lymphoïdes.

#### **4.4- La régulation génique médiée par Ikaros**

Il était connu qu'Ikaros utilise le complexe NuRD pour réguler ses cibles notamment en permettant l'agrégation autour des sites où se situe le facteur de transcription (165). Cependant, Ikaros peut aussi recruter GATA1. Ce dernier pouvant s'associer au complexe PRC2 (111), il est cohérent que nous ayons détecté le recrutement du PRC2 sur *Hes1*. Par ailleurs nous avons détecté par spectrométrie de masse qu'Ikaros peut interagir avec Jarid2 (Bottardi et al., soumis), une sous unité facultative du complexe PRC2 (233). Il est intéressant

de noter que les complexes NuRD et PRC2 ne sont pas exclusifs. Récemment il a été montré que certaines sous unités communes des deux complexes pouvaient interagir ensemble (160). Enfin il a été montré que la désacétylation de H3K27 par les HDACs de NuRD facilite la triméthylation de cet acide aminé par le PRC2 (159). Le fait que nous détectons ces deux complexes ensemble sur Hes1 alors qu'Ikaros peut interagir avec des sous unités de chacun d'entre eux, suggère qu'Ikaros peut participer à la formation d'un méga-complexe de répression transcriptionnelle dans lequel se retrouvent NuRD et le PRC2. Cela implique qu'Ikaros organise le promoteur de ces gènes cibles dans les cas de répression. Au niveau de l'activation, un effet similaire est observé avec la perte de recrutement de GATA1 et Mi-2 sur le promoteur en l'absence du facteur de transcription. Par conséquent notre étude montre clairement l'influence d'Ikaros dans l'organisation du promoteur de ses gènes cibles via les multiples recrutements, que ce soit de facteurs de transcription comme de complexes de modification/remodelage chromatinien, qu'il permet.

Nous avons précédemment démontré qu'Ikaros participait à l'élongation transcriptionnelle via son association avec le P-TEFb. L'étude sur *Bcl2l1* montre que son effet va encore plus loin en décrivant l'activation bimodale d'un gène, et son effet phénotypique. Ikaros peut recruter un complexe d'élongation P-TEFb-NuRD et interagir avec les complexes d'élongation de la famille MLL. Le facteur de transcription permet la sélection du complexe d'élongation recruté et induit la mise en place d'une combinaison spécifique de modifications épigénétiques d'élongation. En son absence, le module NICD-RBP-Jκ induit son propre mode d'élongation en recrutant un complexe SETD1A sur *Bcl2l1*. NICD est capable d'interagir avec la protéine SETD1A comme avec les MLL, cependant le fait que nous détectons SETD1A plutôt qu'une protéine du type MLL sur *Bcl2l1* est supporté de façon indirecte par d'autres



études démontrant que NICD s'associe au complexe favorisant la transcription PAF1 (234) et Bre-1 (235). Or PAF1 a la particularité de se lier de façon directe à SETD1A et SETD1B (236). La machinerie associée au complexe RBP-J $\kappa$ /NICD pourrait donc privilégier un complexe SETD1 plutôt qu'un complexe MLL. Il faut aussi noter que des données cliniques indiquent l'existence de leucémies présentant des protéines de fusion MLL-MAML2 (MAML2 est un coactivateur associé à NICD) (237), ce qui suggère que le signal Notch n'a pas tendance à être associé aux protéines MLL pour activer ses gènes cibles.

La régulation bimodale de *Bcl2l1* est aussi caractérisée par une variation de la chromatine. Nous avons notamment détecté un enrichissement en lysine 36 triméthylée de l'histone H3 (H3K36me3), plus abondant en présence d'Ikaros, et un enrichissement en lysine 79 diméthylée de l'histone H3 (H3K79me2) plus abondant avec NICD-RBP-J $\kappa$ . Ces deux marques épigénétiques sont associées à l'élongation transcriptionnelle (42) et ne sont pas forcément détectées ensemble, sans pour autant être exclusives (238), ce qui est un élément de plus suggérant qu'il existe des variations dans les complexes d'élongation.

Le dépôt de la marque H3K36me3 avait déjà été montré comme étant influencé par Ikaros et NuRD (166), mais le cas de *Bcl2l1* indique que même si le module NICD-RBP-J $\kappa$  est capable de suractiver l'expression du gène, cette modification épigénétique requiert la présence d'Ikaros. Dans le même temps, NICD/RBP-J $\kappa$  semble favoriser le dépôt de H3K79me2, une marque associée à une élongation plus rapide des gènes, tandis que le dépôt de H3K36me3 ne semble pas présenter pas ces caractéristiques (239). DOT1L, l'enzyme HMT qui dépose la marque, est de plus en plus reconnue pour son implication lors de la leukémogénèse (69). Cette protéine s'associe préférentiellement à SETD1A/SETD1B par interaction directe avec la sous-unité des complexes SETD1 Cps35 (240), et avec plusieurs sous-unités du SEC, comme

AFF9 ou encore AFF10 (241, 242). Par ailleurs, les données cliniques de patients leucémiques ont permis de mettre en évidence qu'une interaction MLL/DOT1L peut induire des pathologies (243). Toujours au niveau clinique, la présence de protéines de fusion comprenant une partie de MLL1 est récurrente dans tous les types de leucémies (244). Bien souvent ces protéines sont issues de la fusion de MLL1 avec des protéines du SEC telles que AFF9, AFF10 ou encore AFF4 (244), ce qui génère un recrutement systématique de DOT1L aux gènes régulés par MLL1 et une surabondance de H3K79me2 à travers le génome (245). La présence de ces protéines de fusions semble mimer un recrutement quasi-systématique des complexes SETD1, ce qui provoque une dérégulation génique massive. Associées à nos résultats, ces données suggèrent que, comme nous l'avons vu sur *Bcl2l1*, les MLL ne s'associent que rarement avec DOT1L et donc à la H3K79me2.

De façon générale Ikaros agit sur plusieurs niveaux du processus de transcription. D'abord, son organisation du promoteur permet d'influer sur l'activation ou la répression d'un gène cible. Enfin, l'organisation par Ikaros des modalités d'élongation transcriptionnelle sur ses gènes cibles semble réguler le niveau d'expression des gènes une fois activé, potentiellement en régulant la vitesse d'élongation des gènes.

#### **4.5- Ikaros et plasticité cellulaire**

Nos données de RNA-seq ont révélé que de façon directe ou indirecte, Ikaros pouvait réguler tous les aspects de la biologie des cellules érythroïdes, que ce soit le métabolisme, le cycle cellulaire, l'apoptose, et même la réponse aux signaux externes. De plus, ces résultats indiquent qu'Ikaros influence l'identité même des cellules érythroïdes. En effet, nos données révèlent l'activation de programmes cellulaires différents du programme érythroïde dans les

cellules Ter119<sup>+</sup> (marqueur de cellule érythroïde), en l'absence d'Ikaros, comme l'angiogénèse, ou encore la neurogénèse. S'il était connu que Notch favorisait la lymphopoïèse, chez les progéniteurs hématopoïétiques (246), la suractivation de Notch doit être couplée à l'absence d'Ikaros pour permettre l'activation du programme lymphoïde dans des cellules érythroïdes. Ensemble, ces résultats suggèrent qu'Ikaros agit tel un gardien de l'identité des cellules érythroïde.

