

Université de Montréal

**Mécanisme de leucémogénèse
par les oncogènes SCL et LMO1**

par

Mathieu Tremblay

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Docteur
en biologie moléculaire

29 mai 2009

© Mathieu Tremblay, 2009

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Mécanisme de leucémogénèse par les oncogènes SCL et LMO1

présentée par :

Mathieu Tremblay

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Marc Therrien, Président-rapporteur

Trang Hoang, Directeur de recherche

Muriel Aubry, Membre du jury

Tarik Moroy, Examineur externe

Sylvie Mader, Représentant du doyen

Résumé

La leucémie lymphoïde représente 30% de tous les cancers chez l'enfant. *SCL* (« Stem cell leukemia ») et *LMO1/2* (« LIM only protein ») sont les oncogènes les plus fréquemment activés dans les leucémies aiguës des cellules T chez l'enfant (T-ALL). L'expression ectopique de ces deux oncoprotéines dans le thymus de souris transgéniques induit un blocage de la différenciation des cellules T suivie d'une leucémie agressive qui reproduit la maladie humaine. Afin de définir les voies génétiques qui collaborent avec ces oncogènes pour induire des leucémies T-ALL, nous avons utilisé plusieurs approches.

Par une approche de gène candidat, nous avons premièrement identifié le *pTalpa*, un gène crucial pour la différenciation des cellules T, comme cible directe des hétérodimères E2A-HEB dans les thymocytes immatures. De plus, nous avons montré que pendant la différenciation normale des thymocytes, *SCL* inhibe la fonction E2A et HEB et qu'un dosage entre les protéines E2A, HEB et *SCL* détermine l'expression du *pTalpa*.

Deuxièmement, par l'utilisation d'une approche globale et fonctionnelle, nous avons identifié de nouveaux gènes cibles des facteurs de transcription E2A et HEB et montré que *SCL* et *LMO1* affectent la différenciation thymocytaire au stade préleucémique en inhibant globalement l'activité transcriptionnelle des protéines E par un mécanisme dépendant de la liaison à l'ADN. De plus, nous avons découvert que les oncogènes *SCL* et *LMO1* sont soit incapables d'inhiber totalement l'activité suppresseur de tumeur des protéines E ou agissent par une voie d'induction de la leucémie différente de la perte de fonction des protéines E.

Troisièmement, nous avons trouvé que *Notch1*, un gène retrouvé activé dans la majorité des leucémies T-ALL chez l'enfant, opère dans la même voie génétique que le pré-TCR pour collaborer avec les oncogènes *SCL* et *LMO1* lors du processus de leucémogénèse. De plus, cette collaboration entre des facteurs de transcription oncogéniques et des voies de signalisation normales et importantes pour la détermination de la destinée cellulaire pourraient expliquer la transformation spécifique à un type cellulaire.

Quatrièmement, nous avons trouvé que les oncogènes *SCL* et *LMO1* sont des inducteurs de sénescence au stade préleucémique. De plus, la délétion du locus *INK4A/ARF*, un évènement retrouvé dans la majorité des leucémies pédiatriques T-ALL associées avec une activation de *SCL*, collabore avec les oncogènes *SCL* et *LMO1* dans l'induction de la

leucémie. Cette collaboration entre la perte de régulateurs de la sénescence suggère qu'un contournement de la réponse de sénescence pourrait être nécessaire à la transformation. Finalement, nous avons aussi montré que l'interaction directe entre les protéines SCL et LMO1 est critique pour l'induction de la leucémie. Ces études ont donc permis d'identifier des évènements collaborateurs, ainsi que des propriétés cellulaires affectées par les oncogènes associés avec la leucémie et de façon plus générale dans le développement du cancer.

Mots-clés : Leucémie, thymocytes, différenciation, sénescence, SCL, LMO1, E2A, HEB, NOTCH1, pré-TCR

Abstract

Lymphoid leukemia represents 30% of all cancers in children. *SCL* (Stem cell leukemia) and *LMO1/2* (LIM only protein) are the most frequently activated oncogenes in children T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). Ectopic expression of the *SCL* and *LMO1* oncogenes in the thymus of transgenic mice causes T cell differentiation arrest during the preleukemic stage followed by development of aggressive leukemia that reproduce human disease. We therefore took several approaches to decipher the genetic pathway collaborating with these oncogenes in T-ALL induction.

Using a candidate approach, we first identified the *pTalpha*, a gene crucial for T cell differentiation, as a direct target of E2A and HEB heterodimers in immature thymocytes. Moreover, we showed that during normal thymocyte differentiation, SCL inhibits E2A and HEB function and that a dosage between E2A, HEB and SCL normally determines *pTalpha* gene expression.

Second, using both global and functional approaches, we identified novel target genes of E2A and HEB transcription factors and showed that *SCL* and *LMO1* impairs thymocyte differentiation at the preleukemic stage by globally inhibiting E proteins transcriptional activity through a DNA binding mechanism. Moreover, we found that *SCL* and *LMO1* oncogenes are either not totally able to inhibit E protein tumor suppressor activity or act in a different leukemic inducing pathway than E protein loss of function.

Third, we found that *Notch1*, a gene found activated in almost all cases of pediatric T-ALL, operate in the same genetic pathway as the pre-TCR to collaborate with the *SCL* and *LMO1* oncogenes in leukemogenesis. Moreover, this collaboration between oncogenic transcription factors and normal signalling pathways important for cell fate determination might explain cell-type specific transformation.

Fourth, we found that the *SCL* and *LMO1* oncogenes are inducers of senescence at the preleukemic stage. Moreover, deletion of *INK4A/ARF*, an event found in almost all cases of *SCL* associated pediatric T-ALL, collaborate with *SCL* and *LMO1* oncogenes in

leukemogenesis. This collaboration with loss of senescence regulators suggests that a bypass of senescence response would be necessary for transformation.

Finally, we also showed that SCL and LMO1 direct interaction is critical for leukemia induction. These studies permitted the identification of collaborating events and cellular properties affected by oncogenes associated with leukemia and more generally in cancer development.

Keywords : Leukemia, thymocytes, differentiation, senescence, SCL, LMO1, E2A, HEB, NOTCH1, pre-TCR

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Liste des abréviations	xv
Remerciements	xviii
Avant-propos	xx
1 Introduction	1
1.1 Ontogénie du système hématopoïétique.....	1
1.1.1 Lignée lymphoïde :	2
1.1.1.1 Lymphopoïèse T (différenciation thymocytaire):.....	2
1.1.1.2 Voies de signalisation :	8
1.1.1.2.1 Le signal du pré-TCR:.....	8
1.1.1.2.2 Le récepteur des cellules T (TCR)	9
1.1.1.2.3 Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimé par les cellules présentatrices d'antigène.....	11
1.1.1.2.4 La voie de Notch	12
1.1.1.3 Les facteurs de transcription :	16
1.1.1.3.1 Les facteurs de transcription de la famille bHLH	17
1.1.1.3.1.1 La protéine E2A	19
1.1.1.3.1.1.1 E2A et l'hématopoïèse	20
1.1.1.3.1.2 La protéine HEB	23
1.1.1.3.1.3 La protéine E2-2.....	24
1.2 Cancer	24
1.2.1 Les propriétés des cellules cancéreuses	24
1.2.1.1 Intégrité génomique	26
1.2.1.2 Prolifération cellulaire.....	26
1.2.1.3 Survie et apoptose	27
1.2.1.4 Potentiel répliatif infini	28
1.2.1.4.1 Sénescence	28
1.2.1.5 Propriétés des cellules sénescents	30
1.2.2 Leucémie de type T-ALL :	32
1.2.3 Oncogènes	34
1.2.3.1 Mécanisme d'activation des oncogènes	34
1.2.3.2 Translocations dans les leucémies T-ALL	35
1.2.3.2.1 SCL	36

1.2.3.2.1.1	SCL et la leucémie	36
1.2.3.2.1.2	Rôle normal de SCL.....	38
1.2.3.2.2	Les autres facteurs bHLH.....	41
1.2.3.2.3	Les protéines de la famille LIM-only (LMO).....	42
1.2.3.2.3.1	Les protéines LMO et la leucémie	42
1.2.3.2.3.2	Rôle normal de LMO2	43
1.2.3.2.4	Les protéines ID	44
1.2.3.2.5	La voie de Notch1	45
1.2.3.2.6	Voie de signalisation du pré-TCR.....	46
1.2.4	Suppresseurs de tumeurs	47
1.2.4.1	Progression à travers le cycle cellulaire	48
1.2.4.1.1	Les régulateurs du cycle cellulaire.....	51
1.2.4.1.1.1	La famille CIP/KIP	51
1.2.4.1.1.2	La famille INK4	51
1.2.4.1.2	Les protéines E2F et les protéines RB	52
1.2.4.1.3	La voie de TRP53	52
1.2.4.2	Régulateur du cycle cellulaire (CDKI) et le cancer	54
1.2.4.2.1	La famille KIP/CIP et le cancer	54
1.2.4.2.2	Le locus INK4/ARF et le cancer.....	55
1.2.4.2.3	La famille TRP53 et le cancer.....	57
1.3	Objectifs de la thèse	58
2	Regulation of pT α gene expression by a dosage of E2A, HEB and SCL	61
2.1	Contribution des co-auteurs	62
2.2	Summary	63
2.3	Introduction.....	64
2.4	Experimental procedures.....	67
2.5	Results.....	72
2.5.1	E2A and HEB deficient mice express decreased level of pT α mRNA	72
2.5.2	E2A and HEB gene products bind the pT α enhancer <i>in vivo</i> in DN3 thymocytes	74
2.5.3	Functional importance of two E-box binding sites within the pT α enhancer 75	
2.5.4	E2A and HEB gene products, as well as SCL-containing complexes bind E-box elements of the pT α enhancer <i>in vitro</i>	77
2.5.5	SCL-containing complexes bind the pT α enhancer <i>in situ</i>	78
2.5.6	Relative levels of E2A, HEB and SCL determines pT α gene expression in immature thymocytes.....	79
2.6	Discussion	80

2.6.1	Importance of E2A-HEB in driving stage-specific activity of the pT α enhancer	80
2.6.2	SCL-E2A/HEB complexes occupy E-box elements within the pT α enhancer and promoter	83
2.7	Figure	86
2.8	Acknowledgments	102
2.9	Reference List	103
3	Identification of SCL and LMO1 oncogenes as transcriptional repressors of HEB/E2A in the thymus through functional genomic / genetic approaches	61
3.1	Contribution des co-auteurs	109
3.2	Abstract	110
3.3	Introduction	111
3.4	Experimental procedures	114
3.5	Results	117
3.5.1	Global decrease in gene expression in <i>SCL</i> ^{tg} <i>LMO1</i> ^{tg} thymocytes.	117
3.5.2	<i>SCL-LMO1</i> globally affect the expression of both positive and negative targets of E2A.	118
3.5.3	Association of HEB, E47 and SCL with promoters of known E47-upregulated target genes.	120
3.5.4	Identification of new E47, HEB as well as SCL targets by ChIP <i>in situ</i> .	120
3.5.5	Decreased <i>Heb</i> or <i>E2a</i> gene dosage does not affect thymocyte differentiation arrest caused by <i>SCL-LMO1</i> .	121
3.5.6	Decreased <i>Heb</i> or <i>E2a</i> gene dosage accelerates <i>SCL-LMO1</i> -dependent leukemia.	122
3.6	Discussion	124
3.6.1	Upregulation of <i>Lyl1</i> and <i>Hhex</i> gene expression by <i>SCL-LMO1</i>	124
3.6.2	The tumor suppressor function for E2A and HEB	125
3.7	Figure	127
3.8	Acknowledgments	141
3.9	References	142

4	Collaboration between the oncogenic transcription factors <i>SCL</i> and <i>LMO1</i> and signaling pathways in leukemogenesis: A role for <i>pre-TCR</i> signaling and <i>Notch1</i>	146
4.1	Contribution des co-auteurs	147
4.2	Summary	148
4.3	Introduction.....	149
4.4	Experimental procedures.....	152
4.5	Results.....	153
4.5.1	pre-TCR deficiency delays leukemia onset in <i>SCL^{tg}LMO1^{tg}</i> mice	153
4.5.2	MHC-mediated antigen presentation deficiency do not affect leukemia onset in <i>SCL^{tg}LMO1^{tg}</i> mice	155
4.5.3	Co-segregation between <i>Cd3</i> and <i>Notch1</i> mutations in <i>SCL</i> -dependent leukemogenesis.....	155
4.6	Discussion.....	157
4.6.1	The pre-TCR as a collaborating event in leukemogenesis.....	157
4.6.2	Target cell of transformation.....	158
4.7	Figure	160
4.8	Acknowledgments.....	170
4.9	References.....	171
5	Cellular senescence induced by <i>SCL</i> and <i>LMO1</i> oncogenes is a barrier to leukemogenesis	175
5.1	Contribution des co-auteurs	176
5.2	Abstract	177
5.3	Introduction.....	178
5.4	Experimental procedures.....	180
5.5	Results.....	184
5.5.1	The <i>SCL</i> and <i>LMO1</i> oncogenes repress a subset of TRP53, RB and E2F regulated genes in thymocytes.....	184
5.5.2	The gene expression pattern in preleukemic <i>SCL^{tg} LMO1^{tg}</i> thymocytes correlates with a senescence gene signature.	186

5.5.3	Preleukemic thymocytes overexpressing <i>SCL</i> and <i>LMO1</i> showed reduce proliferation.....	188
5.5.4	Increased expression of cell cycle inhibitors in <i>SCL-LMO1</i> expressing preleukemic thymocytes.....	189
5.5.5	<i>SCL</i> and <i>LMO1</i> induce senescence markers in preleukemic thymocytes.	189
5.5.6	Data mining of gene expression profiles in T-ALL reveals association of <i>INK4A/ARF</i> deletion with <i>SCL</i> + patients.....	190
5.5.7	Bypass of senescence accelerates <i>SCL-LMO1</i> -dependent leukemia.	191
5.6	Discussion.....	193
5.6.1	Senescence response to oncogenic activation.....	193
5.6.2	Necessity of senescence bypass for leukemogenesis.....	194
5.7	Figure legends.....	196
5.8	Acknowledgments.....	224
5.9	References.....	225
6	DISCUSSION.....	229
6.1	Différenciation thymocytaire.....	229
6.1.1	Les protéines E, des régulateurs transcriptionnels majeurs de la différenciation thymocytaire.....	229
6.1.2	Effet transcriptionnel de <i>SCL</i> et <i>LMO1</i> : Répression des gènes cibles des protéines E.....	231
6.1.3	Mécanisme moléculaire d'action de <i>SCL</i> sur l'activité transcriptionnelle de <i>E2A</i> et <i>HEB</i>	233
6.2	Collaboration génétique dans les leucémies de type T-ALL.....	236
6.2.1	Les protéines E, des suppresseurs de tumeurs.....	236
6.2.2	Interaction protéique entre <i>SCL</i> et <i>LMO1/2</i>	239
6.2.3	La signalisation du pré-TCR.....	240
6.2.4	Notch1.....	241
6.3	Réponse cellulaire des cellules préleucémiques à l'activation oncogénique.....	244
6.3.1	La sénescence, un mécanisme de protection contre les tumeurs.....	244
6.3.2	Effets transcriptionnels de <i>SCL</i> et <i>LMO1</i>	246
6.3.3	<i>PML</i> et la sénescence.....	248
6.3.4	La collaboration oncogénique et les groupes de complémentation.	250
7	Conclusion.....	252
	Annexe 1.....	I
	Annexe 2.....	VII

Liste des figures

Figure 1.1 La différenciation thymocytaire.	4
Figure 1.2 Couplage de la différenciation et de la migration des thymocytes à travers le thymus.	6
Figure 1.3 Voie de signalisation du pré-TCR et du TCR.	10
Figure 1.4 Activation de la signalisation de la voie de NOTCH.	14
Figure 1.5 Les facteurs de transcription importants pour la différenciation des thymocytes.	17
Figure 1.6 Structure des protéines HLH.	19
Figure 1.7. Propriétés des cellules cancéreuses	25
Figure 1.8 La limite de Hayflick associée avec la sénescence répliquative.	29
Figure 1.9 Inducteur de sénescence	30
Figure 1.10. Anomalies chromosomiques retrouvées dans les leucémies lymphoblastiques aiguës des cellules T (T-ALL).	36
Figure 1.11 Activité transcriptionnelle de SCL.	39
Figure 1.12 Mutations activatrices de NOTCH1 dans les leucémies T-ALL humaines.	46
Figure 1.13 Progression à travers le cycle cellulaire.	50
Figure 1.14 Le locus <i>Ink4a-Arf-Ink4b</i>	56
Figure 2.1. Perturbation of T cell development in E2A and HEB knockout mice.	86
Figure 2.2. Reduction of pT α expression in DN thymocytes of E2A and HEB knockout mice.	88
Figure 2.3. E2A and HEB specifically associate with the pT α enhancer and promoter in primary thymocyte.	90
Figure 2.4. The integrity of two E-boxes is critical for pT α enhancer activity.	92
Figure 2.5. Repression of pT α enhancer activity by SCL is mediated by the E2 and E3 sites.	94

Figure 2.6. E2A and HEB heterodimers and SCL-containing complexes preferentially bind E2 and E3 sequence <i>in vitro</i>	96
Figure 2.7. SCL, E2A and HEB specifically associate with the pT α enhancer and promoter <i>in situ</i>	98
Figure 2.8. SCL, E2A and HEB gene expressions determine pT α mRNA levels.....	100
Figure 3.1. <i>SCL</i> and <i>LMO1</i> overexpression in preleukemic thymocytes affects genes regulated by E47.	127
Figure 3.2. HEB, E47 and SCL occupy DNA of known E47-regulated genes.....	129
Figure 3.3. Identification of new target genes of HEB, E47 and SCL.....	131
Figure 3.4. Effect of <i>E2a</i> and <i>Heb</i> allele loss on <i>SCL-LMO1</i> preleukemic phenotype.	133
Figure 3.5. Genetic interaction between <i>Heb</i> , <i>E2a</i> and <i>SCL-LMO1</i> in leukemogenesis. ...	135
Figure 3.S1. Thymocyte population of in <i>Cd3ϵ^{-/-}</i> and <i>SCL^{tg}LMO1^{tg}Cd3ϵ^{-/-}</i>	137
Figure 3.S2. E proteins mRNA expression is not affected by SCL and LMO1 overexpression in the thymus.....	139
Figure 4.1. Tumor incidence is specifically delayed in the absence of pre-TCR signaling.	160
Figure 4.2. Oligoclonal origin of <i>SCL-LMO1</i> tumors.....	162
Figure 4.3 mRNA expression levels of <i>Notch1</i> target genes in <i>SCL-LMO1</i> T-ALL.....	166
Figure 4.S1. <i>Cd3ϵ</i> gene haploinsufficiency.	168
Figure 5.1. <i>SCL</i> and <i>LMO1</i> oncogenes repress of a subset of E2F1, RB1 and TRP53 target genes.....	196
Figure 5.2. The overexpression of <i>SCL</i> and <i>LMO1</i> is associated with a signature of cellular senescence.....	198
Figure 5.3. Decreased DNA replication and cell cycle initiation in the presence of <i>SCL</i> and <i>LMO1</i> in thymocytes.....	200
Figure 5.4. Senescence markers in <i>SCL^{tg}LMO1^{tg}</i> preleukemic thymocytes.	202
Figure 5.5. Correlation between <i>INK4A/ARF</i> locus status and prognostic T-ALL patient groups.....	204

Figure 5.6. Genetic interactions between <i>Trp53</i> , <i>Arf</i> or <i>Ink4A-Arf</i> and the <i>SCL</i> and <i>LMO1</i> oncogenes in leukemogenesis.	206
Figure 5.S1. Phenotype of preleukemic and leukemic <i>Cd3ε^{-/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}</i> thymi.	212
Figure 5.S2. <i>SCL</i> and <i>LMO1</i> overexpression in thymocytes affects specific pathway.....	214
Figure 5.S3. <i>SCL</i> and <i>LMO1</i> overexpression in thymocytes lead to a repression of genes associated with the cell cycle and increase in cell cycle inhibitors.....	216
Figure 5.S4. <i>SCL</i> and <i>LMO1</i> do not affect apoptosis in preleukemic thymus.	218
Figure 6.1 Groupes de complémentation dans les leucémies T-ALL.....	251
Figure A.1 L'activité répressive de SCL nécessite son domaine HLH et ne peut être contrée par le superactivateur SCL-VP16.....	I
Figure A.2 L'interaction protéique entre SCL et LMO1 est nécessaire à la leucémogénèse.	III
Figure A.3 La perte de fonction des gènes <i>Ink4a</i> et/ou <i>Arf</i> accélère la leucémie induite par <i>SCL</i> et <i>LMO1</i> en absence d'un pré-TCR fonctionnel.	V

Liste des tableaux

Table 4.1. Activating Notch1 mutations in <i>SCL-LMO1</i> T-ALL is dependent on <i>Cd3</i> gene status.....	164
Table 5.S1. List of genes regulated by E2F1, RB1, TRP53.....	208
Table 5.S2. The gene expression pattern in preleukemic <i>SCL^{tg} LMO1^{tg}</i> thymocytes correlates with a senescence gene signature.	210
Table 5.S3. Survival analysis of <i>SCL^{tg}LMO1^{tg}</i> mice in specified background.	220
Table 5.S4 The 39 cases grouped by predicted survival times.	222

Liste des abréviations

ADN	Acide déoxyribonucléique
APC	Cellules présentatrices d'antigène
B-ALL	Leucémie lymphoblastique aiguë des cellules B
BCR	Récepteur aux cellules B
bHLH	Hélice-boucle-hélice basique
CDK	Kinases dépendantes des cyclines
CDKI	Inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
DC	Cellules dendritiques thymiques
DL1	Delta-like 1
DL4	Delta-like 4
DN	Cellules double négative CD4-CD8-
DP	Cellules double positives CD4+CD8+
DSB	Bris d'ADN double brin
DSL	Ligand de Notch (« <i>Delta-Serrate-Lag2</i> »)
EB	Corps embryoïdes
EGF	Facteur de croissance epidermal (« <i>Epidermal growth factor</i> »)
ES	Cellules souches embryonnaires
ETP	Précurseurs précoces thymiques (« <i>Early thymic precursor</i> »)
HAT	Histone acétyl-transférase
HDAC	Histone déacétylase
HEB	Protéine HeLa liant les boîtes E (« <i>Hela Ebox binding protein</i> »)
HMT	Histones méthyltransférase
HSC	Cellules souches hématopoïétiques
ICN	Domaine intracellulaire de Notch
ID	Inhibiteur de la liaison à l'ADN
IFNg	Interféron γ

Ig	Immunoglobuline
ISP	Cellules immatures simples positives (CD4-CD8low)
ITAM	Motif d'activation d'immunorécepteur basé sur les tyrosines
LDB1	Protéines LIM domain-binding protein 1
LMPP	Progéniteurs lymphoïdes multipotents
LOH	perte d'hétérozygotie
MAML	Mastermind
MAPK	Protéine kinase activé par les mitogènes
NHEJ	Jonction des extrémités non homologues
NK	Cellules tueuses naturelles (« <i>Natural killer</i> »)
PEST	Domaine Proline-Acide glutamique-Sérine-Thréonine
pT α	Chaîne invariable α du pré-TCR
RB	Protéine du rétinoblastome
ROS	Espèces réactives oxygénées
SA- β Gal	β -galactosidase associée avec la sénescence
SAHF	Domaines d'hétérochromatine associée avec la sénescence
SCL	« <i>Stem cell leukemia</i> »
SP4	Cellules simple positive (CD4+)
SP8	Cellules simple positive (CD8+)
T-ALL	Leucémie lymphoblastique aiguë des cellules T
TCR	Récepteur aux cellules T
TCR α	Chaîne α du TCR
TCR β	Chaîne β du TCR
TCR δ	Chaîne δ du TCR
TCR γ	Chaîne γ du TCR
TEC	Cellules épithéliales thymiques
TNF	Facteur de nécrose tumorale

À ma famille,

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de laboratoire, Dr Trang Hoang, pour son dévouement et pour avoir su m'offrir un environnement et des défis qui m'ont permis de me dépasser. Je voudrais aussi remercier mes parents et ma famille pour leurs encouragements inconditionnels, leur compréhension, leur support et leurs conseils. Je tiens à remercier mon frère qui a toujours été là pour me rappeler qu'il ne faut pas trop se prendre au sérieux. À mon filleul, mon fan numéro un. Je voudrais aussi remercier Alexandre, Emilie, Chin Chin et Marie-Hélène qui ont toujours été là pour m'écouter et me changer les idées lors d'un souper, d'une fin de semaine au fond des bois ou pendant quelques semaines à l'autre bout du monde. Alex, merci pour ton écoute, ta patience et ton esprit scientifique, d'avoir été mon entraîneur personnel et mon partenaire inconditionnel dans nos différents projets et de me rappeler que presque tout est possible et que certaines fois, il faut juste essayer...

Je ne peux passer sous silence la contribution de tous les membres passés et présents du laboratoire pour leurs aides tant techniques qu'intellectuelles et qui m'ont tous appris quelque chose, chacun à leur façon. Et surtout merci de m'avoir supporté pendant toutes ces années et d'avoir égayé mes journées au laboratoire. Je tiens particulièrement à remercier Annie Perreault, Véronique Mercille et Véronique Litalien pour leur professionnalisme et leur passion pour le bien-être des souris. Je tiens à remercier toutes mes complices au cours des années, bien entendu pour leur esprit scientifique, mais surtout pour toutes nos discussions de tout et de rien : Virginie Sanguin Gendreau, Marianne Desrosiers, Julie Lambert, Deborah Ley et Geneviève Despars. Merci à tous ceux qui par leur attention, leur bonne humeur et leur enthousiasme contagieux réussissent toujours à me faire sourire (Marie Cargnello, Shanti Rojas-Sutterlin, Cédric Tremblay et Benoit Grondin). Je voudrais aussi remercier Ivan Topisirovic pour son aide et ses conseils toujours éclairés et colorés sur la science et la vie en général.

Je tiens à souligner l'apport des organismes subventionnaires ayant soutenues toutes ces longues années d'études : les Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ/FCAR), aux Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC), à la Fondation Cole, ainsi qu'à la faculté des études supérieures de l'Université de Montréal. Je voudrais finalement remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Avant-propos

La transformation cellulaire affecte toutes les fonctions cellulaires telles que la différenciation, la prolifération et la survie. Tous ces processus sont régulés à la base par des facteurs de transcription qui déterminent l'expression spatio-temporelle des différents gènes cellulaires. Leur expression aberrante vient modifier ces programmes génétiques causant la transformation cellulaire et le développement de cancer. Le dysfonctionnement ou l'expression aberrante de facteurs de transcription comme SCL et LMO1 cause des anomalies du système hématopoïétique telles que le développement de leucémies. L'étude de l'effet des facteurs de transcription oncogéniques activés dans les cellules leucémiques comme SCL et LMO1 permet d'aborder les mécanismes de transformation affectant les propriétés normales, ainsi que la spécificité cellulaire de transformation. De plus, l'étude des mécanismes d'action de ces oncogènes m'a permis d'identifier les voies ciblées, ainsi que de nouveaux événements collaborateurs importants à la transformation par ces oncogènes. Ces observations peuvent également s'appliquer à d'autres oncogènes et d'autres types de cancer. Mes recherches doctorales sur les mécanismes de développement de la leucémie s'inscrivent dans cette ligne de pensée.

1 Introduction

Avant d'exposer mes résultats, il importe d'introduire les concepts importants à la différenciation thymocytaire et à la transformation. Je débiterai donc par un survol du développement thymocytaire et de ces régulateurs clés. J'enchaînerai avec une présentation des différentes propriétés des cellules cancéreuses. Je passerai en revue les différents oncogènes associés avec le développement de la leucémie lymphoblastique aiguë des lymphocytes T, tels que les protéines SCL et LMO1/2 en présentant à la fois leur rôle dans la différenciation normale et au niveau de la leucémie. Cette section sera suivie de la présentation des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération.

1.1 Ontogénie du système hématopoïétique

L'hématopoïèse est le processus par lequel les cellules du sang sont produites tout au cours de la vie à partir de l'expansion et de la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (revue par (1)). Chez l'adulte, l'hématopoïèse a principalement lieu dans la moelle osseuse au niveau des sinusoides dans la cavité osseuse.

Ainsi les cellules de la moelle osseuse régénèrent le compartiment hématopoïétique au complet. Les cellules du sang sont composées de plusieurs types cellulaires qui possèdent une durée de vie variable allant de quelques jours à plusieurs années. Leur remplacement constant dépend ultimement d'une population rare de progéniteurs, les cellules souches hématopoïétiques (HSC) définies par leur capacité d'auto-renouvellement et leur potentiel de différenciation dans toutes les lignées hématopoïétiques (multipotence). L'auto-renouvellement permet le maintien du pool de cellules souches possiblement grâce à une division asymétrique. La multipotence est définie comme étant la capacité d'une cellule à donner naissance à une progéniture différenciée comprenant plusieurs types cellulaires. Les cellules souches sont majoritairement quiescentes, bien qu'elles entrent éventuellement en G1, et la régénération des cellules matures se fait par une prolifération extensive des précurseurs intermédiaires.

Les cellules hématopoïétiques comprennent des cellules des lignées myéloïde, érythroïde et lymphoïde ayant des fonctions très différentes, allant du transport de l'oxygène à la production des anticorps.

1.1.1 Lignée lymphoïde :

Le compartiment lymphoïde est composé de lymphocytes B et T. Les lymphocytes B sont nécessaires à la production des anticorps, alors que les lymphocytes T permettent d'éliminer les cellules infectées. Les lymphocytes B activés se différencient en cellules plasmiques qui sécrètent des anticorps. Les lymphocytes T se divisent en deux types : les cellules T cytotoxiques qui agissent en tuant les cellules infectées ou les cellules cancéreuses, alors que les cellules T « helper » sont nécessaires à l'activation des autres cellules immunitaires comme les cellules B et les macrophages. Ces cellules sont activées par des antigènes causant prolifération et différenciation. La population de lymphocytes T et B possède un répertoire de récepteurs ayant une haute diversité de sites de liaison aux antigènes. Chaque lymphocyte mature possède un récepteur antigénique unique permettant une réponse immunitaire spécifique. Les cellules B expriment des immunoglobulines membranaires appelées récepteur des cellules B (BCR) correspondant aux anticorps sécrétés par les cellules plasmiques. Quant aux cellules T, elles expriment un récepteur des cellules T (TCR) dont la fonction est de reconnaître les antigènes provenant de protéines du soi ou d'agents infectieux. Finalement, les cellules « *Natural Killer* » (NK) ne possèdent pas de récepteurs spécifiques aux antigènes et agissent en reconnaissant et en tuant les cellules anormales comme les cellules cancéreuses ou infectées par des virus.

1.1.1.1 Lymphopoïèse T (différenciation thymocytaire):

La différenciation des thymocytes immatures est déterminée par leur potentiel génétique et les signaux de leur microenvironnement provenant à la fois des interactions avec les cellules stromales et les autres thymocytes. Cette signalisation implique des molécules

d'adhésion, des cytokines, des chimiokines et des morphogènes. Au cours de la différenciation thymocytaire, les cellules migrent à travers différentes zones du thymus permettant ainsi l'action de nouveaux signaux microenvironnementaux.

Chez la souris adulte, les thymocytes complètent leur différenciation en 14 jours. Les cellules progénitrices des lymphocytes T qui entrent dans le thymus ne sont pas commises à la lignée T et possèdent aussi le potentiel de se différencier en cellules tueuses NK, en cellules dendritiques, en cellules de la lignée monocyttaire et macrophage, ainsi qu'en cellules B (2-4).

Les progéniteurs thymiques entrent dans le thymus initialement par la circulation sanguine à partir du foie fœtal au stade embryonnaire ou à partir de la moelle osseuse chez l'adulte. Les progéniteurs des cellules T entrent dans le thymus à la jonction cortico-médullaire et commencent un programme de différenciation lié à une migration hautement ordonnée à travers le stroma thymique (Revue par (5)). Les différentes populations de thymocytes sont ainsi retrouvées dans des régions spatialement restreintes et sont en contact étroit avec les cellules épithéliales thymiques (TEC) tout au long de leur différenciation. Elles peuvent être aussi définies par l'expression de différents marqueurs à leur surface cellulaire (Figure 1.1).

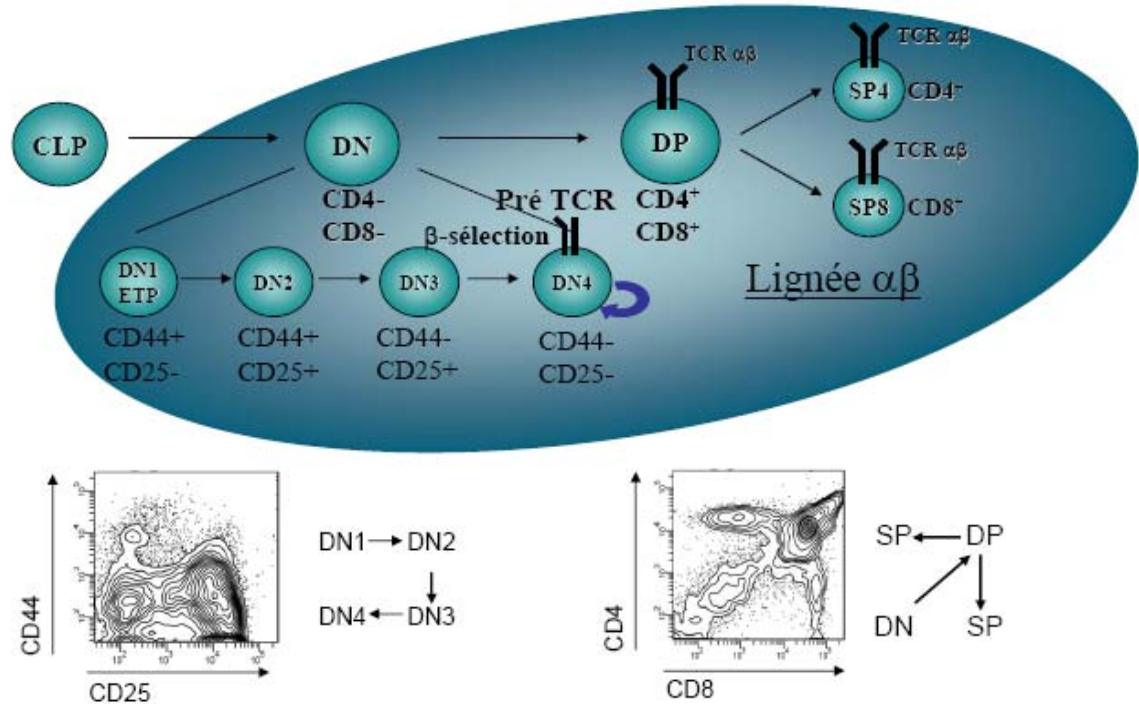


Figure 1.1 La différenciation thymocytaire.

Les stades de différenciation thymocytaire peuvent être définis selon l'expression des marqueurs de surface CD4 et CD8 et classés en cellules DN ($CD4^-CD8^-$), DP ($CD4^+CD8^+$), ISP8 ($CD4^+CD8^{lo}$), SP4 ($CD4^+CD8^-$) et SP8 ($CD4^-CD8^+$). Le stade de différenciation DN peut être sous-divisé selon l'expression des marqueurs CD44 et CD25. Les cellules ETP/DN1 ont un phénotype $CD25^-CD44^+$, les cellules DN2 sont $CD25^+CD44^+$, les cellules DN3 expriment CD25, mais perdent l'expression du CD44, alors que les cellules DN4 sont $CD25^-CD44^-$.

La jonction cortico-médullaire étant la porte d'entrée du thymus, elle contient des progéniteurs oligopotents correspondant aux cellules du stade ETP/DN1 (Figure 1.2). Les progéniteurs des cellules T qui entrent dans le thymus deviennent les précurseurs thymiques précoces (ETP) et sont considérés comme faisant partie de la population double négative (DN) puisqu'ils expriment peu ou pas du tout les marqueurs CD4 et CD8. Tout comme les ETP/DN1, les thymocytes du stade subséquent, les DN2, sont des cellules

hautement prolifératives qui présentent les premières caractéristiques thymocytaires, restreignant le potentiel de différenciation au lignage T et la perte de leur potentiel B et NK. Au stade DN3, les cellules arrêtent de proliférer et réarrangent les gènes codant pour les chaînes β , γ ou δ du récepteur des cellules T (TCR β , TCR γ ou TCR δ). Ainsi, ce n'est qu'à ce stade que les cellules sont engagées définitivement dans la lignée T, ayant complété le réarrangement du TCR. Le réarrangement productif d'une chaîne β du TCR et son association avec la chaîne invariable α du pré-TCR (pT α) sont nécessaires au passage de la sélection β (6). Les signaux émanant du complexe du pré-TCR induisent la survie, la prolifération, ainsi que la différenciation des cellules qui mûrissent au stade DN4 pour devenir des cellules immatures simples positives (ISP) qui expriment faiblement le CD8. Les cellules CD4⁻CD8⁻ (DN) en différenciation migrent à travers le cortex thymique vers la région subcapsulaire du cortex externe. Les cellules expriment alors le CD4 pour former la population double positive CD4⁺CD8⁺ (DP) qui constitue 75-88% des thymocytes. Les cellules DP réarrangent le gène du *Tcr α* permettant l'expression à la surface d'un hétérodimère TCR $\alpha\beta$. Les cellules DP retraversent le cortex et se différencient en cellules SP dans la médulla.

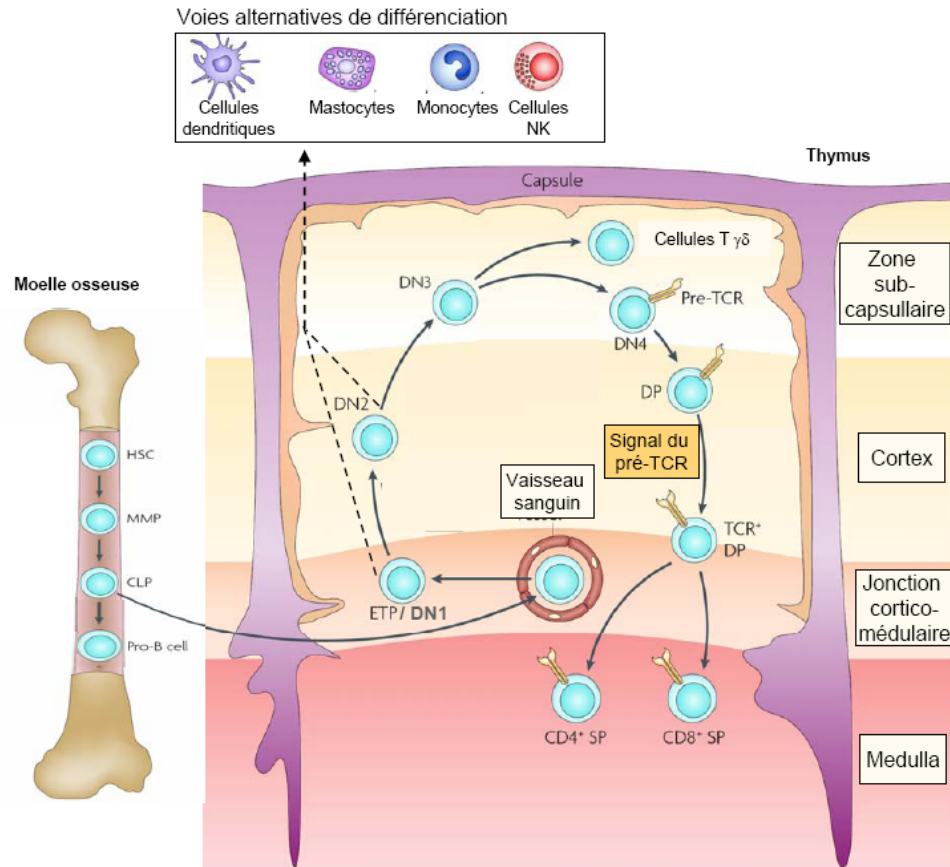


Figure 1.2 Couplage de la différenciation et de la migration des thymocytes à travers le thymus.

La différenciation des cellules souches hématopoïétiques (HSC) dans la moelle est à l'origine des progéniteurs de la lignée lymphoïde B et T (CLP). Les précurseurs immigrants de la moelle osseuse entrent initialement dans le thymus par la circulation sanguine au niveau de la jonction cortico-médullaire. Les thymocytes en différenciation migrent à travers les différentes sections du thymus. Les précurseurs précoces thymiques (ETP/DN1) migrent à travers le cortex thymique, se différenciant successivement en cellules DN2 et DN3. Au niveau du cortex externe ou de la région subcapsulaire, les cellules DN3 réarrangent le locus du TCR β et subissent la β -sélection pour devenir des cellules DN4 exprimant un pré-TCR fonctionnel. La différenciation au stade DP s'accompagne d'une migration à travers le cortex vers la médulla et d'une sélection positive ou négative médiée par les cellules présentatrices d'antigène. Les cellules deviennent alors des cellules T matures SP4 ou SP8 qui migreront en dehors du thymus. Les cellules n'étant commises à la lignée T qu'au stade DN3, les cellules du stade

ETP/DN1 ou DN2 peuvent aussi se différencier dans différentes lignées alternatives (cellules dendritiques, mastocytes, monocytes et cellules NK). Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology (5), copyright 2008.

Le complexe du TCR $\alpha\beta$ exprimé à la surface cellulaire de la population de cellules simples positives CD4⁺ ou CD8⁺ est ensuite testé pour une reconnaissance par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi (sélection positive). La sélection positive de ces cellules requiert les cellules épithéliales thymiques (TEC) corticales et se produit majoritairement au niveau du cortex. Les lymphocytes T SP4 ou SP8 sont aussi testés pour l'absence de réactivité contre les antigènes du soi (sélection négative). La sélection négative, quant à elle, se produit majoritairement dans la médulla et est médiée par les cellules dendritiques thymiques (DC) et les cellules TEC médullaires. Cette sélection entraîne la mort par apoptose de près de 95% des thymocytes en développement dû à une absence d'un réarrangement correct du *Tcrb* (7). Les thymocytes avec un TCR $\alpha\beta$ reconnaissent les molécules du CMH et sont réchappées d'une mort cellulaire programmée par des signaux de survie du TCR (sélection positive), tandis que les autres meurent par négligence. Les cellules T avec un TCR ayant une affinité trop forte pour le CMH endogène sont éliminées empêchant une auto-réactivité (délétion clonale). Pendant la sélection positive, les thymocytes DP passent au stade SP pour devenir soit des cellules CD4⁺ restreintes au CMH de classe II, soit des cellules CD8⁺ restreintes au CMH de classe I. Une fois sélectionnées, les cellules SP ayant complétées leur programme de différenciation et devenues immunocompétentes migrent vers les organes lymphoïdes périphériques. Les réactions immunitaires impliquant les lymphocytes T $\alpha\beta$ matures ont lieu au sein des organes lymphoïdes périphériques, grâce à l'interaction entre les antigènes et les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques ou les lymphocytes T CD4⁺ « helper ». Les cellules de la lignée $\alpha\beta$ font partie de la réponse immunitaire adaptative et sont majoritairement responsables de la protection contre l'infection associée aux antigènes spécifiques et présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Alternativement, les cellules ayant réarrangées les chaînes du TCR γ et δ au lieu des

chaînes du TCR β sont sélectionnées en tant que cellules T de la lignée γ/δ . Les cellules T $\gamma\delta$ ne sont pas restreintes au CMH et agissent en complémentant et en régulant l'activité des cellules T $\alpha\beta$ dans les différents tissus. Elles sont localisées sur les différentes muqueuses exposées à l'extérieur du corps et agissent comme première ligne de défense en reconnaissant les structures cellulaires intactes (revue par (8)).

L'arrivée de progéniteurs dans le thymus à partir de la moelle osseuse se fait de façon périodique et selon la disponibilité de la niche microenvironnementale thymique (9,10). Le thymus semble s'ouvrir seulement lorsque la majorité de la niche est vacante et est maximale près d'une fois par mois dans le thymus adulte (10). L'interaction entre le stroma thymique et les progéniteurs implique des molécules de signalisation comme des cytokines et des chimiokines, ainsi que des facteurs de transcription. Ce processus induit une combinaison de ligands et de facteurs de croissance qui dirigent la migration, la prolifération, l'engagement et la différenciation des progéniteurs précoces dans le thymus. De plus, la régulation de la différenciation tissulaire nécessite une interaction entre ces signaux extracellulaires et les facteurs de transcription.

1.1.1.2 Voies de signalisation :

Lors de la différenciation thymocytaire, différents signaux permettent la prolifération, la survie et la maturation des thymocytes. Certains signaux sont intrinsèques à la cellule et dépendent seulement de l'expression de leur composantes alors que d'autres nécessitent la liaison de ligands et dépendent de l'environnement.

1.1.1.2.1 Le signal du pré-TCR:

Le pré-TCR joue un rôle important dans la destinée des thymocytes en permettant leur survie, leur différenciation et leur maturation (Revue dans (11)). Ce complexe est composé d'une chaîne du TCR β réarrangée, de la chaîne α invariable (pT α) et des molécules de

signalisation du CD3 (Figure 1.3). La capacité de la chaîne α à s'oligomériser permet une signalisation indépendante de la liaison d'un ligand au récepteur. Suite à l'oligomérisation du récepteur, le motif de type ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) des molécules CD3 δ , γ , ϵ et ζ est phosphorylé par la kinase LCK. Ceux-ci recrutent ensuite les molécules FYN, SYK, ZAP70, SLP76 et LAT permettant la transduction du signal. Ainsi, l'association entre la chaîne α du pré-TCR (pT α) et la chaîne β du TCR (TCR β) dont le réarrangement est correct permet à elle seule l'activation du récepteur. Cette signalisation cellulaire autonome permet le suivi du progrès du réarrangement et de l'assemblage du récepteur aux cellules T. L'absence de signal de survie du pré-TCR cause leur mort par négligence, alors que son activation permet aux cellules de survivre et de passer la sélection β permettant leur maturation.

1.1.1.2.2 Le récepteur des cellules T (TCR)

Contrairement au pré-TCR qui agit en absence de ligand, l'hétérodimère formé des chaînes α et β ou encore γ et δ du TCR nécessite la liaison d'un ligand pour son activation. Le TCR est responsable de la reconnaissance spécifique des antigènes présentés à la surface d'une autre cellule en complexe avec les molécules du CMH. Les chaînes α et γ du TCR sont générées par une recombinaison VJ, tandis que les chaînes β et δ subissent une recombinaison VDJ (revue par (12)). Le TCR est constitué d'un hétérodimère de deux chaînes polypeptidiques réarrangées α et β ou γ et δ . Leur réarrangement assure la combinaison unique des segments VDJ et l'addition aléatoire de nucléotides ce qui permet la formation d'un répertoire énorme de TCR. Cette diversité génétique permet l'induction d'une réaction spécifique contre l'antigène reconnu.

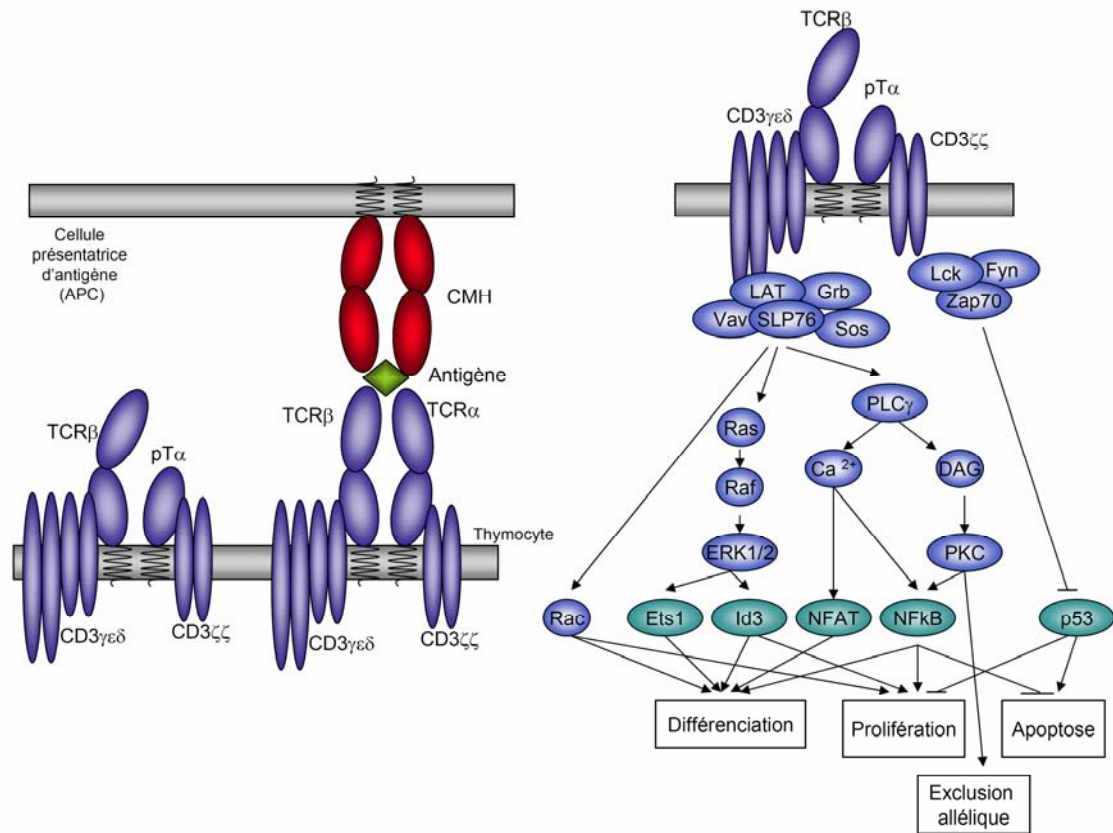


Figure 1.3 Voie de signalisation du pré-TCR et du TCR.