Les effets de l'absence d'Ikaros concernant l'identité cellulaire sont à mettre en opposition avec l'effet déjà connu de « priming » du facteur de transcription au niveau lymphoïde (247). Les progéniteurs hématopoïétiques expriment à de faibles niveaux les programmes transcriptionnels de différents lignages simultanément (248, 249). C'est cette mise en place des programmes transcriptionnels lignage-spécifiques qu'on appelle priming. La capacité d'Ikaros à assurer la différenciation précoce en lymphocyte réside dans l'activation des gènes composant le programme transcriptionnel lymphoïde et la répression des gènes myéloïdes spécifiques (247). L'expression anormale de gènes affiliés aux lignages non érythroïdes dans les cellules érythroïdes des souris Ikaros<sup>null</sup> suggère qu'Ikaros est un élément déterminant du maintien du programme transcriptionnel érythroïde. Contrairement à ce qui était supposé, son effet ne se limite pas à mettre en place le programme lymphoïde mais aussi à favoriser la différenciation érythroïde en réprimant les gènes issus des programmes non-érythroïdes.

Comment Ikaros pourrait-il jouer un rôle de renforcement de l'identité cellulaire? Si dans les cellules lymphoïdes cela passe par son contrôle direct de plusieurs gènes clés pour la différenciation lymphocytaire (126, 250), au niveau des autres lignages, le mécanisme demeure obscur. Cependant les travaux de notre équipe pourraient suggérer une piste pour cela. Nous avons récemment démontré qu'Ikaros interagit de façon directe avec les facteurs de

transcription hématopoïétiques de la famille GATA : GATA1, GATA2 et GATA3 (114). Ces interactions ont lieu dans les lignages exprimant spécifiquement chaque facteur de la famille. On retrouve donc l'interaction Ikaros/GATA1 dans les cellules érythroïdes, Ikaros/GATA2 dans les progéniteurs plus précoces et Ikaros/GATA3 dans les cellules lymphoïdes (114). De plus, nous avons démontré qu'Ikaros aide au recrutement de GATA1 dans les cellules érythroïdes (157) et de GATA2 dans les progéniteurs hématopoïétiques (lineage negative) (114). Par ailleurs, il a été démontré que les autres facteurs de transcription de la famille d'Ikaros sont exprimés dans les lymphocytes : les cellules B pour Aiolos (251), les cellules T pour Helios (252), les T régulateurs pour Eos (253). Ces facteurs sont essentiels à la différenciation des lignages les exprimant. Il est probable que leur association avec Ikaros soit essentielle à leur action. L'ensemble de ces données suggèrent qu'Ikaros utilise ses interactions avec les facteurs de transcription lignage spécifique pour participer au maintien de l'identité cellulaire.

La perte d'expression d'Ikaros pourrait mener à une perte de son effet de priming de lignage. En effet, des essais de différenciation de progéniteurs hématopoïétiques sur milieu semi solide (essai CFU) (Bottardi et al., soumis) ont montré que la perte d'Ikaros se traduit par un effet clair de déséquilibre dans les proportions de chaque lignage pendant la différenciation. Par conséquent la perte du priming d'Ikaros influence l'orientation de la différenciation des progéniteurs vers un lignage donné.

L'effet de Notch en l'absence d'Ikaros pourrait en partie expliquer les déséquilibres induits par la perte d'expression du facteur de transcription. En l'absence d'Ikaros l'induction d'un signal Notch extrinsèque provoque l'augmentation d'expression des gènes associés au programme transcriptionnel lymphoïde. Cela suggère qu'Ikaros protège les cellules

érythroïdes d'une activation du programme lymphoïde par la voie Notch. Ce qui laisse supposer que cet effet pourrait être retrouvé dans les progéniteurs hématopoïétiques.

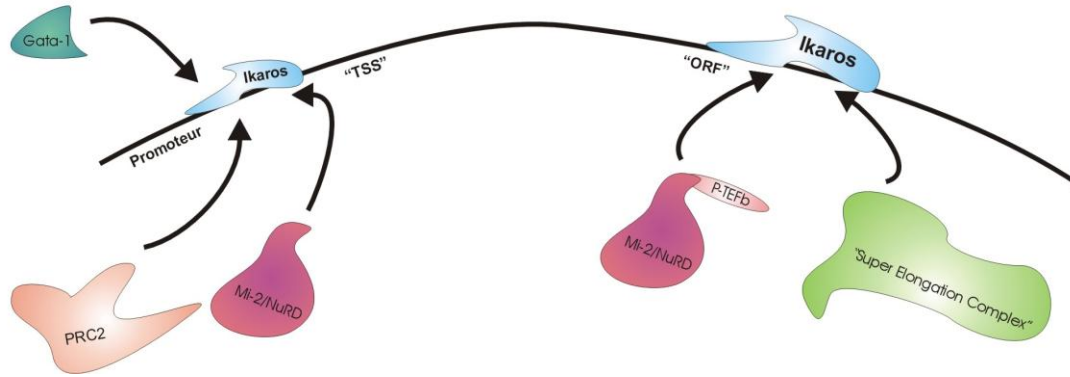
En résumé, nos données suggèrent qu'Ikaros agit comme une plateforme transcriptionnelle dans les cellules progénitrices et permet le priming des gènes en fonction des différentes lignées hématopoïétiques. Il participe à la mise en place de programmes transcriptionnels distincts en s'associant aux facteurs de transcription lignage spécifique et en favorisant leur recrutement. Ceci permet d'organiser les promoteurs de ses gènes cibles. Il régule aussi l'élongation transcriptionnelle des gènes activés au niveau de l'unité de transcription. Cette régulation permet de moduler le niveau d'expression des gènes par le contrôle de la vitesse d'élongation, ce qui favorise le maintien de l'expression des gènes cibles à un niveau physiologique (Figure 1). La perte d'Ikaros mène à la perte de priming et de régulation du niveau de transcription (par le contrôle du mécanisme de l'élongation). Cette perte serait donc associée à une diminution de la capacité de différenciation des cellules progénitrices et de spécificité des transcriptomes des lignées hématopoïétiques. Ceci pourrait expliquer les problèmes de différenciation observés en son absence, que ce soit dans les cellules lymphoïdes (254), érythroïdes (157) et probablement dans l'ensemble des autres lignages hématopoïétiques (103, 147).