Le complexe du pré-TCR est composé d'une chaîne β réarrangée du TCR et du $pT\alpha$, alors que le complexe du TCR est composée de deux chaînes α et β réarrangées du TCR. Contrairement au pré-TCR dont la signalisation est indépendante de la liaison d'un ligand, le TCR nécessite une interaction avec les antigènes présentés par le complexe du CMH à la surface des cellules présentatrices d'antigène (APC). Ces deux complexes s'associent avec les molécules de signalisation du CD3 induisant le recrutement de protéines tyrosine kinase comme Lck, ZAP70, LAT et SLP76. Ce recrutement active une cascade de phosphorylation qui induit plusieurs facteurs de transcription important pour la maturation, la survie et la prolifération des thymocytes, en plus d'empêcher le réarrangement de la deuxième copie des locus du TCR (exclusion allélique). Adapté avec la permission de Elsevier, *Seminars in Immunology* (13), copyright 2002.

La signalisation par le TCR implique une cascade de phosphorylation similaire à celle du pré-TCR (Revue par (11)). La transduction des signaux du TCR requiert la phosphorylation des protéines CD3 γ , δ , ϵ , ζ et/ou η par les protéines tyrosine kinases LCK et FYN causant le recrutement de ZAP-70 qui phosphoryle les protéines adaptatrices LAT et SLP-76. Ceci entraîne le recrutement de protéines impliquées dans l'activation de la voie Ras, dans la mobilisation de calcium et dans la réorganisation du cytosquelette. Les diverses voies de signalisation induites par le TCR activent différents facteurs de transcription comme NFAT, TRP53, ETS1, NFKB ou encore les protéines de la famille ID connues pour inhiber les facteurs de transcription E2A et HEB (voir Figure 1.3).

1.1.1.2.3 Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimé par les cellules présentatrices d'antigène

La présentation des peptides est commune aux deux classes de molécules CMH de classe I et II, chacune présentant respectivement des peptides endogène et exogène. Celle-ci implique l'interaction du peptide contenu dans le site de présentation de l'antigène des molécules CMH et le site de reconnaissance de l'antigène du TCR (revue par (14)). De plus, cette liaison est renforcée par les molécules accessoires, CD8 ou CD4.

Les molécules de CMH de classe I présentent aux lymphocytes T CD8⁺ des peptides antigéniques issus de la protéolyse de protéines endogènes cellulaires ou virales synthétisées par la cellule présentatrice. Le complexe du CMH de classe I est formé d'une chaîne lourde α , de la microglobuline β_2 et d'un peptide. Suite à la dégradation des protéines par le protéasome, les antigènes peptidiques sont transportés dans le réticulum endoplasmique où ils s'associent avec le complexe composé de la chaîne lourde α et de la microglobuline β_2 néosynthétisée pour ensuite être transporté à la surface cellulaire. Les lymphocytes T CD8⁺ qui reconnaissent le complexe peptide/molécules CMH de classe I

vont induire la lyse de la cellule. Ceci entraîne l'activation, la prolifération et la différenciation des précurseurs cytotoxiques en cellules effectrices matures.

Les molécules de CMH de classe II présentent leur peptide aux lymphocytes T CD4⁺. Ce peptide est issu de la dégradation d'antigènes transmembranaires exogènes ou endogènes. Ces peptides peuvent être internalisés de façon non spécifique par endocytose ou après liaison à des récepteurs membranaires comme les immunoglobulines des lymphocytes B. Cette internalisation permet leur dégradation en peptides dans les lysosomes où les molécules de CMH de classe II néosynthétisées composées d'une chaîne α et β sont associées avec la chaîne invariable (peptide CLIP). Le peptide CLIP est alors dégradé et remplacé par le peptide antigénique permettant le transport de ce complexe à la membrane cellulaire.

Les cellules impliquées dans la reconnaissance des peptides présentés par les molécules de classe II sont les lymphocytes T CD4⁺ reconnaissant le complexe CMH de classe II associé à un peptide à la surface des cellules présentatrices d'antigène (APC). L'expression des molécules CMH de classe II est restreinte aux lymphocytes B, aux cellules dendritiques et phagocytaires de la lignée monocyte/macrophage. De plus, son expression peut être induite par l'interféron γ (IFN γ) et le facteur de nécrose tumorale (TNF) dans les cellules épithéliales et les lymphocytes T, permettant ainsi la prolifération de clones de cellules T CD4⁺ spécifiques à l'antigène. La stimulation par les molécules de classe II active les cellules présentatrices d'antigène (APC).

1.1.1.2.4 La voie de Notch

La famille du récepteur NOTCH est composée de 4 membres paralogues (NOTCH1-4) hautement conservés. Ces récepteurs transmembranaires sont composés de 2 chaînes polypeptidiques dérivées d'une même protéine qui est clivée lors de sa maturation. Leur

domaine extracellulaire consiste en un nombre variable de répétitions du motif EGF (Epidermal Growth Factor) qui médie l'interaction avec les ligands de la famille DSL (Delta-Serrate-Lag2). Chez les mammifères, il existe 5 ligands (JAG1-2, DLL1-3-4) qui sont exprimés à la surface des cellules voisines. En absence de ligand, le domaine riche en cystéine empêche le clivage et l'activation de la protéine NOTCH (Figure 1.4). La liaison du ligand entraîne un changement de conformation exposant le site de clivage ciblé par une métalloprotéinase, permettant le clivage du domaine transmembranaire par la γ -sécrétase libérant le domaine intracellulaire (ICN) de la membrane plasmique (15,16). Ce domaine agit en tant que facteur de transcription et est responsable de la majorité de la signalisation par NOTCH en régulant l'expression de plusieurs gènes cibles. Le domaine ICN est lui-même composé de plusieurs domaines dirigeant soit des interactions protéiques ou une régulation de son activité transcriptionnelle. Après translocation au noyau, le domaine ICN s'associe d'une part avec la protéine RBP-J (CSL) (17), ce qui déplace les corépresseurs comme MINT et NRARP (18-20) et les complexes histone déacétylase (HDAC), et d'autre part recrute certains coactivateurs comme Mastermind (MAML) et des complexes histone acétyl-transférase (HAT) stimulant la transcription de gènes cibles de NOTCH (21). De plus, la présence d'un domaine PEST contenu dans la portion C-terminale médie la dégradation de la protéine NOTCH par le protéasome. Après phosphorylation par le complexe CDK8-CYCLINE C, ce domaine recrute la protéine à boîte F (FBW7), causant l'ubiquitination et la dégradation de NOTCH par le protéasome.

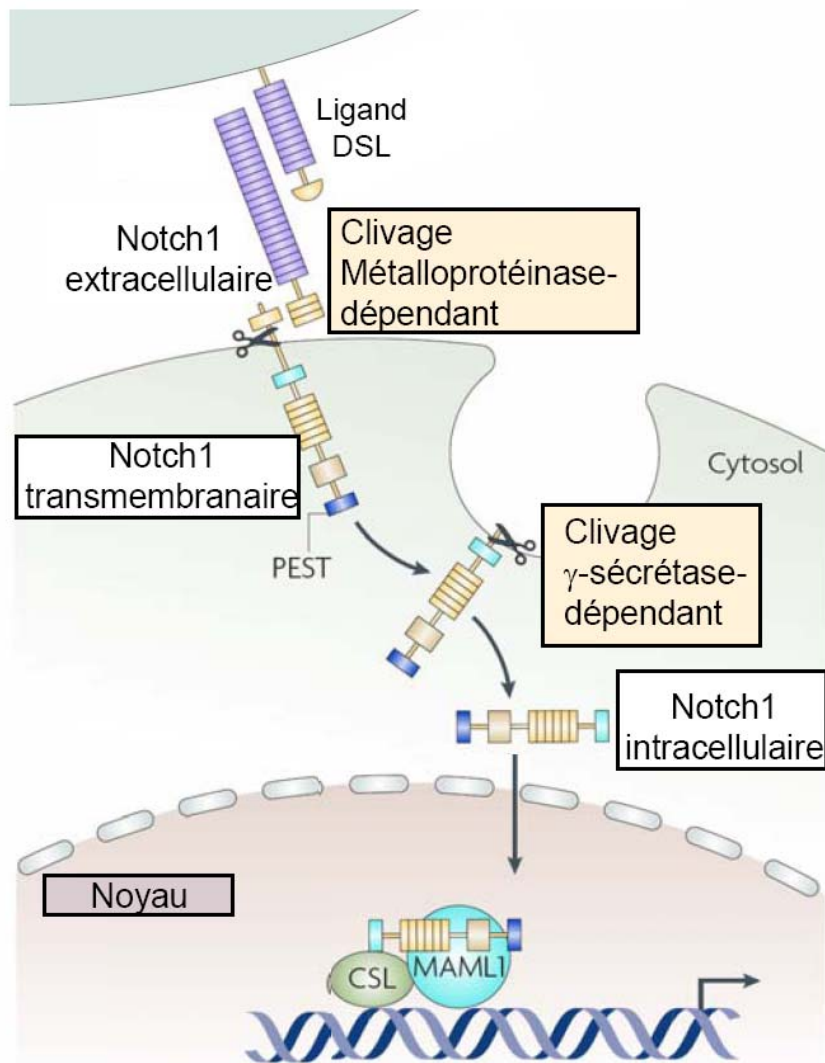


Figure 1.4 Activation de la signalisation de la voie de NOTCH.

L'interaction du domaine extracellulaire de NOTCH avec les protéines de la famille DSL cause le clivage protéolytique du récepteur NOTCH par une métalloprotéinase et une γ -sécrétase. Ceci entraîne le relâchement du domaine intracellulaire de NOTCH (ICN) qui est transloqué au noyau et interagit avec la protéine CSL. Ceci converti CSL en activateur par le déplacement de corépresseurs et le recrutement de coactivateurs comme MAML causant l'activation de la transcription. Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology (5), copyright 2008.

La délétion spécifique de *Notch1* ou *Rbp-J/Csl* bloque le développement des cellules T $\alpha\beta$ au stade DN3 (22,23) et la différenciation ectopique des cellules B immatures dans le thymus (24-26). De plus, la surexpression d'une protéine NOTCH1 constitutivement active (ICN1) dans la moelle osseuse inhibe la différenciation des cellules B et favorise le développement ectopique de cellules T immatures dans la moelle osseuse (27). Ces expériences de perte de fonction et de surexpression montrent que la signalisation par NOTCH détermine le choix de lignée. Dans le thymus, les cellules de l'épithélium thymique (TEC) expriment DLL1 (Delta-like 1) et DLL4 (Delta-like 4) (28,29). Bien que l'expression ectopique de Delta-like1 dans des lignées de cellules stromales de moelle osseuse (S17, OP9) permet de générer des thymocytes immatures *in vitro* à partir de progéniteurs hématopoïétiques (30,31), seule l'expression de DLL4 et non DLL1 sur l'épithélium thymique *in vivo* est essentielle à la signalisation de NOTCH dans les cellules pré-T (32,33). Bien que les cellules embryonnaires souches (ES) *Dll1*^{-/-} et *Dll4*^{-/-} produisent un épithélium thymique, seul le thymus chimérique provenant de cellules *Dll1*^{-/-} permet le développement des cellules T (34). Il semble que seule la signalisation de la voie de NOTCH par le ligand DLL4 soit requise pour la différenciation des cellules pro-T en cellules T matures, en empêchant la divergence vers les lignées lymphoïdes (34). La haute densité de ligands de NOTCH de type DELTA à certains sites spécifiques distinguent le thymus du microenvironnement de la moelle osseuse (35,36).

Contrairement aux progéniteurs $\alpha\beta$ qui sont hautement dépendants de la voie de signalisation de NOTCH, les progéniteurs de la lignée $\gamma\delta$ deviennent indépendants à cette voie au cours de leur différenciation. L'interaction entre NOTCH et DELTA dans les progéniteurs entraîne une expression soutenue de NOTCH1 et l'induction de NOTCH3. Ceci inhibe d'autres voies de différenciation alternatives, bloquant l'accès aux lignées myéloïde et dendritique. De plus, le récepteur NOTCH coopère avec le pré-TCR et inhibe l'activité transcriptionnelle du facteur E2A, ce qui permet aux cellules DN4 de proliférer

(37-39). NOTCH semble favoriser la transition DN3-DN4 en induisant la transcription du gène du TCR β non réarrangé et en assurant la survie des cellules DN3 (23).

1.1.1.3 Les facteurs de transcription :

Peu de progéniteurs des cellules T migrent dans le thymus quotidiennement. Toutefois, ceux qui y arrivent répondent à ce nouvel environnement par une prolifération accrue, l'enclenchement de programmes transcriptionnels spécifiques à la différenciation thymocytaire et la répression graduelle de l'expression de gènes spécifiques aux autres lignées. Plusieurs facteurs de transcription influencent la différenciation thymocytaire selon leur dose et le stade de différenciation où ils agissent. La différenciation thymocytaire dépend d'une combinaison de facteurs et non pas d'un seul régulateur « maître ». Cette combinaison transcriptionnelle spécifique limite le choix de lignée par la répression active de voies alternatives et la promotion de l'expression de gènes requis pour la progression lymphocytaires T.

Parmi les facteurs de transcription importants pour la spécification de la lignée T, certains comme PU.1, SCL, GATA2 et C/EBP α n'ont pas de rôle soutenu dans la différenciation thymocytaire, mais semblent nécessaires aux progéniteurs pré-thymiques (Figure 1.5). Ils pourraient ainsi agir au niveau de l'oligopotence des progéniteurs, leur expression devant être réprimée pour une différenciation de lignée T. Par contre, d'autres facteurs tels que GATA3, MYB, RUNX1, E2A, HEB, GFI1 et IKAROS sont déjà exprimés dans les progéniteurs ETP et augmentent avec la différenciation jusqu'au stade DN3 (Revue par (40)). En somme, au fur et à mesure que les facteurs non spécifiques aux cellules T sont réprimés, le programme d'expression génique spécifique aux cellules T est activé.

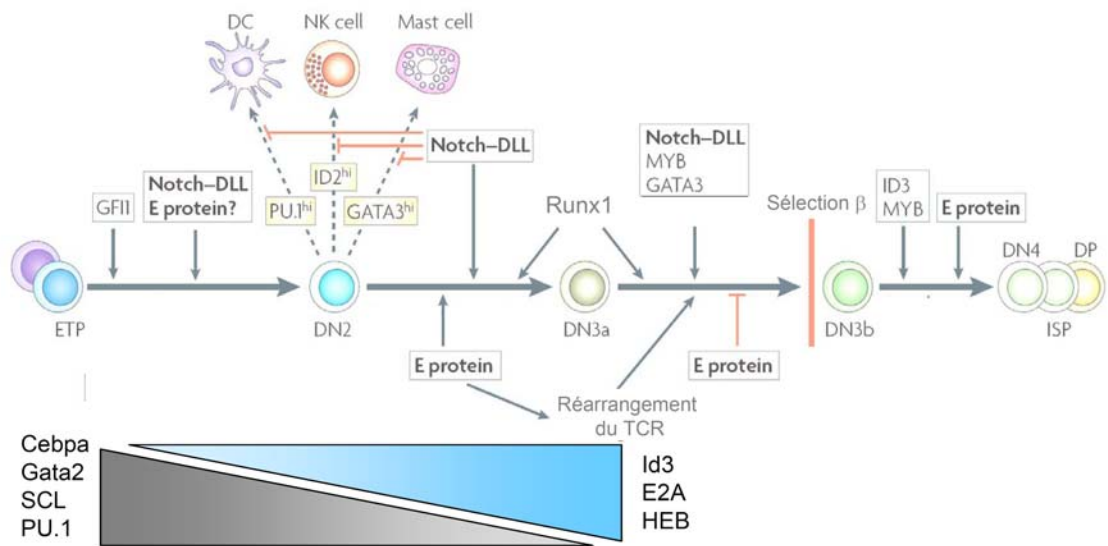


Figure 1.5 Les facteurs de transcription importants pour la différenciation des thymocytes.

La différenciation thymocytaire est régulée par différents facteurs de transcription. Certains comme PU.1, SCL, GATA2 et C/EBP α possèdent un rôle seulement au niveau des progéniteurs précoces (ETP/DN1) et possiblement en permettant le développement de voies de différenciation alternative et en conférant une propriété d'oligopotence à ces cellules. D'autres facteurs agissent au niveau de spécification de la différenciation thymocytaire. La voie de signalisation de Notch1 et les protéines E (E2A et HEB) sont importantes à plusieurs stades de la différenciation, alors que les facteurs MYB, RUNX1 et GATA3 agissent au niveau des progéniteurs précoces (ETP/DN1) et des cellules DN3. Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology, (40) copyright 2008.

1.1.1.3.1 Les facteurs de transcription de la famille bHLH

La différenciation des lymphocytes T dans le thymus est régulée par différents facteurs de transcription dont ceux de la famille hélice-boucle-hélice (HLH). La structure HLH consiste en deux hélices α amphipatiques séparées par une boucle flexible qui fonctionne comme domaine de dimérisation avec d'autres protéines (Figure 1.6). Certains membres de

cette famille possèdent aussi un domaine basique adjacent qui confère une capacité de liaison à l'ADN.

Les protéines de la famille HLH sont classées en différentes catégories selon leur profil d'expression et leur capacité à se dimériser et à lier l'ADN (41). Les protéines E ou bHLH de classe I sont exprimées ubiquitairement et lient l'ADN en tant qu'homodimère ou hétérodimère avec les protéines de classe II. Les membres de la classe I comprennent les protéines E12 et E47 (produits du gène E2A), HEB (HeLa liant les boîtes E) et E2-2. Les protéines bHLH de classe II sont exprimées de manière tissu-spécifique et lient l'ADN seulement en hétérodimère avec les protéines E. Les facteurs de transcription SCL (« *stem cell leukemia* »), MYOD, LYL1, TAL2 et BHLHB1 font partie de cette classe. Les protéines de classe III présentent un motif leucine-zipper adjacent au bHLH et comprennent entre autre les protéines MYC, TFE3 et SREBP-1 (42,43). La famille de protéines bHLH de classe IV comprend les protéines MAD, MAX et MXI qui agissent par hétérodimérisation entre elles ou avec MYC (43-46). Les protéines Id ou de classe V sont des régulateurs négatifs des protéines bHLH de classe I ou II. Elles ne contiennent qu'un domaine HLH, mais ne contiennent pas de domaine de liaison à l'ADN. Elles agissent donc comme dominant négatif en formant des complexes non fonctionnels avec les protéines de classe I et II (47-49).

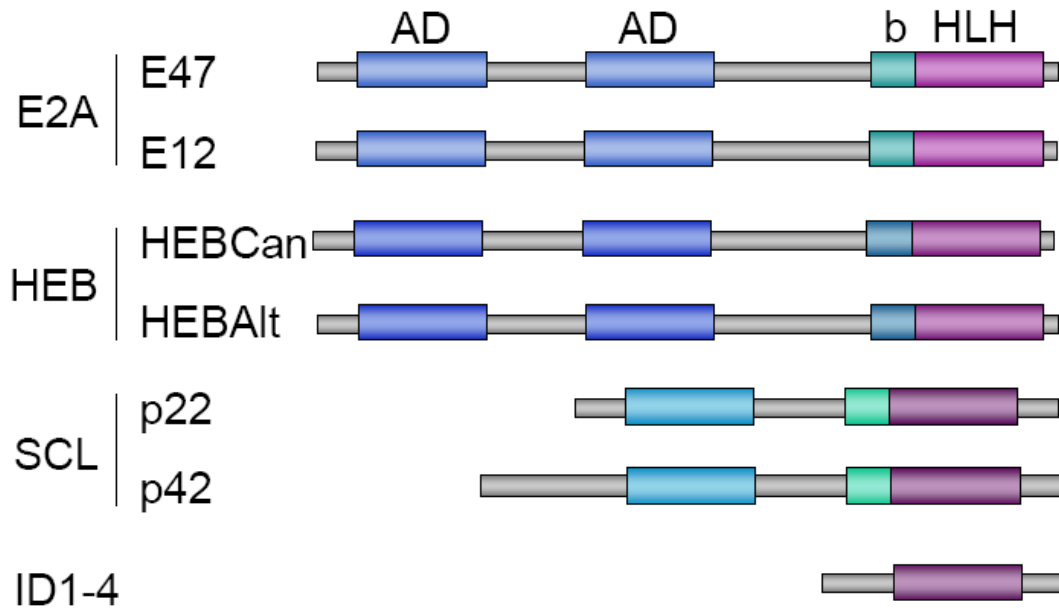


Figure 1.6 Structure des protéines HLH.

Représentation schématique des différents isoformes des gènes E2A, HEB et SCL et des protéines ID. Le domaine basique (b) des facteurs hélice-boucle-hélice basique (bHLH) permet la liaison à l'ADN, tandis que le domaine HLH favorise leur homo/hétérodimérisation. Les domaines d'activation de la transcription (AD) sont impliqués dans le recrutement de coactivateurs et de la machinerie transcriptionnelle. Figure adaptée de (50), copyright 2008 American Society of Clinical Oncology.

1.1.1.3.1.1 La protéine E2A

La protéine E2A joue un rôle crucial dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation et la destinée de différents types cellulaires dont les thymocytes. Cette protéine a été identifiée par son habileté à lier des sites de type boîtes E retrouvés dans les enhancers des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines en tant qu'homodimère (51). Les protéines E comme E2A lient l'ADN à une séquence consensus (CANNTG) appelée boîte E (51). Les isoformes E12 et E47 du gène *E2a* (*Tcf2a*) sont produits à partir d'un épissage alternatif de l'exon codant pour le domaine bHLH (52). Ces deux isoformes contiennent les domaines de dimérisation et de liaison à l'ADN qui se trouvent dans la

portion C-terminale de la protéine, ainsi que les domaines d'activation qui se trouvent dans la région N-terminale (53,54). Les protéines E, dont E2A, sont généralement considérées comme des activateurs de la transcription. Cette fonction dépend de l'interaction de leur domaine AD1 avec les complexes SAGA (55) et P300/PCAF, des acétylateurs d'histones associés à l'activation génique (56,57). Toutefois, les protéines E possèdent aussi une fonction répressive dépendante du domaine AD1 (58). Les mécanismes régissant cette répression n'ont pas été totalement élucidés, mais pourraient être expliqués par le recrutement des protéines ETO ou ETO2, bloquant ainsi l'interaction du domaine AD1 avec P300/CBP et augmentant l'association de complexes contenant les protéines HDAC (59-61).

Bien que le gène *E2a* soit exprimé de façon ubiquitaire, son niveau d'expression transcriptionnel est régulé différemment en fonction des tissus. Le promoteur de *E2a* contient des sites potentiels pour les facteurs de transcription tels que GATA1/2, SP1, CREB, AP2 et E2F (62). E2A est aussi régulée au niveau de sa stabilité protéique (63). Par exemple, la signalisation de NOTCH inhibe l'activité de E2A en induisant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (64). Le signal du pré-TCR et du TCR via l'activation de la voie MAPK cause aussi l'induction des protéines ID qui s'hétérodimérise avec les protéines E et inhibent leur activité (65). De plus, la dimérisation de E2A avec des facteurs bHLH de classe II tel que SCL régule sa capacité de liaison à l'ADN. La balance entre le niveau d'expression protéique et celui de ses partenaires de dimérisation contrôle l'activité transcriptionnelle de E2A.

1.1.1.3.1.1.1 E2A et l'hématopoïèse

La létalité périnatale des souris déficientes en E2A, HEB ou E2-2 démontre l'importance des protéines E dans différents processus développementaux (66-68). Ces protéines ont aussi un rôle majeur dans le développement des cellules sanguines. *E2a* est exprimé à différents stades de différenciation de l'hématopoïèse, mais plus particulièrement dans les

cellules souches, la lignée lymphoïde et la lignée érythroïde. La protéine E2A possède un rôle fondamental dans le développement des progéniteurs lymphoïdes multipotents (LMPP) à partir des HSC (69). La perte de *E2a* cause une diminution du nombre de LMPP et de l'expression de gènes lymphoïdes dans ceux-ci. De plus, l'absence ou la diminution de E2A dans les HSC et les LMPP augmente leur prolifération (69) (Lacombe 2009, soumis). Cette augmentation de la prolifération des HSC est associée avec une diminution de leur potentiel d'auto-renouvellement. Ainsi, E2A semblent maintenir les HSC en quiescence en inhibant leur prolifération.

Les protéines E sont essentielles à la différenciation des lymphocytes B et T (66,70,71). Contrairement aux autres tissus où les protéines E fonctionnent en tant qu'hétérodimère avec les protéines de classe II, les protéines E lient l'ADN en tant qu'homodimère ou hétérodimère dans la lignée lymphoïde. E2A est essentiel à différentes étapes du développement des lymphocytes B. Bien que les cellules dérivées de la moelle osseuse de souris *E2a*^{-/-} soient toujours pluripotentes et capables de se différencier *in vitro* ou *in vivo* dans les lignées NK, myéloïde et T, elles sont incapables de se différencier en cellules de la lignée B (72). De plus, le gène *E2a* est critique au réarrangement des immunoglobulines et de la lymphopoïèse normale. Les souris knockout pour *E2a* présentent un arrêt de la différenciation des cellules B entre le stade pré-B et pro-B, en plus d'interrompre le réarrangement des gènes d'immunoglobulines (66,73). La surexpression de *E2A* dans les cellules T chez la souris induit un réarrangement ectopique des gènes d'immunoglobuline (73). E2A possède un rôle crucial dans la régulation de la recombinaison des gènes des immunoglobulines *IgL*, plus particulièrement ceux encodant les chaînes légères κ . E2A lie directement les boîtes E dans les enhancers en 3' et intronique du locus *Kappa* activant la transcription et la recombinaison VJ des gènes *Kappa* dans des cellules non lymphoïdes (74). Bien que E2A lie l'ADN en tant qu'homodimère dans les cellules B, les autres membres de la famille des protéines E, E2-2 et HEB contribuent aussi au développement des cellules B. Les souris déficientes en *E2-2* ou *Heb* ou encore les souris

transhétérozygotes *E2a/Heb*, *E2a/E2-2* ou *Heb/E2-2* montrent une diminution drastique du nombre de cellules pro-B au niveau du foie fœtal (68). De plus, *HEB* peut fonctionnellement compenser la perte de *E2a* et restaurer le développement des cellules B (75). Cette compensation fonctionnelle entre les protéines E pourrait expliquer le phénotype partiel observé dans les cellules T des souris *E2a^{-/-}*.

Contrairement aux cellules B qui requièrent majoritairement des homodimères de E2A, le développement des cellules T utilisent majoritairement des hétérodimères des protéines E2A et HEB (76,77). Ceux-ci lient l'ADN et induisent des gènes importants pour la différenciation thymocytaire. Les souris déficientes en E2A présentent un arrêt partiel de la différenciation thymocytaire au stade DN, une diminution du nombre de cellules DN et DP et une augmentation du nombre de cellules SP (70). Ce défaut de différenciation résulte d'une diminution de la survie des cellules et d'une augmentation de la sélection positive (78). *E2a* et *Heb* possèdent un effet de dose dans le développement des cellules T, dont l'engagement dans la lignée T, la recombinaison VDJ des loci du *Tcr* et la maturation thymocytaire (67,77-79). Tout comme pour les immunoglobulines, les protéines E2A sont importantes au réarrangement des gènes du *Tcr*. La surexpression de *E2A* ou *HEB* entraîne un réarrangement des gènes du *Tcr* dans des cellules B et non-lymphoïdes (80,81).

De plus, le signal du pré-TCR engendre l'induction des protéines ID2 et ID3 responsables de l'inhibition de l'activité des protéines E (65,79). Cette rétroaction négative est donc importante pour l'exclusion allélique de la deuxième copie du TCR (82). En absence de pré-TCR comme dans les souris *Rag1^{-/-}*, les cellules DN3 *E2a^{-/-}* sont capables de passer la sélection β et de devenir des thymocytes DP (65). La délétion de *E2a* et *Heb* augmente la prolifération des cellules au stade DN3, et par conséquent E2A et HEB semblent jouer un rôle important dans l'arrêt de la prolifération avant l'expression d'un pré-TCR fonctionnel (83,84). De plus, la délétion simultanée de *E2a* et *Heb* au stade DP cause un passage au stade SP qui est indépendant de la sélection positive régulée par le TCR. Comme le signal

du TCR inhibe aussi l'activité des protéines E, cette rétroaction négative maintiendrait les cellules au stade DP jusqu'à la production d'un TCR $\alpha\beta$ fonctionnel (85). E2A est aussi impliqué dans le développement des thymocytes de la lignée γ/δ puisque les souris déficientes en *E2a* montrent une diminution des thymocytes γ/δ (86).

1.1.1.3.1.2 La protéine HEB

Tout comme E2A, la protéine HEB est importante lors de la différenciation thymocytaire. HEB forme des hétérodimères avec les protéines E, les protéines bHLH de classes II comme SCL et les protéines ID (87). Les souris *Heb*^{-/-} présentent un blocage du développement des cellules B, tandis que le développement des cellules T est partiellement défectif (68). Ces souris présentent une réduction du nombre de cellules pro-B au stade embryonnaire sans que l'établissement de la lignée B soit affecté. Les souris *Heb*^{-/-} montrent une augmentation du pourcentage de thymocytes CD4⁻CD8^{lo} (ISP) et une diminution du pourcentage de cellules DP (67). L'absence de *Heb* ou la surexpression de *SCL* et *LMO1* dans la lignée T chez la souris entraîne une diminution du nombre de thymocytes, en plus d'un arrêt de la différenciation thymocytaire à la transition DN/DP (67,68,88).

Le gène *Heb/Tcf12* est exprimé de façon ubiquitaire dans plusieurs tissus dont le thymus, les muscles squelettiques, le système hématopoïétique, ainsi que dans le système nerveux central (89). Le promoteur de *Heb* est régulé négativement par la protéine à doigt de zinc ZNF652 et la protéine ETO2 (90). Le gène *Heb/Tcf12* possède deux sites d'initiation alternatifs de la transcription codant pour deux isoformes : HEBcan et HEBalt. HEBcan contient deux domaines d'activation, alors que HEBalt n'en contient qu'un seul (91). HEBalt est exprimé majoritairement dans les thymocytes du stade DN et nécessite l'action combinée de HEBcan et de la signalisation NOTCH *in vitro* (91). L'expression ectopique de HEBalt corrige la lymphopoïèse des cellules T dans le foie foetal de *Heb*^{-/-} *in vitro*,

alors que HEBcan en est incapable. La signalisation NOTCH induit l'expression de HEBAIt, augmentant ainsi l'activité des protéines E et, conséquemment, le développement des cellules T.

1.1.1.3.1.3 La protéine E2-2

Le gène *E2-2/Tcf4* code pour trois isoformes selon un épissage alternatif de l'ARNm. Tout comme les autres protéines E, *E2-2* est exprimé de façon ubiquitaire dans plusieurs tissus, dont le cerveau, le cœur, le placenta, les muscles squelettiques et les poumons (92). *E2-2* est impliqué à la fois dans le développement des cellules B et T (93) puisque malgré une létalité embryonnaire, les souris *E2-2*^{-/-} présentent un blocage partiel au niveau des cellules DN3 (93,94) et une réduction du nombre de cellules pro-B au stade embryonnaire (67,68).

La différenciation cellulaire est donc contrôlée de façon précise par des voies de signalisation, ainsi que des facteurs de transcription. L'importance de ces régulateurs est mise en évidence par leur dérégulation dans le processus de transformation cellulaire. Dans la prochaine section, je traiterai de l'association entre la destruction des processus normaux d'une cellule et l'induction du cancer.

1.2 Cancer

1.2.1 Les propriétés des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par un défaut dans les circuits qui gouvernent la prolifération normale et l'homéostasie. Des changements génétiques successifs confèrent des avantages de croissance convertissant une cellule normale en cellule cancéreuse (95,96). L'altération de différentes voies est nécessaire pour surmonter les mécanismes de défenses anti-tumorales. Bien que la tumorigenèse nécessite le passage de plusieurs étapes limitantes, l'acquisition de ces différentes propriétés par la mutation d'oncogènes ou de

suppresseurs de tumeurs peut se faire à différents moments lors de la progression tumorigénique.

Les cellules cancéreuses présentent plusieurs caractéristiques dont une résistance à l'apoptose, une dérégulation des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire permettant une prolifération cellulaire indépendante des facteurs de croissance, un blocage de la différenciation (Figure 1.7). L'évasion des mécanismes de surveillance de l'intégrité génomique et de réparation de l'ADN mène à de l'instabilité génomique causant l'accumulation de mutations additionnelles, ce qui permet l'initiation et la progression maligne. De plus, la formation de tumeurs nécessite un potentiel répliatif infini associé au contournement des mécanismes de sénescence.

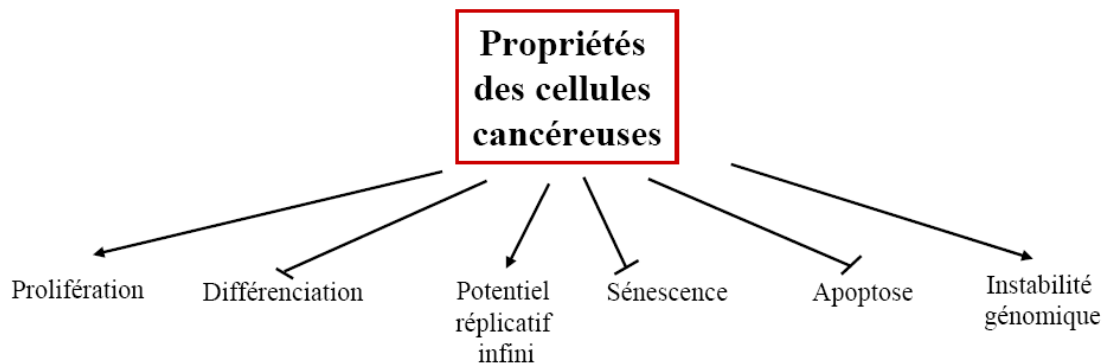


Figure 1.7. Propriétés des cellules cancéreuses

Les cellules doivent acquérir plusieurs propriétés avant d'être transformées, dont un blocage de la différenciation, une dérégulation des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire permettant une prolifération cellulaire autonome, un potentiel répliatif infini associé avec un contournement des mécanismes de sénescence et une résistance à l'apoptose. De plus, une évasion des mécanismes de surveillance de l'intégrité génomique et de réparation de l'ADN cause de l'instabilité génomique et l'acquisition de mutations additionnelles.

1.2.1.1 Intégrité génomique

Les mutations des gènes à l'origine des cancers sont des événements rares dus à un processus efficace de maintien de l'intégrité génomique. Les cellules sont exposées de façon constante à différents types de stress. Des points de contrôle permettent de vérifier l'intégrité de l'ADN et de coordonner la réplication avec la réparation, la ségrégation chromosomique et la progression cellulaire. Les gènes impliqués dans ces points de contrôle (« *gatekeeper* ») représentent la première ligne de défense contre le développement de cancer en dirigeant la réplication correcte de l'ADN et la division cellulaire. L'activation de ces points de contrôle due à des irrégularités dans la réplication ou la présence de dommages à l'ADN cause un arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Ces deux processus sont souvent associés puisque l'effondrement de la fourche de réplication cause des cassures d'ADN simple brin et ultimement des bris d'ADN. En présence de dommages étendus à l'ADN ou lors d'une incapacité à réparer les dommages, les cellules endommagées sont éliminées par l'engagement de programmes de protection tels que l'apoptose ou la sénescence. Or, le génome des cellules tumorales doit acquérir une mutabilité associée principalement à un fonctionnement anormal des gènes de maintien de l'intégrité génomique (« *caretaker* »), impliqués dans le suivi et la réparation des dommages à l'ADN, ou assurant la ségrégation correcte des chromosomes durant la mitose. Tout comme les gènes impliqués dans les points de contrôle, les gènes de maintien de l'intégrité génomique agissent en tant que gènes suppresseurs de tumeurs. La perte de fonction des gènes de maintien entraîne une instabilité génomique conférant aux populations de cellules pré-malignes le potentiel d'acquérir les propriétés tumorales.

1.2.1.2 Prolifération cellulaire

Les cellules normales requièrent des signaux de croissance mitogéniques pour entrer en cycle et ainsi passer d'un état de quiescence à un état de prolifération. Plusieurs oncogènes miment la signalisation normale en aval des facteurs de croissance et autres facteurs

mitogéniques, causant une perte de dépendance aux stimuli exogènes de croissance. Par exemple, les récepteurs aux facteurs de croissance sont souvent retrouvés surexprimés dans les cancers entraînant une réponse accrue aux niveaux ambiants de facteurs de croissance ou encore une signalisation indépendante des ligands. En plus du taux de prolifération, le taux d'attrition est aussi impliqué dans l'expansion des cellules tumorales. En effet, les signaux antiprolifératifs maintiennent l'homéostasie tissulaire. Ces signaux bloquent la prolifération en causant la sortie des cellules du cycle et leur entrée en quiescence. Ces signaux antiprolifératifs ciblent les protéines RB (RB, P107 et P130) qui sont les gardiens du cycle cellulaire. La destruction de cette voie rend les cellules insensibles aux facteurs antiprolifératifs et engendre une prolifération cellulaire excessive. Dans les cancers humains, les circuits antiprolifératifs convergeant sur RB et le cycle cellulaire sont souvent détruits.

1.2.1.3 Survie et apoptose

L'apoptose est essentielle pour l'homéostasie tissulaire et peut être déclenchée par des signaux intrinsèques ou extrinsèques convergeant tous vers un effecteur central de l'apoptose, la mitochondrie. La voie extrinsèque répond à l'activation de récepteurs de surface tels que les récepteurs de la famille TNF. La liaison de leur ligand déclenche le recrutement et l'activation des caspases. La voie endogène, quant à elle, est induite suite à l'altération de l'intégrité de la membrane mitochondriale. L'activation des protéines proapoptotiques suite à des dommages intracellulaires causés, par exemple, par un stress cellulaire, la surexpression d'oncogènes ou des lésions à l'ADN, entraîne la formation de pores dans la membrane mitochondriale et l'expulsion du cytochrome C. Ce dernier active la cascade de caspases initiatrices et effectrices clivant de nombreux substrats cellulaires, dont les lamines nucléaires. Par conséquent, le relargage des endonucléases causent la condensation et la fragmentation de la chromatine et la formation éventuelle de corps apoptotiques (97,98). Qu'elle soit d'origine intrinsèque ou extrinsèque, l'apoptose demeure un moyen de protection efficace contre les anomalies cellulaires. Dans la majorité des cas,

le développement de tumeurs nécessite de contrer les mécanismes apoptotiques. Par exemple, la perte de *TRP53* (p53), un régulateur proapoptotique, est observée dans plus de 50% de tous les cancers.

1.2.1.4 Potentiel réplcatif infini

L'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance de l'environnement et la résistance à l'apoptose entraîne une prolifération excessive délétère pour l'intégrité des chromosomes. En effet, à chaque cycle de réplication, les extrémités des chromosomes, les télomères, raccourcissent progressivement. Le raccourcissement des télomères au dessus d'une certaine limite active une réponse aux dommages à l'ADN médiée par ATM, ATR, CHK1 et CHK2 dû à l'exposition de l'ADN et sa reconnaissance en tant que bris d'ADN double brin. Généralement, l'arrêt de la réplication permet à la cellule de réparer le dommage pour ensuite enclencher de nouveau le cycle cellulaire. Les cellules présentant un raccourcissement trop important des télomères sortent irréversiblement du cycle cellulaire (sénescence) ou entrent en apoptose. Un potentiel réplcatif infini est nécessaire à la croissance maligne. L'enzyme TERT, une composante de la télomérase qui assure le maintien de la longueur des télomères, est activée dans près de 85-90% des cancers humains (99).

1.2.1.4.1 Sénescence

Plusieurs mécanismes cellulaires intrinsèques sont en place pour limiter l'expansion des cellules cancéreuses. Tout comme l'apoptose, la sénescence induite par les oncogènes semble représenter une barrière contre la transformation oncogénique en supprimant la prolifération anarchique des cellules néoplasiques précoces.

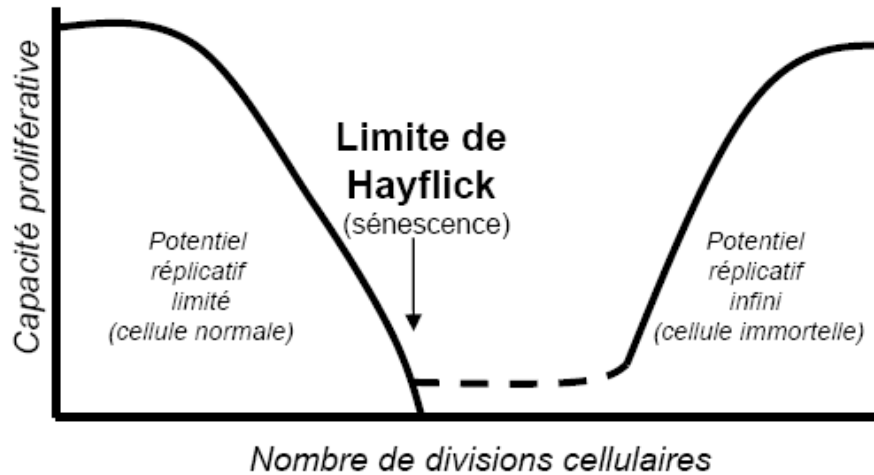


Figure 1.8 La limite de Hayflick associée avec la sénescence répliative.

Les cellules normales se divisent pour un certain nombre de cycles avant d'entrer en phase de sénescence répliative, ce qui est dû à l'érosion de leurs télomères (limite de Hayflick). Les cellules cancéreuses doivent contourner cette limite pour assurer leur potentiel répliatif infini.

La sénescence répliative a été découverte par Hayflick qui a montré que les fibroblastes normaux maintenus en condition de culture perdent éventuellement leur capacité à proliférer après un nombre précis de divisions cellulaires (100) (Figure 1.8). Cette limite de Hayflick dépend de la réduction progressive de la longueur des télomères à chaque cycle de répliation. En plus des signaux de stress dépendants des télomères, la sénescence peut être induite par l'activation oncogénique, des signaux de stress soutenus ou encore par une hyperactivation de signaux de prolifération. Contrairement à la sénescence répliative, la sénescence induite par les oncogènes se produit indépendamment du raccourcissement des télomères ou de leur dysfonction. Différents oncogènes induisent un programme de sénescence tels que *N-RAS* ou *BRAF* (101-103) De plus, ce programme de sénescence est aussi activé par différents mécanismes de stress comme les dommages à l'ADN, des changements épigénétiques et du stress oxydatif. Une augmentation des niveaux d'espèces

réactives oxygénées (ROS) a été retrouvée dans les cellules sénescents (104) (Figure 1.9). Les cellules sénescents présentent des foci de dommages à l'ADN et ces dommages à l'ADN sont associés avec l'activation oncogénique (105-107).

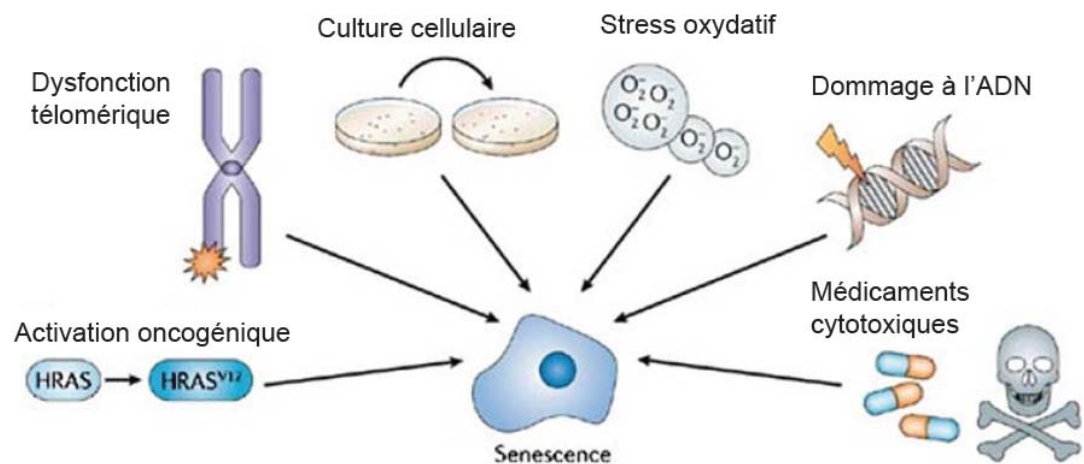


Figure 1.9 Inducteur de sénescence

La sénescence est induite par différents stress cellulaires dont l'activation oncogénique, le stress oxydatif, la culture cellulaire, un raccourcissement des télomères, des médicaments cytotoxiques, une réplication aberrante, des dommages à l'ADN. La sénescence représente un mécanisme de défense empêchant la prolifération des cellules potentiellement endommagées. Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer (108), copyright 2006.

1.2.1.5 Propriétés des cellules sénescents

Les cellules qui entrent en sénescence présentent un arrêt irréversible de la prolifération. La transition des cellules d'un état de prolifération à un état de sénescence est associée avec des changements morphologiques distincts dû à l'altération de plusieurs gènes associés avec le cytosquelette. Certaines altérations morphologiques caractéristiques sont observées

comme l'élargissement des cellules et leur vacuolarisation. Les cellules sénescents présentent plusieurs propriétés telles qu'une inhibition irréversible de la croissance cellulaire, une augmentation de la résistance aux stimuli apoptotiques, la condensation de chromosomes dans des domaines d'hétérochromatine (SAHF), la présence de foci de dommage à l'ADN persistants et l'expression de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal). Ce marqueur vient d'une accumulation de la β -galactosidase lysosomale à un niveau où son activité est détectable à un pH sous-optimal (109,110). D'autre part, l'incapacité des cellules à proliférer malgré la présence d'une abondance de nutriments et de mitogènes est associée à un maintien de leur viabilité cellulaire, ainsi que de leur activité métabolique (111). Les cellules sénescents sont donc insensibles aux signaux mitogéniques.

De plus, la sénescence est associée avec des changements globaux dans la structure de la chromatine. Celle-ci est caractérisée par une accumulation de HP1 et de foci d'hétérochromatine (SAHF) composé d'histones H3 triméthylées sur la lysine 9 (112). Les domaines SAHF sont associés avec la répression de l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire et régulés par le facteur de transcription E2F (113). Cette réorganisation de la chromatine a été associée avec une accumulation des corps nucléaires ou corps PML (114,115). En réponse aux stress, aux dommages à l'ADN ou encore à une signalisation oncogénique (116), les cellules présentent une augmentation du nombre et de la taille des corps nucléaires. Ceci entraîne un recrutement des protéines TRP53 (p53) et RB par PML (117,118) causant l'activation de TRP53 et RB associée avec la répression des cibles de E2F (119). TRP53 et RB sont nécessaires à l'induction de la sénescence prématurée induite par les oncogènes (102,117,120).

1.2.2 Leucémie de type T-ALL :

Bien que la majorité des cancers adultes correspondent à des tumeurs solides, près du tiers des cancers chez l'enfant correspondent à des leucémies. La leucémie est un cancer de la moelle osseuse ou du sang causant une production de cellules hématopoïétiques immatures qui prennent éventuellement la place des cellules matures normales. Chez l'enfant, la leucémie lymphoïde représente 30% de tous les cancers et est classifiée en tant qu'aiguë ou chronique selon ses caractéristiques lors du diagnostic. Les leucémies aiguës représentent moins de 1% de tous les cancers et sont catégorisées selon le type cellulaire impliqué: les leucémies lymphoblastiques aiguës des cellules B (B-ALL) ou des cellules T (T-ALL). Contrairement aux leucémies B-ALL, les leucémies T-ALL ont généralement des caractéristiques cliniques non favorables telles qu'une augmentation de lymphocytes, une adénopathie, ainsi qu'une invasion du système nerveux central (121). Les leucémies T-ALL représentent 10-15% des leucémies ALL chez l'enfant et 25% chez l'adulte. Bien que la moitié des patients possède un caryotype normal au diagnostic, l'autre moitié est associée avec des translocations réciproques récurrentes impliquant majoritairement des facteurs de transcription, dont les plus fréquents sont *SCL* et *LMO1/2* (122-124). Leur expression aberrante dans le tissu lymphoïde, causée entre autres par les translocations, est à l'origine des leucémies. La découverte de la collaboration entre *MYC* et *RAS* ou encore *MYC* et *BCL2* a amené l'hypothèse selon laquelle deux lésions sont nécessaires au développement de leucémie. Ainsi, une lésion bloquerait la différenciation, généralement une translocation et l'autre stimulerait la prolifération ou la survie, correspondant généralement à une mutation ponctuelle. Il semble que les événements oncogéniques affectent toutes les fonctions cellulaires dont la différenciation, la prolifération, l'apoptose et la sénescence, suggérant l'accumulation de plusieurs mutations. Certains défauts génétiques spécifiques distinguent les différents sous-groupes moléculaires et cytogénétiques en déterminant la signature d'expression génique qui définit le sous-type de leucémie T-ALL. D'autres mutations sont retrouvées dans la majorité des leucémies T-ALL et synergisent avec ces mutations spécifiques pour affecter des gènes impliqués

normalement dans la régulation du cycle cellulaire, l'auto-renouvellement, la différenciation ou la signalisation. Les anomalies chromosomiques telles que celles résultant de réarrangements des gènes du TCR et des Ig sont à l'origine de la clonalité des leucémies lymphoïdes aiguës.

Bien que le désordre néoplasique origine dans le thymus, il métastase à travers le corps et est rapidement fatal en absence de thérapie. Les traitements actuels consistent majoritairement en une combinaison de différentes chimiothérapies. Les leucémies T-ALL chez l'enfant possèdent un taux de rémission de 75-85%, alors que celui chez l'adulte est seulement de 35-40%. Les patients atteints de T-ALL présentent un taux plus élevé de réapparition de la maladie, en plus d'une invasion du système nerveux central que ceux atteints de leucémies de type B-ALL. De plus, le taux de rémission des patients atteints de leucémies T-ALL associées avec l'activation de l'oncogène *SCL* est seulement de 50%. Dans les leucémies chez l'enfant, les translocations chromosomiques peuvent survenir avant la naissance durant l'hématopoïèse fœtale (125). Plusieurs des translocations retrouvées dans les leucémies lymphoïdes proviennent de la juxtaposition de gènes d'immunoglobuline (Ig) ou du récepteur aux cellules T (TCR) avec certains oncogènes. L'expression aberrante de ces oncogènes sous leur forme normale cause une transformation à des étapes précises du développement thymocytaire. De plus, l'expression de certains oncogènes est associée à un arrêt du développement à des stades particuliers du développement normal des thymocytes (126) et affecte l'homéostasie du thymus en affectant la survie, la prolifération et le métabolisme. Plusieurs voies doivent donc être affectées pour l'induction et la progression leucémique. De plus, une corrélation existe entre la signature oncogénique et les stades spécifiques du développement thymocytaire (127).