Premier niveau de régulation : Organisation du promoteur  
(régulation qualitative: Activation/Répression)

Recrutement :  
Facteurs de transcription (Gata-1)  
Complexe de remodelage/modification de chromatine  
(Mi-2/NuRD, PRC2)

Deuxième niveau de régulation : Régulation de l'élongation  
(régulation quantitative: ++ vs. ++++)

Recrutement de complexes associés à l'élongation :  
Complexe P-TEFb-NuRD  
Sélection de "Super Elongation Complex"



**Figure 1 : SCHEMA REPRESENTANT LA REGULATION GENIQUE PAR IKAROS**

## Conclusion

Au cours de notre étude nous avons démontré que le facteur de transcription Ikaros est impliqué dans le maintien de l'homéostasie érythroïde à plusieurs niveaux. Par son inhibition de la voie Notch et de *Hes1* il participe à la progression de la différenciation érythroïde. Ikaros renforce par ailleurs le maintien d'un programme transcriptionnel érythroïde spécifique en réprimant l'expression des gènes non érythroïdes. Il influence l'homéostasie érythroïde en régulant aussi l'apoptose des cellules érythroïdes, via plusieurs gènes dont *Bcl2l1* (codant pour la protéine Bcl-X<sub>L</sub>) ce qui permet de maintenir le niveau d'expression de ce gène à un niveau physiologique. En absence d'Ikaros, la voie de signalisation Notch est suractivée et va augmenter l'expression de *Bcl2l1* de façon directe, ce qui rend les cellules érythroïdes anormalement résistantes à l'apoptose.

Nous avons aussi mis en évidence différents mécanismes de régulation transcriptionnelle impliquant Ikaros. Au niveau du gène *Hes1*, Ikaros participe au recrutement d'un autre facteur de transcription, GATA1 et du complexe modifieur de chromatine PRC2 pour réprimer l'expression du gène. Par contre, au niveau du gène *Bcl2l1*, Ikaros participe à l'activation transcriptionnelle du gène en participant au recrutement d'un complexe associé à l'élongation de la famille MLL, MLL4, ainsi qu'un complexe nouvellement découvert contenant P-TEFb-NuRD et promouvant l'élongation. En l'absence d'Ikaros, la voie Notch active directement l'expression de *Bcl2l1* à un niveau anormalement élevé, qui corrèle avec le recrutement d'un complexe d'élongation SETD1A, et la mise en place d'une chromatine porteuse de modifications épigénétiques distinctes de celles observées lorsqu'Ikaros est présent.

Jusqu'ici l'action d'Ikaros était surtout caractérisée dans les lymphocytes. Nous avons démontré son importance dans les cellules érythroïdes et les progéniteurs hématopoïétiques. Nous avons aussi mis en évidence les protéines utilisées par Ikaros pour réguler ses gènes cibles, ainsi que l'existence d'un circuit génétique ayant un rôle potentiellement majeur lors de l'hématopoïèse. De fait, les éléments utilisés par Ikaros pour réguler ce circuit sont fréquemment mutés ou présentent une fonction dérégulée dans les leucémies. Le détail du fonctionnement d'Ikaros avec ces protéines, provenant notamment du complexe Polycomb PRC2, pour la répression et des complexes d'élongation de la transcription de la famille MLL pour l'activation transcriptionnelle, permettront de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans les désordres hématologiques caractérisés par la perte de fonction d'Ikaros, et de potentiellement trouver des éléments de traitement de ces pathologies.



## **Bibliographie**

1. Mazzarello P. A unifying concept: the history of cell theory. *Nat Cell Biol.* 1999;1(1):E13-E5.
2. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1990;87(12):4576-9.
3. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. *Molecular Cell Biology.* 4th ed. New York: W. H. Freeman 2000.
4. Chargaff E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia.* 1950;6(6):201-9.
5. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids. *Nature.* 1953;171(4356):737-8.
6. Crick FHC, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ. General nature of the genetic code for proteins. *Nature.* 1961;192(4809):1227-32.
7. Griffiths AJF, Wessler SR, Carroll SB, Doebley J. *An Introduction to Genetic Analysis.* Tenth ed. New York: W H Freeman; 2012.
8. Rando OJ, Chang HY. Genome-wide views of chromatin structure. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:245-71.
9. Butler JE, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & development.* 2002;16(20):2583-92.
10. Ong CT, Corces VG. Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nat Rev Genet.* 2011;12(4):283-93.

11. Liu X, Bushnell DA, Kornberg RD. RNA polymerase II transcription: structure and mechanism. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1829(1):2-8.
12. Carlsten JO, Zhu X, Gustafsson CM. The multitalented Mediator complex. *Trends Biochem Sci*. 2013;38(11):531-7.
13. Luse DS. Promoter clearance by RNA polymerase II. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1829(1):63-8.
14. Shandilya J, Roberts SG. The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1819(5):391-400.
15. Kwak H, Lis JT. Control of transcriptional elongation. *Annu Rev Genet*. 2013;47:483-508.
16. Marshall NF, Price DH. Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol*. 1992;12(5):2078-90.
17. Peng J, Zhu Y, Milton JT, Price DH. Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes & development*. 1998;12(5):755-62.
18. Yamaguchi Y, Takagi T, Wada T, Yano K, Furuya A, Sugimoto S, et al. NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*. 1999;97(1):41-51.
19. Wada T, Takagi T, Yamaguchi Y, Ferdous A, Imai T, Hirose S, et al. DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes & development*. 1998;12(3):343-56.
20. Adelman K, Lis JT. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat Rev Genet*. 2012;13(10):720-31.

21. Shilatifard A. The RNA polymerase II general elongation complex. *Biological chemistry*. 1998;379(1):27-31.
22. Czudnochowski N, Bosken CA, Geyer M. Serine-7 but not serine-5 phosphorylation primes RNA polymerase II CTD for P-TEFb recognition. *Nature communications*. 2012;3:842.
23. Marshall NF, Peng J, Xie Z, Price DH. Control of RNA Polymerase II Elongation Potential by a Novel Carboxyl-terminal Domain Kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(43):27176-83.
24. Eissenberg JC, Shilatifard A, Dorokhov N, Michener DE. Cdk9 is an essential kinase in *Drosophila* that is required for heat shock gene expression, histone methylation and elongation factor recruitment. *Molecular genetics and genomics : MGG*. 2007;277(2):101-14.
25. Shuman S. What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(8):619-25.
26. Peterlin BM, Price DH. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell*. 2006;23(3):297-305.
27. Luo Z, Lin C, Shilatifard A. The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(9):543-7.
28. Matlin AJ, Clark F, Smith CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(5):386-98.
29. Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008;456(7221):470-6.
30. Misteli T, Spector DL. RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Mol Cell*. 1999;3(6):697-705.

31. Ip JY, Schmidt D, Pan Q, Ramani AK, Fraser AG, Odom DT, et al. Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome Res.* 2011;21(3):390-401.
32. Chathoth KT, Barrass JD, Webb S, Beggs JD. A splicing-dependent transcriptional checkpoint associated with prespliceosome formation. *Mol Cell.* 2014;53(5):779-90.
33. Zlotorynski E. Transcription: transcript elongation: pause at your peril. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2014;15(7):430-1.
34. Colgan DF, Manley JL. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes & development.* 1997;11(21):2755-66.
35. Kuehner JN, Pearson EL, Moore C. Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2011;12(5):283-94.
36. Vickaryous MK, Hall BK. Human cell type diversity, evolution, development, and classification with special reference to cells derived from the neural crest. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society.* 2006;81(3):425-55.
37. Kee BL. A comprehensive transcriptional landscape of human hematopoiesis. *Cell Stem Cell.* 2011;8(2):122-4.
38. Bray SJ. Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2006;7(9):678-89.
39. Novershtern N, Subramanian A, Lawton LN, Mak RH, Haining WN, McConkey ME, et al. Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. *Cell.* 2011;144(2):296-309.
40. Sutherland H, Bickmore WA. Transcription factories: gene expression in unions? *Nat Rev Genet.* 2009;10(7):457-66.