1.2.3 Oncogènes

Le cancer est associé avec l'augmentation de l'expression ou la fonction de gènes (proto-oncogènes) suite à des mutations, des translocations ou encore des amplifications géniques. Les proto-oncogènes sont généralement des régulateurs positifs de la prolifération cellulaire. Leur hyperactivation les transforme en oncogènes qui agissent de manière dominante, c'est-à-dire que l'altération d'une seule copie du gène est suffisante au phénotype.

1.2.3.1 Mécanisme d'activation des oncogènes

Les translocations chromosomiques à l'origine des leucémies chez l'homme proviennent généralement d'un défaut dans le processus normal de réarrangement des immunoglobulines ou du récepteur des cellules T (TCR). Pendant le réarrangement du *TCR*, d'autres loci peuvent posséder une configuration ouverte de la chromatine accessible à l'activité des enzymes recombinaise RAG1 et RAG2. Au lieu de réarrangements intrachromosomiques normalement associés avec la production de récepteurs aux antigènes, des réarrangements interchromosomiques produisent des translocations observées dans les leucémies. Les protéines de recombinaison RAG1/2 régulent normalement le réarrangement V-J du *BCR* et V-D-J du *TCR*. La présence de points de jonction exactement à la fin des segments D et J du *TCR* semble indiquer que l'activité recombinaise anormale est à l'origine de ces translocations. Chez l'homme, les locus du *TCR* α , β et δ sont impliqués fréquemment dans des translocations. Les enhancer du *TCR* β ou du *TCR* $\alpha\delta$ (14q11) sont très actifs dans les progéniteurs thymocytaires causant l'expression aberrante des gènes se retrouvant à leur jonction (128).

Au moins deux bris double brins sur des chromosomes séparés sont nécessaires pour l'obtention de translocations chromosomiques. Une translocation réciproque se produit lorsque l'extrémité double brin d'un chromosome est liée à l'extrémité d'un autre

chromosome, ce qui cause l'échange de bras chromosomiques. Les translocations non balancées qui causent la formation de chromosomes dicentriques et acentriques sont à l'origine d'une instabilité génomique importante.

Des bris doubles brins endogènes sont aussi normalement formés pendant le développement lymphoïde. Dans les cellules T, la recombinaison du locus du *TCR* est initiée par les endonucléases RAG1/2 qui introduisent des bris d'ADN double brin (DSB) au niveau de séquences signales de recombinaison. Ces DSB sont ensuite réparés par un mécanisme de délétion opéré par NHEJ produisant des erreurs nécessaires aux jonctions VDJ et à leur diversité. Ces translocations proviennent d'une réparation fautive des bris double brin soit par un mécanisme de jonction des extrémités non homologues (NHEJ) soit par recombinaison homologue. Des séquences présentes dans le génome et ressemblant aux séquences heptamériques et nonamériques de signal de recombinaison VDJ peuvent aussi être ciblées par les protéines recombinases RAG pour créer des DSB et possiblement des translocations chromosomiques (129,130).

La transcription de séquences d'ADN augmente la fréquence de recombinaison (131). Comme des gènes autre que ceux du *TCR* et des *Ig* sont transcrits pendant la recombinaison VDJ et leur chromatine est dans une configuration ouverte, ces gènes semblent vulnérables à l'action des enzymes recombinases. Ces recombinaisons illégitimes peuvent juxtaposer des facteurs de transcription avec des promoteurs et des enhancers forts du *TCR*. Par exemple, des translocations impliquant les loci du *TCR* sont retrouvées dans près de 35% des leucémies T-ALL (132).

1.2.3.2 Translocations dans les leucémies T-ALL

Les gènes impliqués dans des translocations sont majoritairement des facteurs de transcription incluant des membres de différentes familles dont la famille bHLH, (*TAL1/SCL*, *TAL2*, *LYL1*, *MYC*, *BHLHB1*), la famille « LIM-only protein » (*LMO1*,

LMO2), ainsi que les gènes à boîte homéo (*HOX11*, *HOX11L2* et le locus *HOXA*). Les facteurs de transcription sont des cibles préférentielles pour les translocations chromosomiques retrouvées dans les leucémies aiguës des cellules T (Figure 1.10). Par exemple, les gènes de la famille bHLH comme *MYC*, *SCL* et *LYL1* qui sont essentiels au développement de différentes lignées hématopoïétiques ne sont normalement pas exprimés dans les cellules lymphoïdes T (avec comme exception, *MYC*), mais retrouvés dans plusieurs leucémies.

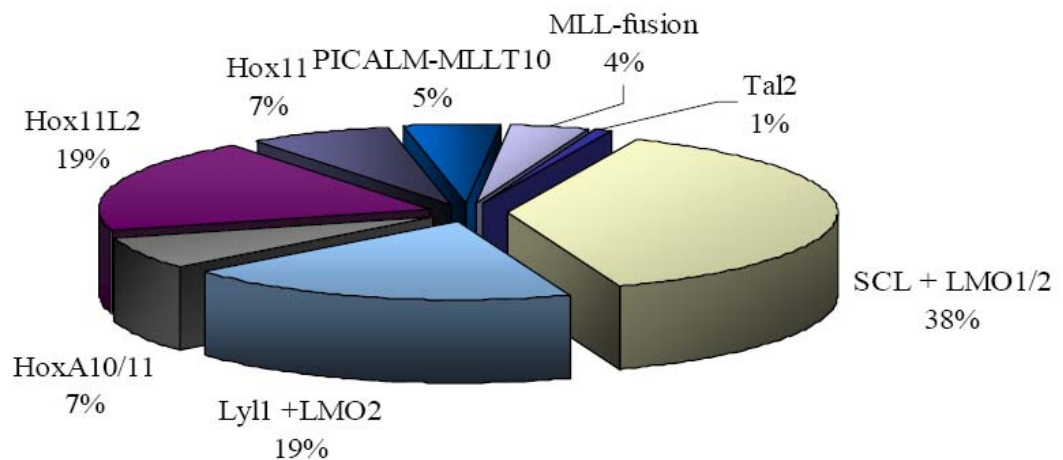


Figure 1.10. Anomalies chromosomiques retrouvées dans les leucémies lymphoblastiques aiguës des cellules T (T-ALL).

Représentation des facteurs de transcription activés par des réarrangements chromosomiques chez les patients atteints de T-ALL. Figure adaptée de Haematologica/the Hematology Journal website <http://www.haematologica.org> (133).

1.2.3.2.1 *SCL*

1.2.3.2.1.1 *SCL* et la leucémie

SCL a été identifié dans la translocation t(1;14)(p33;q11), qui juxtapose *SCL* au locus du *TCR δ* et dans la translocation t(1;7)(p32;q35) qui juxtapose *SCL* au locus du *TCR β* (134-137). La présence de nucléotides non présents dans la matrice et de séquences signal VDJ au point de juxtaposition indique qu'une recombinaison VDJ illégitime peut être à l'origine de ces translocations (88,134).

SCL est impliqué dans le développement de la leucémie lymphoblastique aiguë chez l'enfant (T-ALL). Près du quart des patients montrent une activation anormale du gène *SCL* suite à une translocation chromosomique (t1;14) ou une délétion interstitielle dans le chromosome 1q32 juxtaposant le promoteur du gène *SIL* au locus de *SCL* (134) causant une expression ectopique de *SCL* dans les cellules en prolifération dont les précurseurs thymiques (138). Une expression élevée de *SCL* en absence de réarrangement détectable est observée dans près de 40% des leucémies T-ALL (139,140). Cette augmentation de *SCL* a été suggérée comme provenant de mutations dans des éléments de régulation en cis ou de facteurs de transcription agissant en trans (139,140).

Chez la souris, les modèles transgéniques exprimant *SCL* dans le thymus développent peu de leucémies. Des souris transgéniques surexprimant *SCL* sous le contrôle des promoteurs du gène *CD2*, *LY6E.1 (SCA1)* ou *SIL* ne développent pas de leucémies malgré une expression élevée dans les thymocytes (141-144). De plus, la transplantation de cellules de moelle osseuse surexprimant *SCL* ne permet pas le développement de leucémie (145). Seule l'expression de *SCL* sous le promoteur du gène *LCK* est capable d'induire une leucémie, mais seulement dans 30% des souris et avec une longue latence (146,147). La surexpression dans les souris de la protéine *SCL* dont le domaine de transactivation est absent ou d'un mutant du domaine de liaison à l'ADN de *SCL* (R188G, R189) induit un arrêt de la différenciation thymocytaire et un développement de leucémies des cellules T, démontrant que ces domaines ne sont pas essentiels à l'induction de la leucémie (142,148). Cette longue latence et la faible pénétrance de la leucémie indique que des anomalies

additionnelles sont nécessaires pour la leucémogénèse. De plus, *SCL* collabore avec différents gènes comme la caséine kinase II α (*CSK2A*), *LMO1*, *LMO2*, la perte du locus *Cdkn2a* (*Ink4a/Arf*) pour le développement de leucémie chez la souris (147,149-152). Les gènes *LMO1* et *LMO2* sont activés dans les blastes de patients leucémiques (section suivante). L'activation anormale de l'expression de *SCL* et *LMO1* ou *LMO2* entraîne un arrêt partiel de la différenciation des cellules T au stade double négatif et une augmentation de l'apoptose dans les thymocytes doubles négatifs (88).

1.2.3.2.1.2 Rôle normal de SCL

Le gène *SCL* code pour un facteur de transcription de la famille bHLH de classe II. Le domaine hélice-boucle-hélice (HLH) est responsable de l'hétérodimérisation avec les protéines E comme E2A et HEB. Le domaine basique quant à lui est responsable de sa liaison à l'ADN sur des sites consensus appelés boîtes E (CANNTG) et correspondant préférentiellement à la séquence 5'-AACAGATGGT-3' pour l'hétérodimère SCL-E2A (153). Le locus *SCL* code pour plusieurs isoformes de différents poids moléculaire (p42, p40, p30 et p22) produits par un cadre de lecture alternatif de traduction (154-156). De plus, l'isoforme p22 de *SCL* qui ne possède pas le domaine de transactivation possède quand même une fonction transcriptionnelle (154,157) et la capacité d'induire des leucémies chez la souris (142). Cet isoforme possède également une capacité clonogénique accrue lors d'essais de croissance en agar mou (158). La différence de fonction entre ces isoformes reste encore mal définie (159-161).

SCL forme des hétérodimères avec les protéines E ubiquitaires, E12, E47 et HEB via leur motif hélice-boucle-hélice. D'un point de vue fonctionnel, l'hétérodimère SCL/E2A se comporte en tant qu'activateur ou répresseur selon le contexte cellulaire et les gènes cibles. L'hétérodimère SCL/E2A est moins efficace qu'un homodimère E2A pour l'activation de séquences régulatrices de gènes composées de boîtes E. De plus, selon le contexte cellulaire, son domaine de liaison à l'ADN n'est pas toujours nécessaire à l'activité de *SCL* (162,163). Des complexes multiprotéiques qui contiennent *SCL* et *LMO2* ont été isolées de

lignées cellulaires érythroïdes ou de leucémies aiguës des cellules T (164-166). Ces complexes contiennent entre autres les protéines LDB1 (LIM domain-binding protein 1), E2A ou HEB et GATA1/2/3 (163,164,167-170). De plus, l'activité transcriptionnelle de SCL est régulée par le recrutement de coactivateurs transcriptionnels comme P300 et PCAF ou de corépresseurs tels que SIN3A, HDAC et ETO2 (171-173) (Figure 1.11).

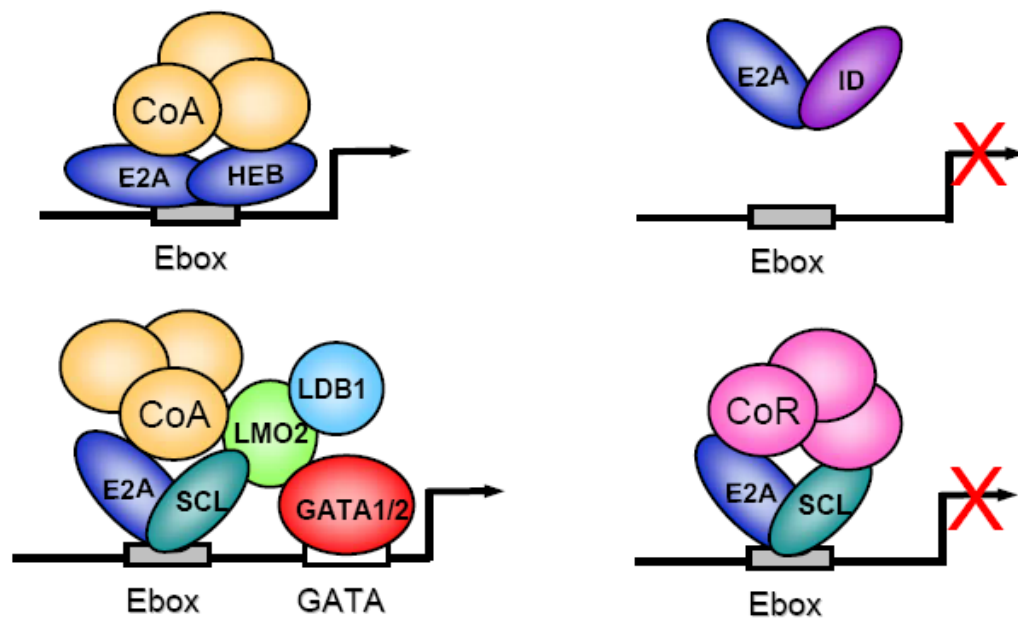


Figure 1.11 Activité transcriptionnelle de SCL.

Les protéines E comme E2A, HEB ou E2-2 agissent en complexe soit ensemble ou avec des protéines HLH de classe II comme SCL ou de classe V comme ID. Alors que les protéines ID agissent en titrant les protéines E en dehors de l'ADN pour inhiber leur activité, la protéine SCL nécessite une hétérodimérisation avec les protéines E pour lier l'ADN sur des séquences de type boîte E. SCL interagit aussi avec les protéines LMO1/2 et GATA1/2 formant des complexes multiprotéiques capable de recruter des coactivateurs (P300) ou des corépresseurs (SIN3A, HDAC, ETO2). Ces complexes peuvent activer ou réprimer des gènes-cibles selon le contexte cellulaire. Figure adaptée de (50), copyright 2008 American Society of Clinical Oncology.

Contrairement aux facteurs bHLH de classe I comme E2A et HEB dont l'expression est ubiquitaire, l'expression de SCL est restreinte à certains tissus plus spécifiquement au niveau du système hématopoïétique, endothélial et neuronal (174-178). SCL est normalement exprimé à partir du jour embryonnaire E7.5. Son expression dans le mésoderme est restreinte aux cellules à un destin endothélial ou hématopoïétique, alors que son expression plus tardive est restreinte à certaines lignées hématopoïétiques. SCL est aussi exprimé dans le système nerveux et dans les lignées endothéliales. Chez l'adulte, SCL est exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques et les précurseurs pluripotents primitifs (179,180), les mastocytes et les mégacaryocytes, (155,179,181) ainsi que dans la lignée érythroïde mature (180,182), alors qu'il est absent de la lignée lymphoïde (135,176,181,183). Bien que l'expression du facteur SCL soit essentielle à l'établissement de l'hématopoïèse, celle-ci doit être réprimée au cours de la différenciation des cellules lymphoïdes. SCL possède aussi une fonction dans la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire (180,184). Pendant la différenciation érythroïde, SCL induit la transactivation de gènes impliqués dans la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire comme *Gpa*, *P4.2* en formant des complexes avec les protéines GATA1/2, LDB1, E2A et LMO2 (165,185,186).

La délétion de *Scl* chez la souris entraîne une létalité embryonnaire au stade E8.5-10 due à l'absence complète de sang et d'hématopoïèse au sein du sac vitellin (144,187). Les cellules souches embryonnaires (ES) *Scl*^{-/-} sont incapables de se différencier dans les lignées érythroïdes et myéloïdes *in vitro* ou *in vivo* et sont incapables de produire des cellules B et T dans un blastocyste de souris *Rag2*^{-/-} (187). Ceci suggère que SCL est essentiel au développement de toutes les lignées hématopoïétiques. Par contre, la délétion conditionnelle de *Scl* dans la souris adulte indique que l'expression continue de *Scl* est essentielle à la différenciation correcte des précurseurs érythrocytaires et mégacaryocytaires, alors qu'elle n'est pas requise pour les lignées myéloïdes et lymphoïdes

(188,189). SCL possède aussi un rôle au niveau de l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques en contrôlant l'entrée en cycle (G0-G1) (Lacombe 2009 soumis).

L'expression de SCL sous le contrôle du promoteur de *GATA1* corrige les défauts hématopoïétiques des embryons *Scl*^{-/-} sans corriger les défauts au niveau de l'angiogenèse (190). Bien que l'hématopoïèse embryonnaire soit rétablie complètement, ces souris meurent au jour E9.5 dû à un défaut sévère de l'angiogenèse du sac vitellin et une absence complète de vaisseaux sanguins. De plus, SCL est exprimé dans les cellules endothéliales des îlots sanguins au jour E8.5, du foie et des poumons du jour E13.5-15.5 (140). *SCL* corrige aussi les défauts hématopoïétiques et endothéliaux des mutants *Cloche* chez le Zebrafish (191). L'expression de *SCL* corrige partiellement le défaut hémangioblastique des corps embryoides (EB) *Flk1*^{-/-} *in vitro* (192). Bien que les cellules endothéliales se développent normalement dans les souris *Scl*^{-/-} (190), il semble que SCL soit essentiel à l'hématopoïèse et à l'angiopoïèse.

1.2.3.2.2 Les autres facteurs bHLH

D'autres gènes de la famille bHLH sont impliqués dans les leucémies T-ALL. TAL2 et BHLHB1, deux protéines bHLH normalement exprimées dans le cerveau, ont été retrouvés surexprimés dans des leucémies T-ALL suite à des translocations récurrentes mais rares : t(7;9)(q34;q32) juxtaposant *TAL2* au *TCRB* et t(14;21)(q11;q22) qui juxtapose *BHLHB1* et le *TCRA* (193,194). *LYL1* est retrouvé constitutivement surexprimé dans un sous-groupe de leucémie T-ALL en absence de réarrangements chromosomiques ou dans une translocation rare t(7;19)(q34;p13) (127,195). *LYL1* et SCL possède 90% d'identité de séquences dans leur motif bHLH en plus de posséder un patron d'expression superposé, plus particulièrement dans la vasculature, l'endocardium, le système hématopoïétique en développement et le foie fœtal. Tout comme *Scl*, celui-ci n'est pas exprimé au cours de la différenciation thymocytaire (196). Les souris surexprimant *LYL1* sous le promoteur de

Efla causant son expression ubiquitaire développent des leucémies de type T et B dans 30% des cas (197).

1.2.3.2.3 Les protéines de la famille LIM-only (LMO)

Les protéines LMO sont des cofacteurs de transcription possédant deux motifs répétés riches en cystéine de type doigt de zinc (LIM) ne liant pas l'ADN (198). Cette famille comprend quatre membres LMO1, LMO2, LMO3 et LMO4.

1.2.3.2.3.1 Les protéines LMO et la leucémie

LMO1 a été identifié comme étant activé dans une leucémie associée avec une translocation t(11;14)(p15;q11) (199,200). Ensuite *LMO2* a été découvert par son association avec les translocations t(11;14)(p13;q11) et t(7;11)(q35;p13) (201,202). De façon similaire à *SCL*, les gènes *LMO1/2* sont fréquemment impliqués dans la leucémogénèse des cellules T chez l'enfant. Ils sont activés par des translocations avec les loci du *TCR* ou par délétion d'un élément régulateur négatif de l'expression de *LMO2* (202,203). En plus des translocations chromosomiques, *LMO2* est activé par insertion rétrovirale lors de thérapies géniques utilisant un rétrovirus exprimant le gène *IL2RGC* pour corriger le défaut génétique des cellules hématopoïétiques de patients X-SCID. Quatre des 10 patients développèrent une leucémie caractérisée par l'activation de *LMO2* suite à l'intégration d'un rétrovirus dans son locus (204,205) (206). De plus, la coopération entre l'arrêt de différenciation causé par *LMO2* et l'avantage de survie ou de prolifération donné par l'expression du récepteur à l'interleukine (*IL2RGC*) semble être à l'origine de ces leucémies (207). De plus, certaines leucémies induites par des rétrovirus chez la souris possèdent une intégration à la fois dans les locus de *Lmo2* et de *Il2rg* renforçant l'hypothèse d'une collaboration génétique (208).

Malgré une longue latence, les souris transgéniques exprimant *LMO1/2* dans les cellules T développent une leucémie avec une accumulation de cellules T immatures. Les souris transgéniques surexprimant *LMO1* sous le promoteur *LCK* qui cible son expression dans le

thymus développent des leucémies (209). Les tumeurs sont formées après une longue période de latence peu importe le promoteur utilisé (*CD2*, *THY1.1* ou métallothionine) contrôlant l'expression de *LMO2* ce qui suggère que des mutations secondaires dans d'autres oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs sont nécessaires à la transformation. Ainsi la surexpression de *LMO1* ou *LMO2* est souvent associée avec une surexpression de *SCL* dans les leucémies T-ALL (Revue par (133)). L'expression ectopique de *LMO2* dans la lignée lymphoïde affecte particulièrement la transition DN2-DN3 des cellules T en différenciation (124,210-212). De plus, l'expression aberrante et spécifique aux cellules T de *LMO1* et *LMO2* a été retrouvée dans 45% des cas de leucémies T-ALL, que ce soit en présence ou en absence de translocation.

1.2.3.2.3.2 Rôle normal de *LMO2*

Les souris *Lmo2*^{-/-} présentent un arrêt de l'érythropoïèse au niveau du sac vitellin et succombent *in utero* à une absence de sang autour du jour E10.5 (213). De plus, des études de différenciation du sac vitellin de ces souris ou de cellules souches embryonnaires (ES) mutantes pour *Lmo2* ont montré un blocage du développement érythroïde. Ceci est appuyé par les données obtenues chez le *Xenopus* et le Zebrafish, montrant un rôle important pour *LMO2* dans l'érythropoïèse primitive (214,215). L'absence de *Lmo2* dans des cellules ES empêche leur contribution aux différentes lignées hématopoïétiques dans la souris chimérique adulte, alors que sa réintroduction rétablit la contribution dans les différentes lignées (213,216-218). Par contre, la délétion conditionnelle de *Lmo2* chez l'adulte a révélé que *Lmo2* n'est pas essentiel au maintien de la lymphopoïèse. En effet, ces souris ne présentent aucun défaut dans le développement lymphocytaire (210). Ces études démontrent le rôle crucial de *Lmo2* dans l'hématopoïèse adulte. De plus, la surexpression de *LMO2* et *LDB1* dans des lignées proérythroblastes entraîne un défaut de différenciation érythrocytaire pouvant s'expliquer par une action de type dominant négatif. Ces données concordent avec la diminution de leur expression au cours de la différenciation érythroïde

normale, suggérant un rôle dans le maintien des précurseurs érythroïdes à un stade immature (219).

Le patron d'expression de *Lmo2* est similaire à celui de *Scl*, autant dans l'hématopoïèse embryonnaire qu'au stade adulte. En effet, *Lmo2* est exprimé dans les lignées érythroïde et myéloïde, ainsi que dans le système nerveux central, les poumons, les reins, le foie et la rate, mais est absent dans le thymus (179,213,220-224). Ainsi ces protéines sont minimalement exprimées ou totalement absentes dans les cellules T et leurs progéniteurs (225). L'expression de *Lmo2* est régulée au niveau transcriptionnel par plusieurs facteurs de transcription agissant sur le promoteur mais aussi au niveau des certaines séquences « enhancer » et répresseur de *Lmo2*. Ainsi le promoteur proximal de *Lmo2* est contrôlé par FLI1, PU.1, TEF et HLF, alors que l'enhancer à -75kb est régulé par le complexe SCL comprenant SCL, LMO2, E2A, GATA1/2 et LDB1 (226,227). Ces protéines agissent en tant que protéines d'échafaudage en s'associant à d'autres protéines. Par exemple, dans les cellules érythroïdes, LMO2 interagit avec SCL, GATA1 et LDB1 formant un complexe transcriptionnel multiprotéique avec les protéines E, E2A et/ou HEB (164,167,186). Ainsi dans ce complexe, GATA1 et l'hétérodimère SCL-E2A contactent l'ADN, alors que les protéines LMO2 et LDB1 servent de protéines d'échafaudage. LMO2 interagit aussi avec des protéines telles que AF6 et RBP2 (228,229).

1.2.3.2.4 Les protéines ID

La famille de protéines ID (inhibiteur de la liaison à l'ADN) comprend quatre protéines de type HLH (ID1-ID4). Les protéines ID forment des hétérodimères avec les protéines de classe I et II (47-49,230). L'absence de domaine de liaison à l'ADN cause la formation d'hétérodimère non actif transcriptionnellement (47). Les protéines ID sont hautement exprimées dans les cellules en prolifération et inhibent la différenciation dans différents tissus en inhibant l'activité des protéines bHLH (231-234). Des souris transgéniques surexprimant *ID1* ou *ID2* sous le contrôle du promoteur *LCK* montrent une réduction de la

cellularité thymique et un défaut de différenciation des cellules T, similaire à celui des souris $E2a^{-/-}$ ou SCL^{tg} (152,235-237). Par contre, le défaut de différenciation est plus sévère que dans le souris $E2a^{-/-}$, s'expliquant par le fait que les protéines ID sont capables d'inhiber non seulement E2A, mais aussi HEB et E2-2. De plus, la surexpression de *IDI* dans les lymphocytes B montre une absence complète de cellules B comme pour les souris $E2a^{-/-}$ (238). De plus, ces souris développent aussi des leucémies de type T (235,236).

1.2.3.2.5 *La voie de Notch1*

Le gène *NOTCH1* a été identifié dans un patient leucémique au point de jonction de la translocation t(7;9)(q34 ;q34.3). Cette translocation élimine son domaine extracellulaire de liaison au ligand plaçant la forme tronquée constitutivement active sous le contrôle du locus du *TCR β* (239). Bien que cette translocation n'a été retrouvée que dans 1% des cas, des mutations activatrices somatiques ont été retrouvées dans plus de 50% des patients leucémiques de type T-ALL (240,241). Ces mutations sont retrouvées dans la région C-terminale et le domaine d'hétérodimérisation (Figure 1.12). Les mutations dans le domaine d'hétérodimérisation activent le signal de NOTCH en altérant l'interaction entre la sous-unité transmembranaire et la sous-unité inhibitrice de NOTCH causant le clivage et l'activation de NOTCH en absence de ligand (241,242). Les mutations dans la région C-terminale éliminent son domaine PEST empêchant l'interaction avec l'ubiquitine ligase FBW7 et sa dégradation par le protéasome (243). Cette hausse de la stabilité protéique du domaine intracellulaire (ICN) augmente la signalisation de NOTCH. La surexpression de la forme ICN de NOTCH1 ou NOTCH3 cause le développement de leucémie de type T-ALL chez la souris (242,244-246).

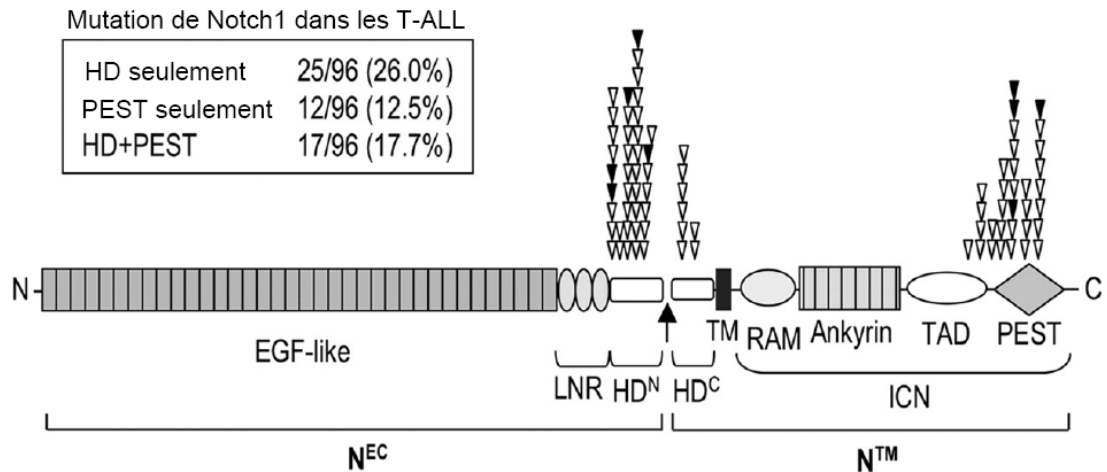


Figure 1.12 Mutations activatrices de NOTCH1 dans les leucémies T-ALL humaines.

Représentation schématique des domaines conservés des membres de la famille Notch. Les mutations activatrices de la protéine NOTCH1 sont retrouvées dans les domaines d'hétérodimérisation et de dégradation (PEST). Reproduit de (247) avec la permission de AAAS.

De plus, 30% des patients de type T-ALL dont *NOTCH1* est intact, possèdent des mutations inactivatrices de *FBXW7*, la composante F-box du complexe E3 ubiquitine ligase SCF (248,249). Cette mutation cause l'inactivation de l'activité ubiquitine ligase de *FBXW7* l'empêchant de cibler NOTCH1 pour sa dégradation par le protéasome (250). La délétion spécifique de *Fbw7* dans les cellules T chez la souris stabilise la protéine NOTCH1 dans les thymocytes et cause le développement de leucémies des cellules T (251).

1.2.3.2.6 Voie de signalisation du pré-TCR

La signalisation du pré-TCR et du TCR est importante à la survie, la différenciation et la fonction des lymphocytes T. Dans les leucémies T-ALL, plusieurs composantes de la voie

de signalisation du pré-TCR/TCR sont ciblées par des mutations ou des réarrangements chromosomiques. L'expression de protéines tyrosine kinase mutantes constitutivement actives interfère avec la signalisation du TCR et du pré-TCR, donnant un avantage prolifératif et de survie aux cellules. Par exemple, ABL1, une tyrosine kinase cytoplasmique exprimée ubiquitairement et ayant un rôle dans la signalisation du TCR est activée suite à des translocations chromosomiques avec les protéines BCR ou NUP214, respectivement dans 1% des T-ALL et 6% des leucémies B-ALL (252-255). De plus, la protéine tyrosine kinase LCK qui est importante pour la signalisation du pré-TCR/TCR a été retrouvée dans une translocation impliquant le locus du *TCR β* causant son expression ectopique au cours de la différenciation thymocytaire (256,257). Un autre exemple vient des protéines RAS qui médient la transmission du signal des récepteurs membranaires comme le TCR ou le pré-TCR vers les protéines ERK. En plus, de mutations activatrices de *N-RAS* qui sont retrouvées dans 10% des T-ALL, la protéine RAS est activée dans près de 50% des cas (258).

1.2.4 Suppresseurs de tumeurs

En plus d'une activation de proto-oncogènes, les cellules cancéreuses présentent aussi une inactivation de la fonction de gènes suppresseurs de tumeurs suite à des mutations, des délétions chromosomiques ou des changements épigénétiques. Ces gènes agissent en tant que gardiens de l'intégrité du matériel génétique (« *caretaker* ») ou de la progression dans le cycle cellulaire (« *gatekeeper* »). Contrairement aux oncogènes qui agissent de manière dominante pour induire la transformation, les gènes suppresseurs de tumeur sont généralement récessifs et doivent être complètement inactivés. Cette hypothèse énoncée par Knudson stipule que la perte des deux allèles est nécessaire pour l'apparition de cancer (259). La présence de mutations au niveau germlinal prédispose le porteur au développement de tumeurs, puisqu'un allèle du gène est alors déjà inactivé. De plus, la majorité des gènes suppresseurs de tumeurs présente une perte d'hétérozygotie (LOH)

dans les tumeurs. Par contre, certains gènes suppresseurs de tumeurs atypiques sont haploinsuffisants. La présence d'un seul allèle fonctionnel est insuffisante pour accomplir l'activité normale du gène et ainsi de protéger contre l'apparition du cancer. Autant les gènes de maintien de l'intégrité génomique que les gènes de contrôle du cycle cellulaire doivent être mutés pour permettre l'apparition du cancer (259).

1.2.4.1 Progression à travers le cycle cellulaire

Le développement du cancer vient de l'accumulation d'aberrations chromosomiques qui confère un avantage sélectif aux cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales, ce qui implique la perte du contrôle normal de l'homéostasie menant ultimement à une croissance continue.

Le cycle cellulaire assure la réplication de l'ADN et la ségrégation du génome et des composantes cellulaires entre deux cellules filles identiques. Le cycle cellulaire se divise en 4 étapes. Dans la phase G1, les cellules diploïdes ($2n$) se préparent à la synthèse de l'ADN. Les cellules passent en phase de synthèse d'ADN (phase S) et dupliquent leur génome ($4n$). Les cellules continuent de croître pendant la phase G2 avant d'entrer en mitose où les deux cellules filles se séparent. Lorsque les cellules arrêtent de proliférer, dû à des signaux antiprolifératifs ou à l'absence de signaux mitogéniques, elles sortent du cycle pour entrer en état de quiescence (G0).

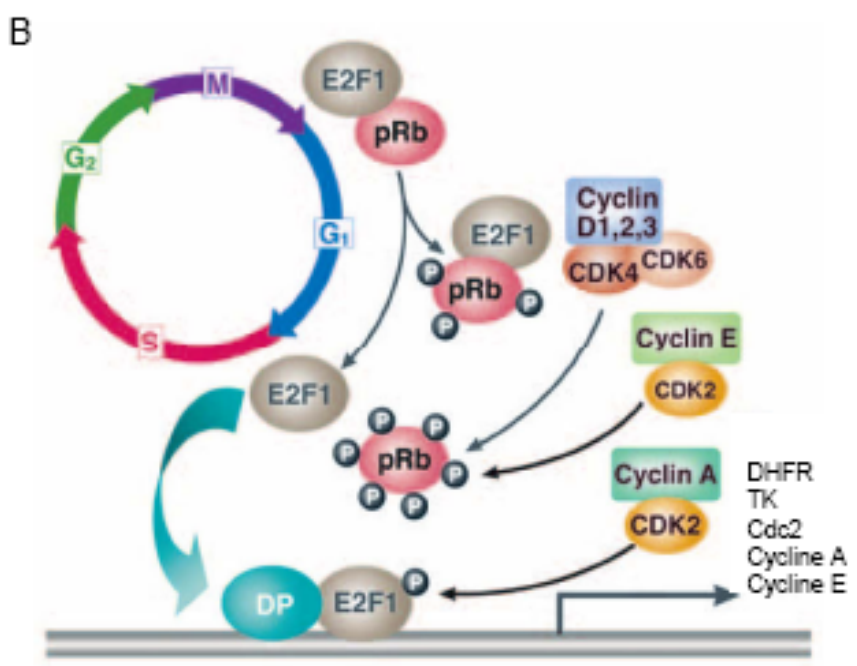
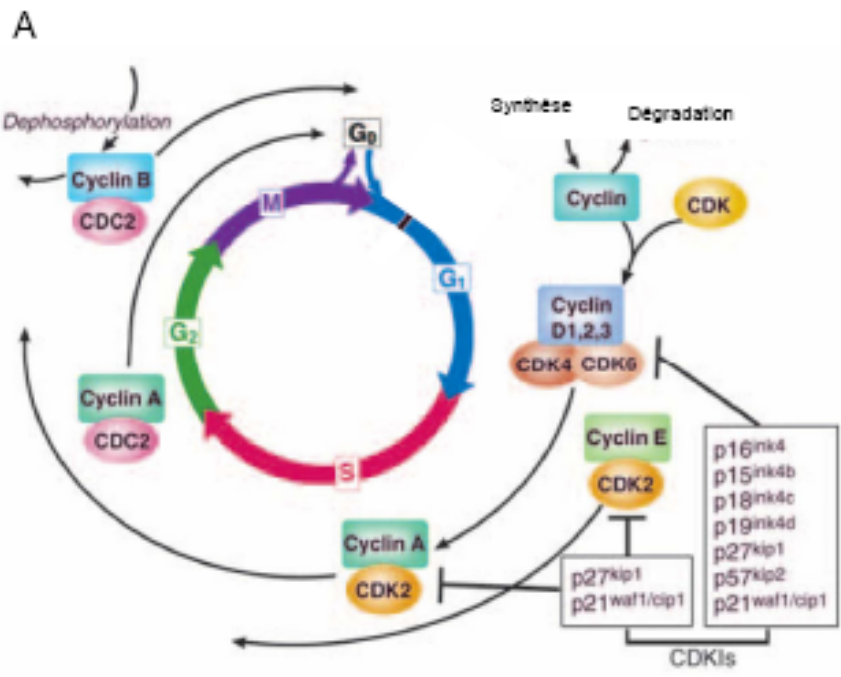


Figure 1.13 Progression à travers le cycle cellulaire.

A) Le cycle cellulaire se divise en quatre étapes : G1, S, G2 et M. La progression à travers le cycle cellulaire est régulée par les kinases dépendantes des cyclines (CDK) qui sont régulées positivement par leur association avec les cyclines et négativement par les inhibiteurs des CDK (CDKI). B) La transition G1/S est régulée par les protéines RB et E2F1. E2F1 se retrouve en complexe avec la forme hypophosphorylée de RB. La phosphorylation de RB par les CDK4-6 permet l'association de E2F1 avec la protéine DP aux promoteurs de ses gènes cibles. L'expression de ces gènes permet alors la progression en phase S. Reproduit de (260) avec permission. Copyright 2005 American Society of Clinical Oncology. Tous droits réservés.

La progression à travers le cycle cellulaire nécessite le passage de différents points de contrôle assurant la complétion de chaque phase avant l'entrée dans la suivante. Cette progression est gouvernée par des kinases dépendantes des cyclines (CDK) (Figure 1.13). Les CDK sont une famille de Sérine/Thréonine kinases régulées par leur état de phosphorylation et par leur liaison à leurs sous-unités régulatrices ou aux cyclines (cyclines D, E et A.). L'entrée et la progression à travers la phase G1 est induite par des signaux mitogéniques causant une augmentation de l'expression des gènes des cyclines D (*Ccnd1*, *Ccnd2*, *Ccnd3*). Ces protéines forment ensuite des complexes hétérodimériques avec les kinases CDK4 ou CDK6 menant à la phosphorylation de la protéine RB (Retinoblastoma protein) ou des protéines de type RB, P107 et P130. Dans sa forme non-phosphorylée, RB régule négativement la famille de facteurs de transcription E2F en s'y associant. Une fois phosphorylée, la protéine RB relâche les facteurs de transcription E2F qui peuvent alors former des complexes transcriptionnellement actifs avec les protéines DP, DP1 et/ou DP2. Les protéines E2F induisent alors l'expression de gènes essentiels à la transition entre les phases G1 et S comme *Dhfr*, *Tk*, *Cdc2*, *Cycline A* et *Cycline E* (261,262). La cycline E s'associe avec CDK2 et phosphoryle RB ainsi que d'autres substrats essentiels à l'initiation des origines de réplifications, la duplication du centrosome et la biosynthèse des histones permettant la transition G1/S (263).

1.2.4.1.1 Les régulateurs du cycle cellulaire

Les complexes cycline-CDK sont négativement régulés par les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CKI). Ceux-ci sont divisés en 2 classes, les protéines de la famille INK4 qui s'associent et inhibent les complexes cycline D-CDK4 ou CDK6 et les protéines de la famille CIP/KIP qui agissent en tant que régulateurs négatifs des cyclines E et des complexes cycline A-CDK2 et cycline B-CDK1. En plus, des CKI, le cycle cellulaire est contrôlé par deux voies, la voie de RB/Cycline D1/P16 et la voie du point de contrôle G1/S médié par TRP53.

1.2.4.1.1.1 La famille CIP/KIP

La famille de protéines CIP/KIP comprend CDKN1A/P21, CDKN1B/P27 et CDKN1C/P57 et possèdent un domaine d'inhibition des CDK dans la région N-terminale (264,265). Ils s'associent et inhibent les complexes cycline A-CDK2, cycline B-CDC2, cycline E-CDK2 et cycline D-CDK4 *in vitro* (266,267). De plus, leur surexpression cause un arrêt en G1 (266,268-270).

1.2.4.1.1.2 La famille INK4

La famille de protéines INK4 sont une autre famille d'inhibiteurs des CDK et comprend les protéines INK4B/P15, INK4A/P16, INK4C/P18 et INK4D/P19. Ces protéines possèdent des structures similaires dominées par plusieurs répétitions ankyrines et leur expression tissulaire différentielle dicte leur fonction spécifique. Ces protéines agissent en bloquant la progression du cycle cellulaire en liant soit CDK4 ou CDK6 et en inhibant l'action des cyclines D (271-274). Leur expression ectopique induit un arrêt en G1 dans différents types cellulaires (273). P16 et P15 agissent en bloquant la phosphorylation de RB par les CDK causant son activation et la répression des facteurs de transcription E2F.

1.2.4.1.2 *Les protéines E2F et les protéines RB*

Les protéines de la famille RB qui comprend RB1 et ses homologues RBL1 (P107) et RBL2 (P130) médient l'arrêt du cycle cellulaire en antagonisant les facteurs de transcription E2F. Les protéines E2F sont retrouvées en association avec les protéines DP et sont classées en deux groupes, les E2F activateurs (E2F1-2-3) et les E2F inhibiteurs (E2F4-5-6). Les protéines E2F régulent l'expression de gènes impliqués dans la réplication, la réparation de l'ADN et la progression entre les phases G2/M. Seule la forme hypophosphorylée de RB interagit avec les protéines E2F pendant le cycle cellulaire (275,276). La phosphorylation des protéines RB par les complexes CDK-cyclines inactive son effet répresseur sur la transcription. Bien que RB soit actif au stade G1, RB est inactivé dans son stade hyperphosphorylé pendant le reste du cycle cellulaire (S, G2 et M) (277). L'activité des protéines RB est aussi associée avec des changements dans la structure de la chromatine due au recrutement de protéines histones déacétylases (HDAC) et méthyltransférases (HMT), du complexe SWI/SNF et des protéines POLYCOMB (276,278).

1.2.4.1.3 *La voie de TRP53*

La famille TRP53 comprend les gènes *Trp53*, *Trp63* et *Trp73*. Ces gènes codent pour plusieurs isoformes selon un épissage différentiel (279-283). Les isoformes courts de ces protéines (P44 ou Δ Np53, Δ Np63 et Δ Np73) ne possèdent pas le domaine de transactivation et sont connus pour agir en tant que dominant négatif en bloquant la fonction de l'isoforme pleine longueur (P53, TAp63 et TAp73) (283-287). Ces protéines agissent en tant que facteurs de transcription en s'associant à des séquences d'ADN consensus similaire. Ainsi TRP53, TRP63 et TRP73 possèdent à la fois des gènes cibles communs et spécifiques (288).

P53 est un facteur de transcription qui inhibe la progression du cycle cellulaire ou induit l'apoptose en réponse à un stress cellulaire ou un dommage à l'ADN pour maintenir l'intégrité génomique. Ces différents effets physiologiques dépendent en partie de la sélectivité des gènes cibles. TRP53 transactive et transréprime plusieurs gènes en réponse à un nombre élevé de signaux de stress, incluant les dommages à l'ADN, l'érosion des télomères, l'hypoxie, des changements de température, la destruction des nucléoles ou la déplétion en dNTP. Ces stress causent différents effets cellulaires : l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, l'induction d'autophagie, la migration cellulaire et la sénescence, mais aussi la différenciation, la régulation du métabolisme et l'angiogenèse. La réponse de TRP53 est hétérogène et dépend des différents signaux de stress, de l'environnement, du tissu et du type cellulaire, mais aussi de l'expression d'enzymes modificatrices ou de cofacteurs de TRP53. Le type de stress influence l'initiation et la durée de l'augmentation des niveaux de TRP53. Des niveaux faibles de stress ou de dommage à l'ADN induit un niveau d'expression de TRP53 qui induit des gènes d'arrêt de la croissance. Sous un stress sévère, des niveaux élevés d'expression de TRP53 activent les voies apoptotiques.

P53 peut aussi être régulé via sa localisation subcellulaire. En plus d'agir en tant que facteur de transcription, TRP53 peut aussi être retenu dans le cytoplasme. Par exemple, TRP53 active une réponse apoptotique par son ciblage à la membrane externe de la mitochondrie et par son interaction directe avec les protéines pro-apoptotique BAK et BAX et la protéine anti-apoptotique BCL-XL (Revue par (289)).

La fonction de TRP53 en tant que facteur de transcription est modulée par sa localisation dans le noyau, mais aussi par la sélectivité de ses différentes cibles. La sélection des cibles de TRP53 est basée sur son abondance et son affinité pour un promoteur donné (Revue par (290)). Lorsque les niveaux de TRP53 sont faibles, les gènes avec un promoteur possédant une forte affinité pour TRP53 et qui sont généralement associé avec un arrêt du cycle cellulaire sont activés. Dans le cas de niveaux élevés de TRP53, les gènes dont les

promoteurs sont de faibles affinités pour TRP53, et généralement impliqués dans l'apoptose, sont activés.

La sélection des promoteurs est aussi influencée par des modifications post-traductionnelles de TRP53, ce qui influence la liaison de cofacteurs. La présence de cofacteurs régulateurs de TRP53 dans différents tissus est cruciale. Différentes modifications post-traductionnelles affectent l'activité et la stabilité de TRP53. TRP53 peut être modifié par ubiquitination, phosphorylation, acétylation, méthylation, ribosylation et par glycosylation (Revue par (291)). Par exemple, la protéine ARF (« *Alternative reading frame* ») encodée par le locus *Cdkn2a* est un médiateur clé de l'activation de TRP53 en réponse à des signaux mitogéniques excessifs. La protéine ARF lie l'ubiquitine ligase MDM2 empêchant l'interaction avec TRP53 et sa dégradation par le protéasome. Cette accumulation de TRP53 dans la cellule et l'expression de ses gènes cibles causent l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. De plus, plusieurs modifications post-traductionnelles de TRP53 ou MDM2 régulent leur réponse aux signaux de stress cellulaire, la majorité en modulant l'association entre MDM2 et TRP53.

1.2.4.2 Régulateur du cycle cellulaire (CDKI) et le cancer

Le cycle cellulaire est un processus régulé très précisément et possédant des points de contrôle coordonnant la croissance, la division et la différenciation cellulaire. La perte de ces contrôles via la mutation de régulateurs clés de la prolifération comme les CDKI donnent un avantage significatif aux cellules.

1.2.4.2.1 La famille KIP/CIP et le cancer

Bien que les mutations inactivatrices des gènes *CDKN1A/P21* et *CDKN1B/P27* sont extrêmement rares dans les cancers chez l'homme (292-296), l'inactivation de *CDKN1C/P57* se produit par une perte d'hétérozygotie spécifiquement maternelle, une

perte d’empreinte génétique ou encore par une méthylation de son promoteur (297-301). Par contre, la protéine P27 est réprimée par d’autres mécanismes dans les tumeurs comme la dégradation protéolytique, une inhibition transcriptionnelle ou encore sa localisation cellulaire incorrecte (302).

Chez la souris, la perte de *Cdkn1a/P21* ou *Cdkn1b/P27* augmente la susceptibilité au développement de tumeurs spontanées ou induites par des carcinogènes chimiques ou par l’irradiation (303-307). Les souris *Cdkn1b*^{-/-} présentent une hyperplasie de plusieurs organes tels que le thymus et la rate (305,307,308). Par contre, les souris *Cdkn1c*^{-/-} qui survivent à la létalité périnatale due à une hyperplasie de plusieurs organes ne développent pas de tumeurs spontanées et ce, jusqu’à l’âge de 5 mois (309,310).

1.2.4.2.2 *Le locus INK4/ARF et le cancer*

Chez l’homme, l’inactivation du locus *INK4A* par des mutations ponctuelles ou des délétions sont souvent observées dans les mélanomes, les gliomes, les leucémies aiguës lymphoïdes (ALL) et les sarcomes (311-317).

Comme le locus *Ink4a/Arf/Ink4b* code pour les protéines P15, P16 et ARF, certaines de ces mutations ne ciblent que *P16* et épargnent *P15* et *Arf*. *Cdkn2b (p15)* possède son propre cadre de lecture, distinct de *Cdkn2a (p16)* et *Arf* qui possèdent différents exons 1, mais les mêmes exons 2 et 3 (Figure 1.14). Par contre, ces protéines ne possèdent aucune homologie de séquence, n’ayant pas le même cadre de lecture. Les protéines P16 et P15 agissent en tant qu’inhibiteurs des kinases CDK4/6 et de la voie RB, alors que p19/ARF est un régulateur négatif de MDM2 activant la voie de TRP53. Seulement quelques cancers comme les leucémies T-ALL montrent une haute fréquence de délétion homozygote du locus complet *INK4A/ARF/INK4B* au lieu d’une inactivation spécifique de *INK4* ou *ARF*. L’inactivation homozygote ou hétérozygote du locus de *INK4A/P16* et *INK4B/P15* est l’anomalie génétique la plus fréquente dans les leucémies T-ALL. Dans plus de 90% des

cas, ce locus est inactivé par des délétions cryptiques, une hyperméthylation des promoteurs, des mutations inactivatrices ou encore par des modifications post-traductionnelles (318). La délétion de ces gènes entraîne l'entrée non contrôlée dans le cycle cellulaire, mais aussi inactive la machinerie contrôlant l'apoptose et les points de contrôle du cycle cellulaire.