41. Graff J, Tsai LH. Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(2):97-111.
42. Zhou VW, Goren A, Bernstein BE. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat Rev Genet.* 2011;12(1):7-18.
43. Sanchez R, Zhou MM. The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Current opinion in drug discovery & development.* 2009;12(5):659-65.
44. Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):231-4.
45. Dey A, Chitsaz F, Abbasi A, Misteli T, Ozato K. The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(15):8758-63.
46. Jang MK, Mochizuki K, Zhou M, Jeong HS, Brady JN, Ozato K. The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell.* 2005;19(4):523-34.
47. Itzen F, Greifenberg AK, Bosken CA, Geyer M. Brd4 activates P-TEFb for RNA polymerase II CTD phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(12):7577-90.
48. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet.* 2012;13(5):343-57.
49. Eissenberg JC. Structural biology of the chromodomain: form and function. *Gene.* 2012;496(2):69-78.
50. Aasland R, Stewart AF. The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(16):3168-73.

51. Brasher SV, Smith BO, Fogh RH, Nietlispach D, Thiru A, Nielsen PR, et al. The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *EMBO J.* 2000;19(7):1587-97.
52. Thiru A, Nietlispach D, Mott HR, Okuwaki M, Lyon D, Nielsen PR, et al. Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J.* 2004;23(3):489-99.
53. Lu X, Wontakal SN, Emelyanov AV, Morcillo P, Konev AY, Fyodorov DV, et al. Linker histone H1 is essential for *Drosophila* development, the establishment of pericentric heterochromatin, and a normal polytene chromosome structure. *Genes & development.* 2009;23(4):452-65.
54. Pham AD, Sauer F. Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science.* 2000;289(5488):2357-60.
55. Kalb R, Latwiel S, Baymaz HI, Jansen PW, Muller CW, Vermeulen M, et al. Histone H2A monoubiquitination promotes histone H3 methylation in Polycomb repression. *Nature structural & molecular biology.* 2014;21(6):569-71.
56. Fuchs G, Hollander D, Voickek Y, Ast G, Oren M. Co-transcriptional histone H2B monoubiquitylation is tightly coupled with RNA polymerase II elongation rate. *Genome Res.* 2014.
57. Johansen KM, Johansen J. Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology.* 2006;14(4):393-404.
58. Martinez-Zamudio R, Ha HC. Histone ADP-ribosylation facilitates gene transcription by directly remodeling nucleosomes. *Mol Cell Biol.* 2012;32(13):2490-502.

59. Shio Y, Eisenman RN. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(23):13225-30.
60. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011;469(7330):343-9.
61. Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, et al. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes & development*. 2002;16(14):1779-91.
62. Peters AHFM, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AAHA, Perez-Burgos L, et al. Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin. *Molecular Cell*. 2003;12(6):1577-89.
63. Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schofer C, et al. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*. 2001;107(3):323-37.
64. Smith E, Lin C, Shilatifard A. The super elongation complex (SEC) and MLL in development and disease. *Genes & development*. 2011;25(7):661-72.
65. Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NCT, et al. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. 2002;419(6905):407-11.
66. Hu D, Gao X, Morgan MA, Herz HM, Smith ER, Shilatifard A. The MLL3/MLL4 branches of the COMPASS family function as major histone H3K4 monomethylases at enhancers. *Mol Cell Biol*. 2013;33(23):4745-54.
67. Duns G, van den Berg E, van Duivenbode I, Osinga J, Hollema H, Hofstra RM, et al. Histone methyltransferase gene SETD2 is a novel tumor suppressor gene in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2010;70(11):4287-91.

68. Wagner EJ, Carpenter PB. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(2):115-26.
69. McLean CM, Karemaker ID, van Leeuwen F. The emerging roles of DOT1L in leukemia and normal development. *Leukemia*. 2014.
70. Carvalho S, Raposo AC, Martins FB, Grosso AR, Sridhara SC, Rino J, et al. Histone methyltransferase SETD2 coordinates FACT recruitment with nucleosome dynamics during transcription. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(5):2881-93.
71. Nguyen AT, Zhang Y. The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes & development*. 2011;25(13):1345-58.
72. Zemach A, McDaniel IE, Silva P, Zilberman D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science*. 2010;328(5980):916-9.
73. Feng YQ, Desprat R, Fu H, Olivier E, Lin CM, Lobell A, et al. DNA methylation supports intrinsic epigenetic memory in mammalian cells. *PLoS Genet*. 2006;2(4):e65.
74. McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA methylation: Molecular mechanisms and clinical implications. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(12):3927-37.
75. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013;14(3):204-20.
76. Gonzalez D, Collier J. DNA methylation by CcrM activates the transcription of two genes required for the division of *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology*. 2013;88(1):203-18.
77. Ramirez J, Hagman J. The Mi-2/NuRD complex: A critical epigenetic regulator of hematopoietic development, differentiation and cancer. *Epigenetics*. 2009;4(8):532-6.



78. Di Croce L, Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(10):1147-55.
79. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930-5.
80. Mohr F, Dohner K, Buske C, Rawat VP. TET genes: new players in DNA demethylation and important determinants for stemness. *Exp Hematol*. 2011;39(3):272-81.
81. Williams K, Christensen J, Helin K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep*. 2012;13(1):28-35.
82. Alberts B. *General Principles Of Cell Communications* 2002.
83. He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25:377-406.
84. Palis J, Yoder MC. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol*. 2001;29(8):927-36.
85. Ueno H, Weissman IL. Clonal analysis of mouse development reveals a polyclonal origin for yolk sac blood islands. *Dev Cell*. 2006;11(4):519-33.
86. Bertrand JY, Chi NC, Santoso B, Teng S, Stainier DY, Traver D. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development. *Nature*. 2010;464(7285):108-11.
87. Ema H, Nakauchi H. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood*. 2000;95(7):2284-8.

88. Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(22):10302-6.
89. Tsiftoglou AS, Bonovolias ID, Tsiftoglou SA. Multilevel targeting of hematopoietic stem cell self-renewal, differentiation and apoptosis for leukemia therapy. *Pharmacology & therapeutics*. 2009;122(3):264-80.
90. Tsiftoglou AS, Vizirianakis IS, Strouboulis J. Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB life*. 2009;61(8):800-30.
91. Fried W. Erythropoietin and erythropoiesis. *Exp Hematol*. 2009;37(9):1007-15.
92. Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood*. 1991;77(12):2583-90.
93. Hasserjian RP, Zuo Z, Garcia C, Tang G, Kasyan A, Luthra R, et al. Acute erythroid leukemia: a reassessment using criteria refined in the 2008 WHO classification. *Blood*. 2010;115(10):1985-92.
94. Vaquez LH. Sur une forme spéciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistante. *Comptes rendus de la Société de biologie*. 1892;44:384-8.
95. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *The New England journal of medicine*. 1976;295(17):913-6.
96. Kralovics R, Teo SS, Buser AS, Brutsche M, Tiedt R, Tichelli A, et al. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood*. 2005;106(10):3374-6.

97. Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernandez-Luna JL. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *The New England journal of medicine*. 1998;338(9):564-71.
98. Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S. Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood*. 2006;107(3):907-15.
99. Zon LI, Youssoufian H, Mather C, Lodish HF, Orkin SH. Activation of the erythropoietin receptor promoter by transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(23):10638-41.
100. Gregory TYCMAOSHBGAWMJ. GATA-1 and Erythropoietin Cooperate to Promote Erythroid Cell Survival by Regulating bcl-xL Expression. *Blood*. 1999;94(1):87-96.
101. Bresnick EH, Lee HY, Fujiwara T, Johnson KD, Keles S. GATA switches as developmental drivers. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(41):31087-93.
102. Bottardi S, Ross J, Bourgoin V, Fotouhi-Ardakani N, Affar el B, Trudel M, et al. Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human gamma-globin genes. *Mol Cell Biol*. 2009;29(6):1526-37.
103. Malinge S, Thiollier C, Chlon TM, Dore LC, Diebold L, Bluteau O, et al. Ikaros inhibits megakaryopoiesis through functional interaction with GATA-1 and NOTCH signaling. *Blood*. 2013;121(13):2440-51.
104. Qiu Z, Dyer KD, Xie Z, Radinger M, Rosenberg HF. GATA transcription factors regulate the expression of the human eosinophil-derived neurotoxin (RNase 2) gene. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(19):13099-109.

105. Takemoto CM, Brandal S, Jegga AG, Lee YN, Shahlaee A, Ying Y, et al. PU.1 positively regulates GATA-1 expression in mast cells. *J Immunol.* 2010;184(8):4349-61.
106. Gobel F, Taschner S, Jurkin J, Konradi S, Vaculik C, Richter S, et al. Reciprocal role of GATA-1 and vitamin D receptor in human myeloid dendritic cell differentiation. *Blood.* 2009;114(18):3813-21.
107. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(22):12355-8.
108. Weiss MJ, Yu C, Orkin SH. Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol.* 1997;17(3):1642-51.
109. Xu Z, Meng X, Cai Y, Koury MJ, Brandt SJ. Recruitment of the SWI/SNF protein Brg1 by a multiprotein complex effects transcriptional repression in murine erythroid progenitors. *The Biochemical journal.* 2006;399(2):297-304.
110. Blobel GA, Nakajima T, Eckner R, Montminy M, Orkin SH. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(5):2061-6.
111. Yu M, Riva L, Xie H, Schindler Y, Moran TB, Cheng Y, et al. Insights into GATA-1-Mediated Gene Activation versus Repression via Genome-wide Chromatin Occupancy Analysis. *Molecular Cell.* 2009;36(4):682-95.
112. Miccio A, Wang Y, Hong W, Gregory GD, Wang H, Yu X, et al. NuRD mediates activating and repressive functions of GATA-1 and FOG-1 during blood development. *EMBO J.* 2010;29(2):442-56.

113. Wilkinson-White L, Gamsjaeger R, Dastmalchi S, Wienert B, Stokes PH, Crossley M, et al. Structural basis of simultaneous recruitment of the transcriptional regulators LMO2 and FOG1/ZFPM1 by the transcription factor GATA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(35):14443-8.
114. Bottardi S, Mavoungou L, Bourgoïn V, Mashtalir N, Affar EB, Milot E. Direct Protein Interactions Are Responsible for Ikaros-GATA and Ikaros-Cdk9 Cooperativeness in Hematopoietic Cells. *Molecular and Cellular Biology*. 2013;33(16):3064-76.
115. Tripic T, Deng W, Cheng Y, Zhang Y, Vakoc CR, Gregory GD, et al. SCL and associated proteins distinguish active from repressive GATA transcription factor complexes. *Blood*. 2009;113(10):2191-201.
116. Tallack MR, Whittington T, Yuen WS, Wainwright EN, Keys JR, Gardiner BB, et al. A global role for KLF1 in erythropoiesis revealed by ChIP-seq in primary erythroid cells. *Genome Res*. 2010;20(8):1052-63.
117. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(1):47-59.
118. Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Nakayama K, et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*. 1995;267(5203):1506-10.
119. Motoyama N, Kimura T, Takahashi T, Watanabe T, Nakano T. bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(11):1691-8.
120. Lu M, Wang J, Li Y, Berenzon D, Wang X, Mascarenhas J, et al. Treatment with the Bcl-xL inhibitor ABT-737 in combination with interferon alpha specifically targets

- JAK2V617F-positive polycythemia vera hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 2010;116(20):4284-7.
121. Addeo R, Caraglia M, Baldi A, D'Angelo V, Casale F, Crisci S, et al. Prognostic role of bcl-xL and p53 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Biology & Therapy*. 2005;4(1):39-45.
122. Schaich M, Illmer T, Seitz G, Mohr B, Schakel U, Beck JF, et al. The prognostic value of Bcl-XL gene expression for remission induction is influenced by cytogenetics in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2001;86(5):470-7.
123. Harb JG, Neviani P, Chyla BJ, Ellis JJ, Ferenchak GJ, Oaks JJ, et al. Bcl-xL anti-apoptotic network is dispensable for development and maintenance of CML but is required for disease progression where it represents a new therapeutic target. *Leukemia*. 2013;27(10):1996-2005.
124. Yagi THSTMKGTYYITITMATSIS. High frequency of Ikaros isoform 6 expression in acute myelomonocytic and monocytic leukemias: implications for up-regulation of the antiapoptotic protein Bcl-XL in leukemogenesis. *Blood*. 2002;99(4):1350-5.
125. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007;446(7137):758-64.
126. Georgopoulos K, Moore DD, Derfler B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science*. 1992;258(5083):808-12.

127. Wang JH, Nichogiannopoulou A, Wu L, Sun L, Sharpe AH, Bigby M, et al. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity*. 1996;5(6):537-49.
128. Naito T, Gómez-del Arco P, Williams CJ, Georgopoulos K. Antagonistic Interactions between Ikaros and the Chromatin Remodeler Mi-2 $\beta$  Determine Silencer Activity and Cd4 Gene Expression. *Immunity*. 2007;27(5):723-34.
129. Urban JA, Winandy S. Ikaros null mice display defects in T cell selection and CD4 versus CD8 lineage decisions. *J Immunol*. 2004;173(7):4470-8.
130. Yoshida T, Ng SY, Georgopoulos K. Awakening lineage potential by Ikaros-mediated transcriptional priming. *Current opinion in immunology*. 2010;22(2):154-60.
131. Payne MA. Zinc finger structure-function in Ikaros Marvin A Payne. *World journal of biological chemistry*. 2011;2(6):161-6.
132. McCarty AS, Kleiger G, Eisenberg D, Smale ST. Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily. *Mol Cell*. 2003;11(2):459-70.
133. Ferreiros-Vidal I, Carroll T, Taylor B, Terry A, Liang Z, Bruno L, et al. Genome-wide identification of Ikaros targets elucidates its contribution to mouse B-cell lineage specification and pre-B-cell differentiation. *Blood*. 2013;121(10):1769-82.
134. Gomez-del Arco P, Maki K, Georgopoulos K. Phosphorylation controls Ikaros's ability to negatively regulate the G(1)-S transition. *Mol Cell Biol*. 2004;24(7):2797-807.
135. John LB, Ward AC. The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. *Mol Immunol*. 2011;48(9-10):1272-8.