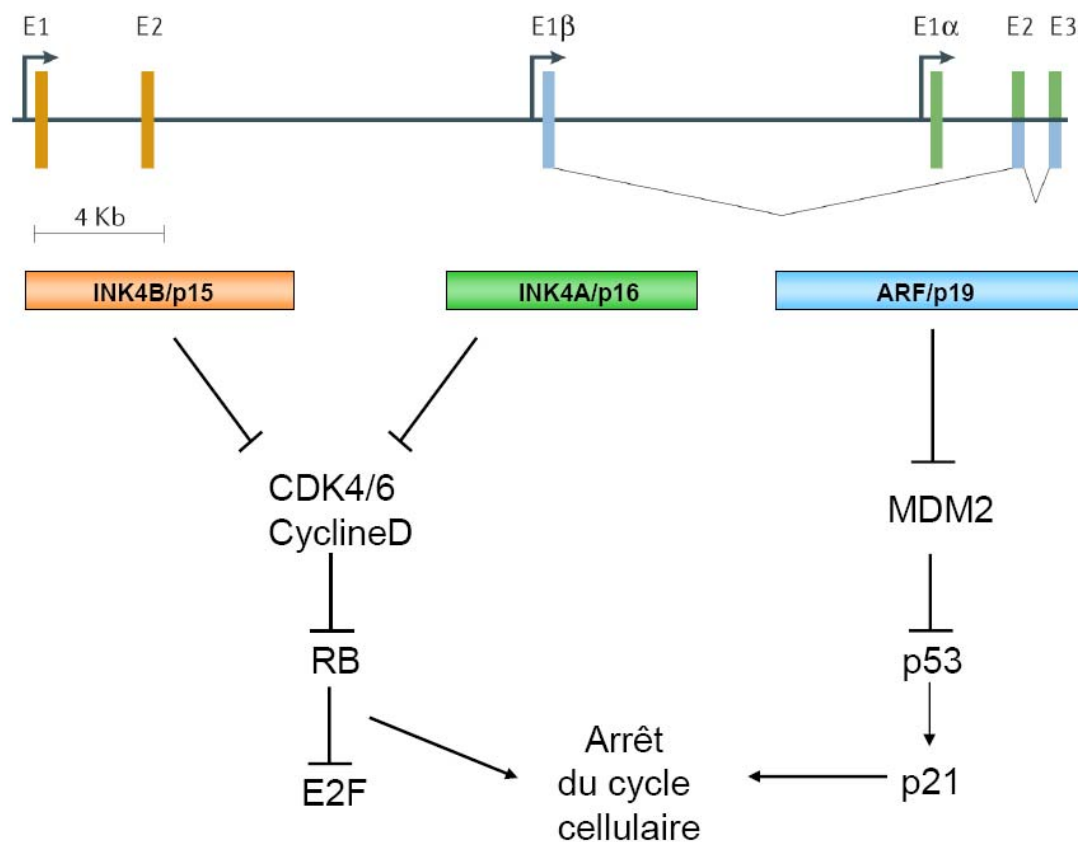


Figure 1.14 Le locus *Ink4a-Arf-Ink4b*.

Le locus *Ink4a-Arf-Ink4b* code pour deux gènes, *Cdkn2a* et *Cdkn2b*. Le gène *Cdkn2b* code pour la protéine INK4B/P15, alors que le gène *Cdkn2a* code pour les protéines INK4A/P16 et ARF/P19 selon un épissage alternatif différent. Les protéines INK4B/P15 et INK4A/P16 inhibent les kinases CDK4-6 empêchant la phosphorylation des protéines RB ce qui cause l'inhibition des facteurs E2F et un arrêt du cycle cellulaire. La protéine ARF inhibe l'ubiquitine ligase MDM2 empêchant la dégradation de TRP53. Cette activation de TRP53

induit CDKN1A/P21 qui cause un arrêt de la prolifération cellulaire. Adapté avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer (319), copyright 2000.

Alors que les souris *Ink4a/P16*^{-/-} possèdent des taux faibles de développement de tumeurs spontanées (320,321), les souris *Arf*^{-/-} sont susceptibles aux tumeurs (321,322). La perte simultanée de *Ink4a/P16* et *Arf* cause une augmentation de la susceptibilité au cancer, démontrant une synergie entre la perte de *Ink4a/P16* et de *Arf* dans l'induction du cancer. De plus, la perte de *Ink4b/P15* en plus de *Ink4a* ou de *Ink4a* et de *Arf* augmente significativement la fréquence d'apparition de tumeurs (323). De plus, la surexpression du locus *Ink4a/Arf/Ink4b* chez la souris entraîne une résistance au développement de cancer, leurs cellules présentant une résistance accrue à l'immortalisation et la transformation oncogénique (324).

1.2.4.2.3 La famille TRP53 et le cancer

La voie de ARF-MDM2-P53 est un mécanisme central de surveillance des tumeurs, puisqu'il s'agit d'un point de contrôle d'intégrité génomique. Cette voie est détruite dans une majorité de cancers. Plus de 50% des cancers humains possèdent des mutations inactivatrices dans le locus de *TRP53* (p53) et un autre 20% montrent une répression de son activité par d'autres mécanismes comme des mutations dans d'autres effecteurs de la voie tels que par des amplifications de *HDM2* (homologue humain de *Mdm2*) ou l'inactivation de *ARF*. Par contre, *HDM2* est retrouvé muté dans seulement 10% des leucémies (325). La fonction de *TRP53* en tant que suppresseur de tumeur est aussi inhibée par l'augmentation de l'activité de ses inhibiteurs comme *MDM2*, *MDMX* et *IASPP* ou encore par la diminution de l'activité de ses activateurs comme *ARF*, *ASSPP1*, *ASPP2*, *ATM* ou *P300*.

Contrairement à TRP53, TRP63 n'est pas muté (280,326), mais souvent surexprimé et amplifié dans les cancers (327-330). Seul l'isoforme $\Delta Np63$ est spécifiquement surexprimé dans différents cancers dû à une amplification génique (331,332), alors que la perte d'expression spécifique de TAp63 est observée dans certains cancers (332). Ceci est dû au rôle suppresseur de tumeur de TAp63 et à la fonction oncogénique de $\Delta Np63$ (333).

Alors que les souris *Trp63*^{-/-} montrent une létalité périnatale due à des défauts sévères au niveau cranio-facial, des membres et du développement épithélial, les souris *Trp63*^{+/-} développent des tumeurs spontanées (334). De plus, les souris *Trp63*^{+/-}*Trp73*^{+/-} montrent un phénotype plus agressif et un spectre plus important de tumeurs distinct de celui observé chez les souris *Trp53*^{+/-}. Ainsi TRP53, TRP63 et TRP73 exercent tous une activité de suppresseur de tumeur, mais dans des tissus distincts. De plus, TRP63 et TRP73 coopèrent avec TRP53, puisque la survie des souris *Trp53*^{+/-}*Trp63*^{+/-} et *Trp53*^{+/-}*Trp73*^{+/-} est dramatiquement diminuée (335).

Ainsi les oncogènes et les gènes suppresseur de tumeur ont été identifiés par plusieurs approches complémentaires d'analyse de tumeurs chez l'homme tels que l'analyse karyotypique combinée au séquençage et des études fonctionnelles de transformation cellulaire, ainsi que l'identification des sites communs d'intégration rétrovirale chez la souris. Le mégaséquençage ouvre maintenant la possibilité d'identifier l'ensemble des anomalies génétiques dans les cellules tumorales (336,337). Cependant, les mécanismes et les voies génétiques par lesquelles ces gènes affectent l'ensemble des propriétés d'une cellule normale et induisent une transformation leucémique restent à définir.

1.3 Objectifs de la thèse

Comme présenté dans l'introduction, les oncogènes SCL (Stem cell leukemia) et LMO1/2 (LIM only protein) sont fréquemment activés dans les leucémies des cellules T chez l'enfant (T-ALL). Notamment, ces oncogènes induisent des leucémies T et non des leucémies B. L'induction de la leucémie T-ALL chez la souris requiert une collaboration

entre SCL et son partenaire LMO1 ou 2. L'expression ectopique de ces deux oncoprotéines dans un modèle de souris transgénique induit un blocage de la différenciation des lymphocytes T suivie deux mois plus tard d'une leucémie agressive qui reproduit la maladie humaine. Ces protéines sont des facteurs de transcription pouvant agir transcriptionnellement sur différents gènes cibles pour transformer les programmes normaux thymocytaire. Tel qu'exposé précédemment, ces protéines affectent différentes propriétés normales d'une cellule comme la différenciation normale des lymphocytes T, mais le mécanisme utilisé reste à être identifié. Le but de cette thèse était de déterminer les voies génétiques qui collaborent avec les oncogènes SCL et LMO1 pour induire la leucémie T.

Par une approche ciblée, j'ai montré que l'expression anormale de ces gènes dans le thymus altère la différenciation des lymphocytes T en inhibant la fonction des facteurs de transcription E2A et HEB sur l'expression du pT α , un gène cible direct du complexe E2A-HEB (Chapitre 2). Par une analyse globale de l'expression génique de cellules primaires surexprimant ces oncogènes, couplée à une approche génétique et moléculaire, j'ai pu identifier de nouvelles cibles transcriptionnelles de SCL et de ses partenaires protéiques E2A et HEB, révélant la fonction de suppresseurs de tumeurs de E2A et HEB, en plus de montrer que ces oncogènes bloquent la différenciation des cellules T en inhibant l'activité des facteurs de transcription E2A et HEB. (Chapitre 3). Par des études génétiques, j'ai mis en évidence la collaboration entre les oncogènes SCL et LMO1 et la voie de signalisation normale du pré-TCR. Celle-ci représente un évènement facilitateur dans l'induction de la leucémie qui agit dans la même voie génétique que NOTCH1. Cette collaboration entre les oncogènes SCL et LMO1 et les voies de signalisation comme la voie du pré-TCR et de Notch1 qui spécifient le destin cellulaire T pourrait expliquer la spécificité cellulaire de la leucémie induite par les oncogènes SCL et LMO1 (Chapitre 4). L'analyse transcriptomique globale, ainsi que l'analyse cellulaire des cellules au stade pré-leucémique m'a permis de découvrir que SCL et LMO1 induisent une réponse cellulaire au stress de sénescence. De

plus, le contournement des mécanismes de sénescence semble être important au développement de la leucémie (Chapitre 5). En somme, mon étude des mécanismes d'action des oncogènes SCL et LMO1 m'a permis d'identifier les voies ciblées par ces oncogènes, ainsi que de nouveaux événements collaborateurs importants pour la transformation par ces oncogènes.

2 Regulation of pT α gene expression by a dosage of E2A, HEB and SCL

Tremblay, Mathieu^{*}; Herblot, Sabine^{*}; Lécuyer, Eric^{*} and Hoang, Trang^{*†}

Article publié dans Journal of Biological Chemistry (2003) 278, 15, 12680–12687.

2.1 Contribution des co-auteurs

M.T.: Design expérimental, réalisation des expériences et analyse des données et rédaction du manuscrit.

S.H : Design expérimental, réalisation des expériences (Figure 2.1B, 2.3B et 2.8) et analyse des données et rédaction du manuscrit.

E.L: Réalisation des expériences (Figure 2.3A).

T.H : Design expérimental, analyses et rédaction du manuscrit.

2.2 Summary

The expression of the pT α gene is required for effective selection, proliferation and survival of β TCR-expressing immature thymocytes. Here, we identify two phylogenetically conserved E-boxes within the pT α enhancer sequence that are required for optimal enhancer activity and for its stage-specific activity in immature T cells. We show that the transcription factors E2A and HEB associate with high affinity to these E-boxes. Moreover, we identify pT α as a direct target of E2A-HEB heterodimers in immature thymocytes since they specifically occupy the enhancer *in vivo*. In these cells, pT α mRNA levels are determined by the presence of one or two functional *E2A* or *HEB* alleles. Furthermore, E2A/HEB transcriptional activity is repressed by heterodimerization with SCL, a transcription factor that is turned off in differentiating thymocytes exactly at a stage when pT α is upregulated. Taken together, our observations suggest that a dosage between E2A, HEB and SCL determines pT α gene expression in immature T cells.

2.3 Introduction

The development of $\alpha\beta$ T cells from multipotent progenitors is a complex and multistep process that is critically dependent on genetic recombination and extracellular signals. Maturation of recent thymic immigrants from bone marrow derived precursors is characterized by the sequential expression of the pre-TCR¹ complex and of several surface markers including CD4 and CD8 (1). Within the CD4/CD8 double negative (DN) population, cell survival, cell proliferation and β allelic exclusion as well as the subsequent transition to the more mature CD4/CD8 double positive (DP) stage (2) are critically dependent on pre-TCR signaling(3). The pre-TCR is formed by the association of a correctly rearranged β TCR chain with the invariant pT α chain and signaling molecules of the CD3 complex. Since expression of the pre-TCR is critical for $\alpha\beta$ T cell differentiation, dissecting the molecular program that drives the expression of its components is of particular interest to understand the transcriptional regulation of early T cell development.

Recently, the promoter and the enhancer sequences of the pT α gene have been cloned (4) and partially characterized (5-8). A 250 bp enhancer element located 4 kb upstream of the initiation site is necessary and sufficient for specific expression of the pT α gene in immature DN thymocytes in transgenic mice (5). Several transcription factors have been shown to regulate enhancer activity, including c-myb, and the activated form of Notch (5-7). We have previously observed that the bHLH transcription factor, HEB, plays a critical

role in the regulation of pT α expression (9). The E2A and HEB genes encode class I basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors, also called E-proteins (E12-E47 and HEB, respectively), that bind specific DNA sequences (E-box, CANNTG) as homo- or heterodimers. E-protein function is essential for T and B cell development as revealed by gene targeting experiments or expression of dominant negative molecules, such as Id factors or the SCL-oncogene (9-15). E2A and HEB deficient mice, as well as Id or SCL-LMO1 transgenic mice display a T cell differentiation defect characterized by a partial differentiation block at the DN to DP transition associated with thymic atrophy (9,16-18). Our previous study revealed that the partial differentiation block of SCL-LMO1 transgenic thymocytes is, at least in part, due to decreased pT α gene expression in immature DN thymocytes (9). SCL is a tissue-specific bHLH transcription factor that forms heterodimers with E-proteins and acts as a transcriptional activator or repressor, depending on the cellular context (9,18-23). SCL expression is detected in primitive DN thymocytes, and it is normally shut off during T cell differentiation (9). Enforced SCL expression, in combination with its nuclear partner LMO1, inhibits E-protein function during early thymopoiesis (9) and subsequently leads to leukemogenesis (18,24-26).

The mechanism through which bHLH factors regulate pT α expression remains to be documented. Here, we provide evidence that E2A-HEB oligomers determine pT α mRNA levels in DN thymocytes *in vivo*, through direct binding to two conserved E-boxes of the

upstream enhancer. The effect is tightly dose-dependent and is disrupted by heterodimerization with SCL.

2.4 Experimental procedures

Cell lines, cell culture and mice

The DN T cell line AD10.1 was cultured in IMDM (Invitrogen, Burlington) containing 10 % inactivated fetal calf serum (FCS) and 50 μ M β -mercaptoethanol. The parental cell line was retrovirally infected with MSCV-empty or MSCV-SCL expressing vector and stable transfectants were kept under neomycine selection (1mg/ml). For the detection of SCL protein, nuclear extract were analyzed by Western blot using the anti-SCL mouse monoclonal antibodies BTL73 and BTL136 (generously provided by Dr. D. Mathieu-Mahul, Institut de Génétique Moléculaire, Montpellier) and an anti-Sp1 rabbit polyclonal antibody (Geneka Biotechnology Inc., Montreal), as control for loading.

E2A^{+/-} and HEB^{+/-} mice were kindly provided by Dr. Y. Zhuang (Duke University Medical center, Durham, NC) (27-29) and bred with C57Bl6/J mice for more than 3 generations. Heterozygous animals were crossed to get homozygous knockout mice and all the litters were genotyped by PCR as described (27,28). CD3 ϵ ^{-/-} mice (C57Bl6/J) were kindly provided by Dr. B. Malissen (Centre d'Immunologie INSERM-CNRS de Marseille-Luminy, Marseille) (30). Animals were maintained under pathogen free conditions according to institutional animal care and use guidelines.

FACS analysis and cell sorting

Thymi were removed from newborn, one-week or two month old mice. Single cell suspensions and immunostaining were performed as previously described (9). Thymocytes were stained with anti-CD4 (H129.19), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD25 (7D4), anti-CD44 (IM7), anti-CD3 ϵ (145-2C11), anti- β TCR (H57-597), anti-TCR $\gamma\delta$ (GL3) (PharMingen BD Biosciences, San Jose) and/or anti-Thy1.2 (30-H12) (Sigma, St-Louis) antibodies. Four-colour immunofluorescence analyzes were performed on Moflo flow cytometer (Cytomation, Denvers) or FACStar flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose) using

dual laser excitation. When cell sorting was performed, 10,000 cells were collected in RNA lysis buffer.

RNA preparation, cDNA synthesis and PCR amplification

Total RNA was prepared according to Chomczynski and Sacchi's protocol (31), using tRNA as carrier for ethanol precipitation. First strand cDNA synthesis and specific PCR was performed as described (9). cDNA samples were 2-fold diluted in 1X PCR buffer and 2 μ l were added in the PCR mixture containing 1 μ M of each specific 5' and 3' primers, 1 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂ and 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Burlington). Primer sequences are available upon request. Twenty eight (pT α , E2A and HEB) or twenty-two (S16) cycles of amplification were performed and 10 μ l of each reaction were loaded on a 1.2% agarose gel, transferred on nylon membranes (Biodyne B, Pall Corporation, Ann Arbor) and hybridized with the corresponding internal oligonucleotide probes. The hybridization signals were analyzed on a PhosphorImager apparatus (Molecular Dynamics Amersham Biosciences, Sunnyvale).

SyberGreen quantitative PCR was performed on a Mx4000 apparatus (Stratagene, La Jolla) according to manufacturer's instructions. One microliter of cDNA sample were added in the PCR mixture containing 0.5 μ M (pT α , E2A and HEB) or 1 μ M (S16) of each specific 5' and 3' primers, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 6% glycerol, 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Burlington) in a final volume of 20 μ l. SyberGreen quantitative dye and Rox passive dye (Molecular Probes, Eugene) were added to the mixture. Forty cycles of amplification were performed, followed by 38 cycles of denaturation-annealing steps. Amplification plots and dissociation curves were analyzed with the Mx4000 (Stratagene, La Jolla) and Excel (Microsoft, Redmond) softwares.

Constructs, expression vectors and transfection assays

The pT α enhancer element (0.25 kb BstEII-MluNI fragment), a gift from Dr. P. Leder (Harvard Medical School, Boston, Massachusetts) (4), was subcloned upstream of a minimal TATA promoter into the pXpIII vector (19). Mutations of E-box elements were performed by PCR and all constructs were subsequently sequenced. Transactivation assays were performed by electroporation as previously described (9). CMV- β gal (Clontech BD Biosciences, San Jose) was added in all samples as internal control for transfection efficiency. Cells were harvested 36h after transfection and luciferase activity was assayed using a Berthold LB953 luminometer. β -galactosidase assays were performed using o-Nitrophenyl β -D-Galactopyranoside as a substrate in 96-well flat-bottomed plates for 20 minutes and optical density (OD) at 405nm was measured. The results shown are the mean \pm SD normalized for the β -galactosidase activity of one experiment performed in duplicate and representative of 3 to 5 experiments.

Western blot assays

Protein expression of E47 and HEB were analyzed by Western blot in nuclear extract from wild type bone marrow and WT and CD3 ϵ ^{-/-} thymus using the anti-E47 rabbit polyclonal antiserum N-649 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz), the anti-HEB rabbit polyclonal antiserum (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz) and an anti-PTP-1D mouse monoclonal antibody (BD Biosciences, San Jose), as loading control. For the detection of SCL protein, Western blot of nuclear extract from AD10.1-MSCV, AD10.1-SCL cell lines were done using the anti-SCL mouse monoclonal antibodies BTL73 and BTL136 (generously provided by Dr. D. Mathieu-Mahul, Institut de Génétique Moléculaire, Montpellier) and an anti-Sp1 rabbit polyclonal antibody (Geneka Biotechnology Inc., Montreal), as control for loading.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Nuclear extracts were prepared from AD10.1, AD10.1-MSCV or AD10.1-SCL cell lines as previously described (20). We used 8 μ g of nuclear extracts per binding reaction containing

100 ng of poly(dI-dC) in 20 mM Hepes (pH 7.5), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 5% glycerol and 10 μ g de BSA. For competition assays, 1- to 100-fold molar excess of unlabeled oligonucleotides were added and the mixture was kept on ice for 30 minutes before adding 50,000 cpm of double-stranded oligonucleotide probe. Supershift assays were performed with 2 μ g of the following antibodies: anti-E2A mouse monoclonal antiserum YAE (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz), anti-HEB rabbit polyclonal antiserum (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz), anti-SCL mouse monoclonal antibodies BTL73 and BTL136 (provided by Dr. D. Mathieu-Mahul, Institut de Génétique Moléculaire, Montpellier) and a control anti-myc antibody. Protein-DNA complexes were resolved by 4% PAGE in 0.5 \times Tris-Borate-EDTA at 150 V, at 4°C. All EMSA experiments were performed with an excess of probe. Oligonucleotide sequences used in EMSA experiments are available upon request.

ChIP assays

Chromatin immunoprecipitations were performed essentially as described previously (19,32,33). Twenty million of AD10.1-MSCV, AD10.1-SCL or CD3 $\epsilon^{-/-}$ primary thymocytes cells were fixed by adding 1% formaldehyde to the culture media for 10 min at room temperature. Formaldehyde was then quenched by addition of 0.125 M glycine. Subsequent steps were performed at 4°C. Fixed cells were pelleted by centrifugation, washed twice in cold PBS, then washed once in Triton buffer for 15 min (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.25% Triton X-100) and once in NaCl buffer for 15 min (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 200 mM NaCl). Cells were pelleted, resuspended in RIPA buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% deoxycholate) and sonicated (7 \times 10 sec bursts) to make soluble chromatin ranging in size from 500 to 1000 bp. Cellular debris were removed by centrifugation (16000 g for 10 min) and protein concentrations were determined by Bradford staining. Aliquots were reserved for isolation of input DNA, while 1 mg of chromatin extract was incubated overnight at 4°C with specific antibodies: anti-

E47 rabbit polyclonal antiserum N-649 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz), anti-HEB rabbit polyclonal antiserum (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz), anti-SCL mouse monoclonal antibodies BTL73 and BTL136 (provided by Dr. D. Mathieu-Mahul, Institut de Génétique Moléculaire, Montpellier), anti-rabbit IgG (Sigma, St-Louis) and anti-HA mouse monoclonal antisera (Covance, Princeton). DNA-protein complexes were immunoprecipitated with pansorbin[®] cells (Calbiochem, San Diego) for 30 min at 4°C, then, pansorbin[®] cells were sequentially washed twice with 1 ml of RIPA buffer containing 500 mM of NaCl, twice with 1 ml of LiCl buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% deoxycholate) and twice with 1 ml of TE buffer. Chromatin samples were then eluted by heating for 15 min at 65°C in 300 µl of elution buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA, 1% SDS). After centrifugation, supernatants were diluted by addition of 300 µl of TE buffer and heated overnight at 65°C to reverse crosslinks. RNA and proteins were sequentially degraded by addition of 30 µg of RNase A for 30 min at 37°C, and 120 µg of proteinase K for 2-3 h at 37°C. DNA was phenol/chloroform extracted and ethanol precipitated in presence of 10 µg of tRNA as a carrier. DNA samples were resuspended in 30 µl of water, serially diluted and 30 cycles of amplification were performed using specific primers for pT α enhancer, pT α promoter and HPRT promoter. Oligonucleotide sequences are available upon request. One fifth of PCR products were loaded on a 1.2% agarose gel, transferred on Biodyne B membrane (Pall Corporation, Ann Arbor), hybridized with internal oligonucleotide probes and analyzed on a PhosphorImager apparatus (Molecular Dynamics Amersham Biosciences, Sunnyvale).