136. Sun L, Heerema N, Crotty L, Wu X, Navara C, Vassilev A, et al. Expression of dominant-negative and mutant isoforms of the antileukemic transcription factor Ikaros in infant acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(2):680-5.
137. Gomez-del Arco P, Koipally J, Georgopoulos K. Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol*. 2005;25(7):2688-97.
138. Song C, Li Z, Erbe AK, Savic A, Dovat S. Regulation of Ikaros function by casein kinase 2 and protein phosphatase 1. *World journal of biological chemistry*. 2011;2(6):126-31.
139. Dovat S, Song C, Payne KJ, Li Z. Ikaros, CK2 kinase, and the road to leukemia. *Molecular and cellular biochemistry*. 2011;356(1-2):201-7.
140. Klug CA, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(2):657-62.
141. Nakayama H, Ishimaru F, Katayama Y, Nakase K, Sezaki N, Takenaka K, et al. Ikaros expression in human hematopoietic lineages. *Experimental Hematology*. 2000;28(11):1232-8.
142. Francis OL, Payne JL, Su RJ, Payne KJ. Regulator of myeloid differentiation and function: The secret life of Ikaros. *World journal of biological chemistry*. 2011;2(6):119-25.
143. Tarchini B, Jolicoeur C, Cayouette M. In vivo evidence for unbiased Ikaros retinal lineages using an Ikaros-Cre mouse line driving clonal recombination. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2012;241(12):1973-85.
144. Alsio JM, Tarchini B, Cayouette M, Livesey FJ. Ikaros promotes early-born neuronal fates in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(8):E716-25.



145. Lopez RA, Schoetz S, DeAngelis K, O'Neill D, Bank A. Multiple hematopoietic defects and delayed globin switching in Ikaros null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(2):602-7.
146. Papathanasiou P, Perkins AC, Cobb BS, Ferrini R, Sridharan R, Hoyne GF, et al. Widespread failure of hematolymphoid differentiation caused by a recessive niche-filling allele of the Ikaros transcription factor. *Immunity*. 2003;19(1):131-44.
147. Dumortier A, Kirstetter P, Kastner P, Chan S. Ikaros regulates neutrophil differentiation2003 2003-03-15 00:00:00. 2219-26 p.
148. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*. 2008;453(7191):110-4.
149. Mullighan CG. New strategies in acute lymphoblastic leukemia: translating advances in genomics into clinical practice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(3):396-400.
150. Mullighan CG. Genomic profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Best practice & research Clinical haematology*. 2011;24(4):489-503.
151. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012;481(7380):157-63.
152. Nakase K, Ishimaru F, Avitahl N, Dansako H, Matsuo K, Fujii K, et al. Dominant negative isoform of the Ikaros gene in patients with adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2000;60(15):4062-5.

153. Sezaki N, Ishimaru F, Takata M, Tabayashi T, Nakase K, Kozuka T, et al. Over-expression of the dominant-negative isoform of Ikaros confers resistance to dexamethasone-induced and anti-IgM-induced apoptosis. *Br J Haematol.* 2003;121(1):165-9.
154. Ezzat S, Zhu X, Loeper S, Fischer S, Asa SL. Tumor-derived Ikaros 6 acetylates the Bcl-XL promoter to up-regulate a survival signal in pituitary cells. *Molecular endocrinology.* 2006;20(11):2976-86.
155. O'Neill DW, Schoetz SS, Lopez RA, Castle M, Rabinowitz L, Shor E, et al. An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol Cell Biol.* 2000;20(20):7572-82.
156. Koipally J, Renold A, Kim J, Georgopoulos K. Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO Journal.* 1999;18(11):3090-100.
157. Ross J, Mavoungou L, Bresnick EH, Milot E. GATA-1 utilizes Ikaros and polycomb repressive complex 2 to suppress Hes1 and to promote erythropoiesis. *Mol Cell Biol.* 2012;32(18):3624-38.
158. Bowen NJ, Fujita N, Kajita M, Wade PA. Mi-2/NuRD: Multiple complexes for many purposes. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression.* 2004;1677(1-3):52-7.
159. Reynolds N, Salmon-Divon M, Dvinge H, Hynes-Allen A, Balasooriya G, Leaford D, et al. NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression. *EMBO J.* 2012;31(3):593-605.
160. Pegoraro G, Kubben N, Wickert U, Gohler H, Hoffmann K, Misteli T. Ageing-related chromatin defects through loss of the NURD complex. *Nat Cell Biol.* 2009;11(10):1261-7.

161. Helbling Chadwick L, Chadwick BP, Jaye DL, Wade PA. The Mi-2/NuRD complex associates with pericentromeric heterochromatin during S phase in rapidly proliferating lymphoid cells. *Chromosoma*. 2009;118(4):445-57.
162. Cobb BS, Morales-Alcelay S, Kleiger G, Brown KE, Fisher AG, Smale ST. Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. *Genes and Development*. 2000;14(17):2146-60.
163. Gururaj AE, Singh RR, Rayala SK, Holm C, Den Hollander P, Zhang H, et al. MTA1, a transcriptional activator of breast cancer amplified sequence 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(17):6670-5.
164. Crook JM, Dunn NR, Colman A. Repressed by a NuRD. *Nat Cell Biol*. 2006;8(3):212-4.
165. Kim J, Sif S, Jones B, Jackson A, Koipally J, Heller E, et al. Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity*. 1999;10(3):345-55.
166. Zhang J, Jackson AF, Naito T, Dose M, Seavitt J, Liu F, et al. Harnessing of the nucleosome-remodeling-deacetylase complex controls lymphocyte development and prevents leukemogenesis. *Nat Immunol*. 2012;13(1):86-94.
167. Chapman RD, Heidemann M, Hintermair C, Eick D. Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends in genetics : TIG*. 2008;24(6):289-96.
168. Egloff S, Murphy S. Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends in genetics : TIG*. 2008;24(6):280-8.
169. Li Z, Song C, Ouyang H, Lai L, Payne KJ, Dovat S. Cell cycle-specific function of Ikaros in human leukemia. *Pediatric blood & cancer*. 2012;59(1):69-76.

170. JS. D. The Analysis of a Case of Continuous Variation In *Drosophila* by a Study of its Linkage Relationship. *The American Naturalist*. 1914;48.
171. Petrovic J, Formosa-Jordan P, Luna-Escalante JC, Abelló G, Ibañes M, Neves J, et al. Ligand-dependent Notch signaling strength orchestrates lateral induction and lateral inhibition in the developing inner ear. *Development*. 2014;141(11):2313-24.
172. Dutta S, Dietrich J-E, Westerfield M, Varga ZM. Notch signaling regulates endocrine cell specification in the zebrafish anterior pituitary. *Developmental Biology*. 2008;319(2):248-57.
173. Walker D. Neurogenesis: Pathways for population balance. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(11):731-.
174. Lewis J, Hanisch A, Holder M. Notch signaling, the segmentation clock, and the patterning of vertebrate somites. *Journal of Biology*. 2009;8(4):44.
175. Irvine KD. Fringe, Notch, and making developmental boundaries. *Current opinion in genetics & development*. 1999;9(4):434-41.
176. Kiecker C, Lumsden A. Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(7):553-64.
177. Bigas A, Espinosa L. Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. *Blood*. 2012;119(14):3226-35.
178. Pajcini KV, Speck NA, Pear WS. Notch signaling in mammalian hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2011;25(10):1525-32.
179. Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, et al. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):8108-12.

180. Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*. 1997;90(2):281-91.
181. Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC. The molecular logic of Notch signaling – a structural and biochemical perspective. *Journal of Cell Science*. 2008;121(19):3109-19.
182. Fleming RJ. Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 1998;9(6):599-607.
183. Robert-Moreno A, Guiu J, Ruiz-Herguido C, Lopez ME, Ingles-Esteve J, Riera L, et al. Impaired embryonic haematopoiesis yet normal arterial development in the absence of the Notch ligand Jagged1. *EMBO J*. 2008;27(13):1886-95.
184. Duarte A, Hirashima M, Benedito R, Trindade A, Diniz P, Bekman E, et al. Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes & development*. 2004;18(20):2474-8.
185. Krebs LT, Shutter JR, Tanigaki K, Honjo T, Stark KL, Gridley T. Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes & development*. 2004;18(20):2469-73.
186. Bigas A, Robert-Moreno A, Espinosa L. The Notch pathway in the developing hematopoietic system. *The International journal of developmental biology*. 2010;54(6-7):1175-88.
187. Kao HY, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, et al. A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes & development*. 1998;12(15):2269-77.

188. Wallberg AE, Pedersen K, Lendahl U, Roeder RG. p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. *Mol Cell Biol*. 2002;22(22):7812-9.
189. Robert-Moreno A, Espinosa L, de la Pompa JL, Bigas A. RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development*. 2005;132(5):1117-26.
190. Tanigaki K, Honjo T. Regulation of lymphocyte development by Notch signaling. *Nature Immunology*. 2007;8(5):451-6.
191. Thompson PK, Zúñiga-Pflücker JC. On becoming a T cell, a convergence of factors kick it up a Notch along the way. *Seminars in immunology*. 2011;23(5):350-9.
192. Bigas A, Martin DI, Milner LA. Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol*. 1998;18(4):2324-33.
193. Cheng P, Zhou J, Gabrilovich D. Regulation of dendritic cell differentiation and function by Notch and Wnt pathways. *Immunological Reviews*. 2010;234(1):105-19.
194. Schroeder T, Kohlhof H, Rieber N, Just U. Notch Signaling Induces Multilineage Myeloid Differentiation and Up-Regulates PU.1 Expression. *The Journal of Immunology*. 2003;170(11):5538-48.
195. Larsson C, Lardelli M, White I, Lendahl U. The Human NOTCH1, 2, and 3 Genes Are Located at Chromosome Positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in Regions of Neoplasia-Associated Translocation. *Genomics*. 1994;24(2):253-8.
196. Lin C, Zheng H, Wang C, Yang L, Chen S, Li B, et al. Mutations increased overexpression of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell International*. 2012;12(1):13.

197. Bhanushali AA, Babu S, Thangapandi VR, Pillai R, Chheda P, Das BR. Mutations in the HD and PEST Domain of Notch-1 Receptor in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Report of Novel Mutations From Indian Population. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2010;19(2):99-104.
198. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(10):3398-406.
199. Jundt F, Schwarzer R, Dorken B. Notch signaling in leukemias and lymphomas. *Curr Mol Med*. 2008;8(1):51-9.
200. Sliwa T, Awsa S, Vesely M, Rokitte D, Grossschmidt P, Jilch R, et al. Hyperexpression of NOTCH-1 is found in immature acute myeloid leukemia. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(3):882-9.
201. Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development*. 2007;134(7):1243-51.
202. Takebayashi K, Sasai Y, Sakai Y, Watanabe T, Nakanishi S, Kageyama R. Structure, chromosomal locus, and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-1. Negative autoregulation through the multiple N box elements. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(7):5150-6.
203. Fisher AL, Ohsako S, Caudy M. The WRPW motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Molecular and Cellular Biology*. 1996;16(6):2670-7.
204. Sang L, Roberts JM, Collier HA. Hijacking HES1: how tumors co-opt the anti-differentiation strategies of quiescent cells. *Trends Mol Med*. 2010;16(1):17-26.

205. Arce L, Pate K, Waterman M. Groucho binds two conserved regions of LEF-1 for HDAC-dependent repression. *BMC cancer*. 2009;9(1):159.
206. Nakazaki H, Reddy AC, Mania-Farnell BL, Shen Y-W, Ichi S, McCabe C, et al. Key basic helix–loop–helix transcription factor genes Hes1 and Ngn2 are regulated by Pax3 during mouse embryonic development. *Developmental Biology*. 2008;316(2):510-23.
207. Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R, Nakanishi S. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes & development*. 1992;6(12b):2620-34.
208. Nakahara FS-YMKYKNUTHKHKHYHHKJOSKMKTCS. Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2009;115(14):2872-81.
209. Espinosa L, Cathelin S, D'Altri T, Trimarchi T, Statnikov A, Guiu J, et al. The Notch/Hes1 Pathway Sustains NF- $\kappa$ B Activation through CYLD Repression in T Cell Leukemia. *Cancer Cell*.18(3):268-81.
210. Yu X, Alder JK, Chun JH, Friedman AD, Heimfeld S, Cheng L, et al. HES1 inhibits cycling of hematopoietic progenitor cells via DNA binding. *Stem Cells*. 2006;24(4):876-88.
211. Murata K, Hattori M, Hirai N, Shinozuka Y, Hirata H, Kageyama R, et al. Hes1 Directly Controls Cell Proliferation through the Transcriptional Repression of p27Kip1. *Molecular and Cellular Biology*. 2005;25(10):4262-71.
212. Sugimoto A, Yamamoto M, Suzuki M, Inoue T, Nakamura S, Motoda R, et al. Delta-4 Notch ligand promotes erythroid differentiation of human umbilical cord blood CD34+ cells. *Experimental Hematology*. 2006;34(4):424-32.



213. Henning K, Schroeder T, Schwanbeck R, Rieber N, Bresnick EH, Just U. mNotch1 signaling and erythropoietin cooperate in erythroid differentiation of multipotent progenitor cells and upregulate beta-globin. *Exp Hematol.* 2007;35(9):1321-32.
214. Okuhashi Y, Itoh MAI, Arai A, Nara N, Tohda S.  $\gamma$ -Secretase Inhibitors Induce Erythroid Differentiation in Erythroid Leukemia Cell Lines. *Anticancer Research.* 2010;30(10):4071-4.
215. Ishiko E, Matsumura I, Ezoe S, Gale K, Ishiko J, Satoh Y, et al. Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(6):4929-39.
216. Kumano KCSSKYTHNSTTTHYHH. Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood.* 2001;98(12):3283-9.
217. Munugalavadla V, Dore LC, Tan BL, Hong L, Vishnu M, Weiss MJ, et al. Repression of c-Kit and Its Downstream Substrates by GATA-1 Inhibits Cell Proliferation during Erythroid Maturation. *Molecular and Cellular Biology.* 2005;25(15):6747-59.
218. Rogers H, Wang L, Yu X, Alnaeli M, Cui K, Zhao K, et al. T-cell Acute Leukemia 1 (TAL1) Regulation of Erythropoietin Receptor and Association with Excessive Erythrocytosis. *Journal of Biological Chemistry.* 2012;287(44):36720-31.
219. Kastner P, Chan S. Role of Ikaros in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *World journal of biological chemistry.* 2011;2(6):108-14.
220. Jeannet RMJM-GAOAATGLLA-SJBLGSGJGTHTRFAJ. Oncogenic activation of the Notch1 gene by deletion of its promoter in Ikaros-deficient T-ALL. *Blood.* 2010;116(25):5443-54.

221. Dumortier A, Jeannet R, Kirstetter P, Kleinmann E, Sellars M, dos Santos NR, et al. Notch Activation Is an Early and Critical Event during T-Cell Leukemogenesis in Ikaros-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26(1):209-20.
222. Kathrein KL, Chari S, Winandy S. Ikaros Directly Represses the Notch Target Gene Hes1 in a Leukemia T Cell Line: IMPLICATIONS FOR CD4 REGULATION. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(16):10476-84.
223. Izon DJ, Punt JA, Pear WS. Deciphering the role of Notch signaling in lymphopoiesis. *Current opinion in immunology*. 2002;14(2):192-9.
224. Pulte D, Lopez RA, Baker ST, Ward M, Ritchie E, Richardson CA, et al. Ikaros increases normal apoptosis in adult erythroid cells. *American journal of hematology*. 2006;81(1):12-8.
225. Gómez-del Arco P, Kashiwagi M, Jackson AF, Naito T, Zhang J, Liu F, et al. Alternative Promoter Usage at the Notch1 Locus Supports Ligand-Independent Signaling in T Cell Development and Leukemogenesis. *Immunity*. 2010;33(5):685-98.
226. Geimer Le Lay AS, Oravec A, Mastio J, Jung C, Marchal P, Ebel C, et al. The tumor suppressor Ikaros shapes the repertoire of notch target genes in T cells. *Sci Signal*. 2014;7(317):ra28.
227. Heizmann B, Kastner P, Chan S. Ikaros is absolutely required for pre-B cell differentiation by attenuating IL-7 signals. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(13):2823-32.
228. Gerondakis S, Siebenlist U. Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(5):a000182.

229. Liu JJ, Hou SC, Shen CK. Erythroid gene suppression by NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(21):19534-40.
230. Pierce JW, Lenardo M, Baltimore D. Oligonucleotide that binds nuclear factor NF-kappa B acts as a lymphoid-specific and inducible enhancer element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(5):1482-6.
231. Tinsley KWHCLMAPJ-YKGYH-wKHRSJFLPJ-H. Ikaros is required to survive positive selection and to maintain clonal diversity during T-cell development in the thymus. *Blood*. 2013;122(14):2358-68.
232. Yashiro-Ohtani Y, He Y, Ohtani T, Jones ME, Shestova O, Xu L, et al. Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A. *Genes & development*. 2009;23(14):1665-76.
233. Herz H-M, Shilatifard A. The JARID2-PRC2 duality. *Genes & development*. 2010;24(9):857-61.
234. Akanuma T, Koshida S, Kawamura A, Kishimoto Y, Takada S. Paf1 complex homologues are required for Notch-regulated transcription during somite segmentation. *EMBO Rep*. 2007;8(9):858-63.
235. Bray S, Musisi H, Bienz M. Bre1 is required for Notch signaling and histone modification. *Dev Cell*. 2005;8(2):279-86.
236. Krogan NJ, Dover J, Wood A, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, et al. The Paf1 Complex Is Required for Histone H3 Methylation by COMPASS and Dot1p: Linking Transcriptional Elongation to Histone Methylation. *Molecular Cell*. 2003;11(3):721-9.
237. Nemoto N, Suzukawa K, Shimizu S, Shinagawa A, Takei N, Taki T, et al. Identification of a novel fusion gene MLL-MAML2 in secondary acute myelogenous

leukemia and myelodysplastic syndrome with inv(11)(q21q23). *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2007;46(9):813-9.

238. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.

239. Veloso A, Kirkconnell KS, Magnuson B, Biewen B, Paulsen MT, Wilson TE, et al. Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications. *Genome Research*. 2014;24(6):896-905.

240. Lee JS, Shukla A, Schneider J, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, et al. Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell*. 2007;131(6):1084-96.

241. Biswas D, Milne TA, Basrur V, Kim J, Elenitoba-Johnson KSJ, Allis CD, et al. Function of leukemogenic mixed lineage leukemia 1 (MLL) fusion proteins through distinct partner protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(38):15751-6.

242. Mohan M, Herz H-M, Takahashi Y-H, Lin C, Lai KC, Zhang Y, et al. Linking H3K79 trimethylation to Wnt signaling through a novel Dot1-containing complex (DotCom). *Genes & development*. 2010;24(6):574-89.

243. Bernt KM, Armstrong SA. A role for DOT1L in MLL-rearranged leukemias. *Epigenomics*. 2011;3(6):667-70.

244. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Groger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*. 2013;27(11):2165-76.

245. Bernt KM, Zhu N, Sinha AU, Vempati S, Faber J, Krivtsov AV, et al. MLL-rearranged leukemia is dependent on aberrant H3K79 methylation by DOT1L. *Cancer Cell*. 2011;20(1):66-78.
246. Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity*. 2002;17(6):749-56.
247. Yoshida T, Yao-Ming Ng S, Zuniga-Pflucker JC, Georgopoulos K. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nature Immunology*. 2006;7(4):382-91.
248. Hu M, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C, et al. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes & development*. 1997;11(6):774-85.
249. Miyamoto T, Iwasaki H, Reizis B, Ye M, Graf T, Weissman IL, et al. Myeloid or Lymphoid Promiscuity as a Critical Step in Hematopoietic Lineage Commitment. *Developmental Cell*. 2002;3(1):137-47.
250. Winandy S, Wu L, Wang J-H, Georgopoulos K. Pre-T Cell Receptor (Tcr) and Tcr-Controlled Checkpoints in T Cell Differentiation Are Set by Ikaros. *The Journal of experimental medicine*. 1999;190(8):1039-48.
251. Morgan BSLANAKITGEWPNSGK. Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *The EMBO Journal*. 1997;16(8):2004-13.
252. Hahm K, Cobb BS, McCarty AS, Brown KE, Klug CA, Lee R, et al. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes & development*. 1998;12(6):782-96.

253. Rieder Sadiye A, Shevach Ethan M. Eos, Goddess of Treg Cell Reprogramming. *Immunity*. 2013;38(5):849-50.

254. Schwickert TA, Tagoh H, Gultekin S, Dakic A, Axelsson E, Minnich M, et al. Stage-specific control of early B cell development by the transcription factor Ikaros. *Nat Immunol*. 2014;15(3):283-93.