2.5 Results

2.5.1 E2A and HEB deficient mice express decreased level of pT α mRNA

The essential role of E-proteins during T cell development has been revealed by gene targeted disruption of the E2A and HEB genes in mice (9,14-18,34,35). As shown in Figure 2.1B, E2A and HEB deficient mice have an increased percentage of immature DN thymocytes and a decreased number of total thymocytes indicating a partial block of T cell differentiation at the DN to DP transition step, a critical check point controlled by the pre-TCR. Differentiation of TCR $\gamma\delta$ lineage thymocytes were analyzed in E2A^{+/-} and HEB^{+/-} mice and wild type littermates. We show that the percentage TCR $\gamma\delta$ ⁺ thymocytes in the immature DN subsets of E2A or HEB heterozygote mice is similar to that of wild type littermates (Figure 2.1C). Thus, differentiation in the $\gamma\delta$ lineage is unaffected, despite reduced levels of both E2A and HEB in heterozygous mice (Figure 2.2A). We have previously reported that HEB deficiency is associated with a decreased level of pT α mRNA in DN thymocytes (9). Since E2A also controls the DN to DP transition, we assess here the role of E2A *in vivo* in regulating pT α expression, as compared to that of HEB. We therefore used semi-quantitative and real time PCR to investigate pT α mRNA level in E2A and HEB deficient mice, as well as in heterozygous and wild type littermates. Immature DN and DP thymocyte populations were purified by flow cytometry according to their surface expression of CD4, CD8, β TCR and Thy1.2 markers. Within the DN compartment, we observed a 3 and 5-fold decrease of pT α mRNA level in E2A deficient thymocytes as

compared to wild type controls by semi-quantitative RT-PCR and real time PCR, respectively (Figure 2.2C and D). Similarly, HEB deficient DN thymocytes show a 2 to 3-fold decrease in pT α , as described previously (9). Interestingly, E2A and HEB heterozygous DN thymocytes expressed, on average, intermediate levels of pT α mRNA as compared to wild type and null DN thymocytes, despite some variations between animals. This decrease is in direct correlation with the decreased E2A or HEB mRNA levels observed in total thymi of heterozygous mice (Figure 2.2A). Moreover, decreased pT α mRNA levels were not due to an increase in $\gamma\delta$ T cells, since the percentage of CD3 ϵ^+ TCR $\gamma\delta^+$ cells in wild type and heterozygous mice is not significantly different. For this reason, we observed the same decrease in pT α mRNA level, even when TCR $\gamma\delta^+$ cells were excluded from analysis (Figure 2.2E). Despite this lower level of pT α , T cell differentiation in heterozygous mice was not impaired as assessed by flow cytometry analysis, but the total numbers of thymocytes were slightly lower and were on average 60% (n=4) of that of wild type littermates (Figure 2.1B). The observation is in agreement with the reduced E2A and HEB mRNA levels observed in heterozygous mice (Figure 2.2A) and reveals that E2A and HEB are haploinsufficient in the thymus. Finally, E2A deficiency did not affect pT α levels in the more mature DP thymocytes, while HEB deficiency consistently impaired its expression. Together, these results indicate that E2A and HEB gene dosage plays an important role in regulating pT α expression specifically at the immature DN stage and suggest that E2A and HEB might have overlapping as well as distinct function during T cell development.

2.5.2 E2A and HEB gene products bind the pT α enhancer *in vivo* in DN3 thymocytes

The expression of the pT α gene is directed by a promoter and a 5' enhancer, both containing multiple E-protein binding sites (E-box) (4,5). Since E2A and HEB deficiency leads to decreased pT α expression, we addressed the question whether these proteins associate with pT α regulatory sequences in primary thymocytes *in vivo*. We therefore performed chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) using primary thymocytes. Within the DN subset, thymocyte maturation can be followed according to the sequential expression of CD44 and CD25 molecules (1), thus identifying 4 sub-populations (DN1 to DN4), as described in Figure 2.1. Since the pT α gene is expressed at the DN3 and DN4 stages, we used thymocytes from CD3 $\epsilon^{-/-}$ mice that are arrested at the DN3 stage due to the lack of a pre-TCR signal (30,36,37). E2A and HEB protein expression assessed by Western blotting were higher in these thymocytes as compared to wild type thymocytes, that contain essentially cells at the DP stage, or to bone marrow cells (Figure 2.3C). Crosslinked chromatin extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation using specific antibodies against E2A and HEB, as well as an isotype matched control antibody (rabbit IgG). After immunoprecipitation, decrosslinking and purification, serial dilutions of DNA templates were used for PCR amplification using oligonucleotide primers flanking the pT α enhancer regions (Figure 2.3A). Since, gel shift assays revealed that HEB could bind E-boxes located within the pT α promoter sequence (5,8), we also used oligonucleotides flanking the promoter region (Figure 2.3A). As shown in Figure 2.3B, anti-E47 and anti-

HEB antibodies efficiently immunoprecipitated the pT α enhancer sequence as well as the pT α promoter sequence, whereas little or no background was observed with a control antibody. The specificity was further confirmed by the absence of amplification of an irrelevant promoter sequence, the HPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) promoter that is not regulated by E2A or HEB.

2.5.3 Functional importance of two E-box binding sites within the pT α enhancer

It has been previously reported that the pT α enhancer element is essential for specific pT α expression in immature DN thymocytes (4,5). This enhancer element contains potential binding sites for different transcription factors (YY1, ZBP-89, Sp1, c-Myb and CSL) and particularly four E-boxes (Figure 2.4A). We therefore cloned the pT α enhancer sequence upstream of a minimal TATA promoter and the luciferase reporter gene and confirmed that the enhancer is active in the pT α ⁺ “immature” T cell line AD10.1 but not in the “mature” T cell line Jurkat nor in fibroblast cell lines (data not shown). In order to determine the importance of E-boxes in driving enhancer activity in the immature DN AD10.1 cell line, each of the four E-box sites was mutated individually or in combination. As shown in Figure 2.4B, mutation of either E2 or E3 sites induced a 3 to 4-fold decrease of pT α enhancer activity, while simultaneous mutations of these two sites abolished enhancer activity. The E1 site seems to play a weaker role in transcriptional activity since its mutation modestly affected enhancer activity when E2 and E3 were intact. However, E1 mutation combined with E2 or E3 mutations further decreased enhancer activity, revealing

its potential role as a positive regulator when E2 or E3 were mutated. Interestingly, mutation of the E4 site induced a 2 to 3-fold increase of enhancer activity, either alone or in combination with E1 or E3 mutations, suggesting that it negatively regulates enhancer activity. Sequence comparison indicates that E2 and E3 sequences (CACCTG) match with the E47 and HEB consensus sequences (Figure 2.4C), while the E4 sequence (CACGTG) differs, suggesting that this site might bind a different factor endowed with repressive activity (Figure 2.4C). Together, these results indicate the importance of E-box binding sites for optimal pT α enhancer activity.

We have previously reported that ectopic SCL expression in immature thymocytes represses the expression of the endogenous pT α gene and that HEB overexpression rescues pT α enhancer activity (9). Using the real time PCR technique, we show here that ectopic SCL expression in AD10.1 cells (Figure 2.5A) induced a 3-fold decrease of endogenous pT α mRNA level (Figure 2.5B), and this decrease was confirmed by semi-quantitative RT-PCR (Figure 2.5C) (9). Furthermore, this lower mRNA level is in direct correlation with a 3 to 4-fold decrease of the pT α enhancer activity as measured by transient transfection assays (Figure 2.5D). To test whether SCL-mediated repression depends on E-protein function, we transiently expressed reporter constructs containing wild type or mutated E-box sites together with the SCL expression vector. As shown in Figure 2.5D, SCL decreased pT α enhancer activity to the same extent as mutations of either E2 or E3 binding sites. Moreover, enforced SCL expression did not further decrease the activity of E2 or E3-mutated constructs. On the opposite, SCL overexpression was still able to repress enhancer

activity when E4 was mutated. Together, these results demonstrate that SCL mediated repression of the pT α enhancer activity requires the integrity of the two E-box binding sites, E2 and E3, suggesting that SCL directly represses E-protein function.

2.5.4 E2A and HEB gene products, as well as SCL-containing complexes bind E-box elements of the pT α enhancer *in vitro*

E-box mutations or SCL-induced repression of the pT α enhancer activity indicate the crucial role of E-proteins in regulating pT α gene expression. Since E2A or HEB occupy the pT α enhancer in DN thymocytes, we addressed the question whether E2A or HEB gene products directly bind E-boxes within the pT α enhancer. We therefore performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA) using nuclear extracts prepared from AD10.1 cells and specific oligonucleotide probes that cover the E2 or E3 binding sites. Figure 2.6A illustrates the binding of a slowly migrating complex (C1) on both the E2 and E3 probes. Supershift assays using specific antibodies identified the E2A and HEB gene products as components of this C1 complex (Figure 2.6B, lanes 2-4, 7-9), while an isotype matched control antibody did not affect the mobility of the E2 and E3 binding complex (Figure 2.6B, lanes 5 and 10). In addition, when nuclear extracts from SCL-expressing AD10.1 cells were used, we observed a faster migrating complex (C2, Figure 2.6A) containing E2A-SCL and HEB-SCL heterodimers as revealed by supershift assays using specific antibodies against E2A, HEB and SCL (Figure 2.6B, lanes 11-20). Together, these results demonstrate that E2A-HEB heterodimers bind *in vitro* the E2 and E3 sequences and

suggest that SCL repression of E-protein activity is mediated by DNA binding of E2A-SCL or HEB-SCL heterodimers to the same sites on the pT α enhancer sequence.

The specificity and the relative affinities of E2A-HEB and SCL-containing complexes for E-box binding sites were tested by competition assays using increasing amounts of unlabelled double stranded oligonucleotides (Figure 2.6C). Both E2 and E3 competitors efficiently displaced E2A-HEB heterodimers and SCL-containing complexes binding to DNA (lanes 3-6, 13-16). In contrast, mutations within E3 (lanes 7-10) and E2 (data not shown) sequences disrupted DNA binding as these competitors failed to displace E-protein complex formation. Interestingly, higher concentrations of E1 or E4 competitors are required to displace E2A-HEB heterodimer formation on either E3 (lanes 20-27) or E2 probes (data not shown). The relative levels of binding of E2A-HEB or SCL-containing complexes to these E-box sequences were E3 > E2 > E1 > E4. Analysis of dissociation constants indicates a 70-fold difference in binding affinities between E3 and E4 sequences. Interestingly, both E3 and E2 sequences conform to E47 (38) and HEB (39) consensus sequences while E4 does not (Figure 2.4C). These relative binding affinities are in agreement with our transactivation assays showing that E1 has a weaker contribution to enhancer activity as compared to E2 and E3, and that E4 is a negative regulator (Figure 2.4).

2.5.5 SCL-containing complexes bind the pT α enhancer *in situ*

To test whether SCL associates with pT α regulatory sequences *in situ*, we performed chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) on stable AD10.1 transfectants, expressing either the empty MSCV vector or the MSCV-SCL encoding vector (Figure 2.7). Using specific antibodies against E47 (E2A), HEB and SCL, as well as isotype matched control antibodies (anti-HA and rabbit IgG), we were able to show that in addition to anti-E47 and anti-HEB, the anti-human SCL antibody efficiently immunoprecipitated both the pT α

enhancer and promoter sequences when chromatin extracts from SCL expressing AD10.1 cells were used. Combined, our observations indicate that the pT α enhancer and promoter are direct targets of E2A-HEB heterodimers in immature T cells. Moreover, SCL-induced repression of E2A-HEB transcriptional activity is not due to an Id-like titration of these factors, but rather is mediated by a DNA binding dependent mechanism.

2.5.6 Relative levels of E2A, HEB and SCL determines pT α gene expression in immature thymocytes

During thymocyte maturation, T cell commitment at the DN2 stage is marked by the initiation of pT α gene expression that reaches maximal levels at the DN3 stage (Figure 2.8). Interestingly, pT α starts to be expressed at the DN2 stage, coinciding with an elevation of both E2A and HEB mRNA (Figure 2.8). This elevation, also observed at the protein level (40), is however not sufficient for optimal pT α gene expression since both E2A and HEB remain constant at the DN3 stage while pT α levels abruptly increase. We therefore investigated SCL expression in purified thymocyte populations together with E2A, HEB and pT α mRNA levels using semi quantitative RT-PCR. As shown in Figure 2.8, SCL and pT α exhibit opposite expression patterns, i.e. SCL is expressed at the DN1 and DN2 stages and is down regulated at the DN3 stage, coinciding exactly with an elevation in pT α gene expression. Taken together, our observations suggest that the relative dosage between E2A-HEB and SCL determines pT α gene expression in maturing thymocytes.

2.6 Discussion

In the present study, we show that the bHLH factors E2A and HEB drive pT α enhancer activity in immature thymocytes through high affinity binding to two conserved E-boxes, E2 and E3. Moreover, SCL inhibits E2A-HEB activity through binding to the same regulatory elements.

2.6.1 Importance of E2A-HEB in driving stage-specific activity of the pT α enhancer

During thymocyte differentiation, E47 increases at the mRNA and protein levels, determined by flow cytometry analysis, from the DN1 to DN4 stage, and start to decrease as the cells progress to the DP stage (9,40). HEB mRNA also follows the same pattern (9). Our Western blot analysis of CD3 $\epsilon^{-/-}$ thymocytes (consisting of more than 90% DN3 cells) and wild type thymocytes (more than 80% DP cells) suggests that E47 and HEB protein levels decrease at the DP stage. This expression pattern is in agreement with the stage-specific expression of the pT α gene in immature T cells that is maximal at the DN3 and DN4 stages and then decreases after β selection (41), and the finding that the pT α gene is a target of transcription regulation by E2A and HEB (7-9). More importantly, this correlation suggests that pT α levels are determined by E2A/HEB levels. In the present study, we provide direct evidence that E2A and HEB gene dosage determines pT α mRNA levels.

At the molecular level, the regulatory elements of the pT α gene have been identified and Reizis et al have shown that the pT α upstream enhancer is necessary and sufficient to drive

stage and tissue-specific expression of the pT α gene in immature thymocytes (4,5). Indeed, this regulatory sequence is inactive in transient transfection assays in non-T cells or in mature T cell lines that do not express the endogenous pT α gene (data not shown) (4). Furthermore, reporter transgenes driven by the pT α enhancer element are preferentially expressed in immature thymocytes, in a pattern closely resembling that of the endogenous pT α gene (5,42). Analysis of the pT α enhancer sequence revealed potential binding sites for several transcription factors, including ZBP89, YY1, c-myb, CSL and E-proteins. Previous reports have shown that pT α enhancer activity depends on the integrity of binding sites for c-myb and CSL, the latter a downstream effector of the Notch1 pathway (5,6). However, mutation of either c-myb or CSL binding site did not abolish enhancer activity in transgenic reporter experiments, suggesting that these transcription factors, otherwise important for optimal and stage-specific pT α expression, are not absolutely required for enhancer activity.

Here we demonstrate that in addition to c-myb and the CSL-NICD complex, E2A and HEB are critical determinants of pT α enhancer activity. Moreover, 80% of enhancer activity in a DN cell line is determined by two E-box binding sites, E2 and E3, that are conserved between mouse and man (5). Finally, we show that E2A and HEB associate with these E-boxes with high affinity *in vitro* and *in vivo*, while E4 that is not conserved (5) has a low affinity for these proteins. We therefore propose that E2A and HEB serve as nucleation factors for the assembly of a multimeric complex into an enhanceosome-like structure.

There is substantive controversy with regards to the contribution of E-boxes to pT α enhancer activity. Indeed, Reizis et al (2001) and Takeuchi et al (2001) suggested that mutations of these E-boxes did not affect enhancer activity, while Petersson et al (2002) reported the opposite. This discrepancy may be attributed to different cellular contexts used for transient transactivation assays or alternatively, to the reporter vector itself used in these experiments. Indeed, our previous work indicated that the promoterless pXpII vector, as well as other luciferase reporter vectors (pGL3 basic), contains E-boxes within or near their multiple cloning sites (19). The use of the modified pXpIII vector (19) where all E-boxes in the vicinity of the multiple cloning site were mutated has permitted us to reveal the functional importance of the conserved E-box sites on pT α enhancer activity.

Transient transactivation assays in heterologous cells indicate that E47 can activate the pT α enhancer and promoter, the latter containing a tandem E-box site previously shown to be required for full promoter activity (5,8). However, a role for E2A in activating the pT α gene in primary thymocytes has not been assessed. Using two complementary approaches, we show by chromatin immunoprecipitation that E47 binds both pT α regulatory sequences *in vivo*. Furthermore, the activity of a single E2A allele is not sufficient for full pT α gene expression, indicating that HEB does not compensate for E2A haploinsufficiency, at least with regards to the transcriptional activity of the pT α locus. Hence, E2A^{+/-} mice exhibit a 30% lower level of pT α mRNA in DN thymocytes, with variable penetrance, and a modest decrease in thymocyte numbers. Interestingly, loss of one E2A allele in the context of the HEB^{+/-} genotype exacerbates T cell differentiation defect caused by HEB

haploinsufficiency, resulting in an increase in the DN and ISP populations (28). These results revealed the importance of E2A and HEB in T cell development (28). We show here that both E2A and HEB bind the pT α regulatory sequences in chromatin and that full E2A and HEB loci activities are required for proper pT α expression. We therefore conclude that the combined dosage of E2A and HEB controls pre-TCR levels and, consequently, determines cell fate in the thymus.

2.6.2 SCL-E2A/HEB complexes occupy E-box elements within the pT α enhancer and promoter

SCL is a tissue-specific bHLH transcription factor that heterodimerizes with E47 and HEB and binds DNA at consensus E-box sequences (43,44). Furthermore, SCL shows an opposite expression profile to that of E proteins (9) and decreases from the DN1 to DN3 stage, exactly when pT α mRNA increases. We and others have previously shown that ectopic SCL expression in the thymus, in combination with its nuclear partners LMO1 or LMO2, down regulates E-protein target genes such as the CD4 and pT α genes (9,18,45). However, the molecular mechanism through which SCL represses E-protein function in thymocytes remains to be determined. SCL could either sequester E2A-HEB factors into complexes that do not bind DNA in the same way as Id proteins, HLH factors lacking a DNA binding domain. Alternatively, SCL-containing complexes could bind DNA on E-protein target sites and prevent E-protein transcriptional activity. Here we show that SCL associates with E2A or HEB and binds *in vitro* the pT α E-box sites, E2 and E3, with the same affinity as E2A-HEB heterodimers and that SCL occupies the pT α enhancer and

promoter sequences *in vivo*, as revealed by chromatin immunoprecipitation assays. Together, these results suggest that the repression induced by SCL is mediated by a DNA binding dependent mechanism rather than a sequestration effect. It remains to be determined whether SCL disrupts the formation of a transcription factor complex required for optimal enhancer activity or alternatively, whether SCL recruits new co-factors that repress pT α gene transcription. In B cell development, E2A recruits a chromatin remodeling complex at target DNA (46-48) and drives the transcription of immunoglobulin genes (29,34,49-52). It is possible that high levels of the SCL transgene are sufficient to form inactive SCL-E2A or SCL-HEB heterodimers, hampering the formation of this complex (the present study) (45). Alternatively, since SCL genetically interacts with LMO1 or LMO2 to inhibit T cell development at the DN-DP transition point controlled by the pre-TCR, it is possible that SCL recruits new co-factors that actively repress pT α gene transcription. Further protein-protein interaction studies are warranted to distinguish between these two possibilities.

In summary, we unambiguously identify the pT α enhancer and promoter sequences as direct targets of E2A-HEB heterodimers in the thymus, as well as direct targets of repression by the SCL oncogene. Moreover, we show that pT α and SCL exhibit opposite expression patterns in DN1 to DN3 subsets, indicating that SCL may regulate E-protein activity during early thymocyte development. These results, together with previous reports, suggest that the pT α enhancer is regulated by a complex combination of transcription factors including, c-myb, CSL-NICD complex and E-proteins. This unique combination

may determine the tissue and stage-specific expression of an essential component of the pre-TCR, the pT α chain, required for $\alpha\beta$ T cell development.

2.7 Figure

Figure 2.1. Perturbation of T cell development in E2A and HEB knockout mice.

A) Immunostaining of normal thymocytes reveals seven subsets according to their degree of maturity. B) Thymocytes from newborn (HEB) or one-week old (E2A) mice were stained with CD4, CD8, β TCR and Thy1.2 antibodies and sorted by flow cytometry. C) Thymocytes from newborn (E2A) or one week old (HEB) mice were stained with CD4, CD8, CD3 ϵ , TCR $\gamma\delta$ and Thy1.2 antibodies and analyzed by flow cytometry. The percentages of TCR $\gamma\delta^+$ /CD3 ϵ^+ DN thymocytes in different litters (\diamond, x : newborn; \triangle : one-week old; \blacklozenge : two months old) are shown on the right. Representative FACS profiles for wild type (WT), heterozygous (+/-) and knockout ($^{-/-}$) littermates are shown and the percentages of cells in each quadrant are indicated. The total numbers of cells per thymus are indicated in brackets.

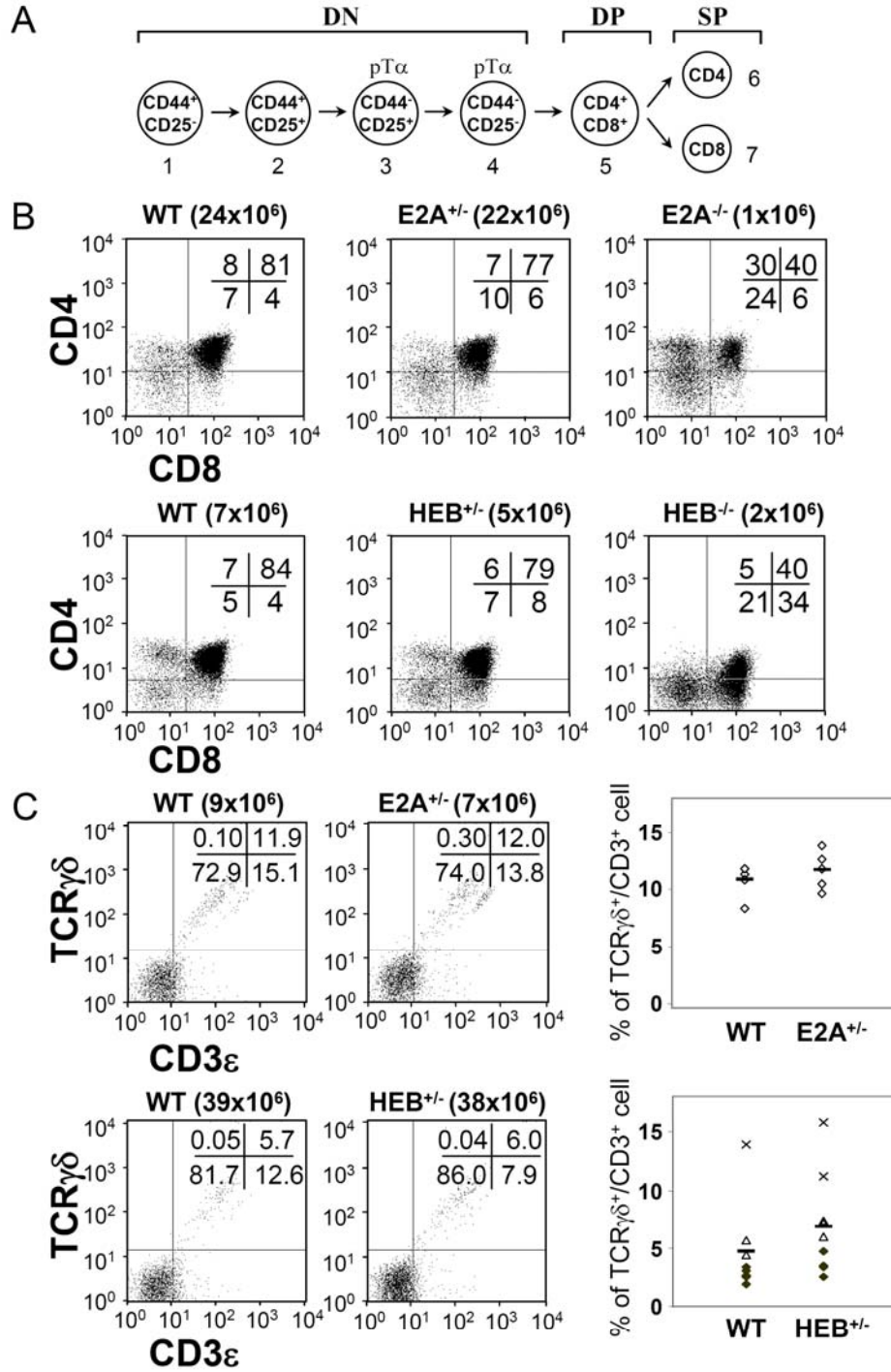


Figure 2.1

Figure 2.2. Reduction of pT α expression in DN thymocytes of E2A and HEB knockout mice.

Quantification of E2A (A) and HEB (B) gene expression in thymocytes of wild type and heterozygous littermate were performed by semi-quantitative and real time RT-PCR using specific primers for E2A, HEB and ribosomal S16 mRNA, the latter as control for the amounts of cDNA. mRNA levels are shown as percentage of wild type levels. C) Thymocytes were fractionated into two subsets according to their degree of maturity; DN (CD4⁻/CD8⁻/ β TCR⁻/Thy1.2⁺) and DP (CD4⁺/CD8⁺/ β TCR⁺/Thy1.2⁺). Semi-quantitative RT-PCR were performed on purified cell populations using specific primers for pT α and S16 (internal control). D) Real time RT-PCR were performed to quantify pT α gene expression in DN and DP cells from wild type, E2A^{+/-} and E2A^{-/-} mice. pT α amplification curves were normalized for the amount of cDNA using S16 as control. mRNA levels for heterozygous and knockout mice are 60% and 20% of wild type at the DN stage and 60% and 110% at the DP stage. E) mRNA levels of pT α were analyzed by semi-quantitative RT-PCR as described above in thymocytes of DN (CD4⁻/CD8⁻/CD3 ϵ ⁻/Thy1.2⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁻) and DP (CD4⁺/CD8⁺/CD3 ϵ ⁺/Thy1.2⁺/TCR $\gamma\delta$ ⁻) subset depleted of TCR $\gamma\delta$ positive cells of wild type and heterozygous mice for E2A and HEB. Results are shown as percentages of wild type levels.

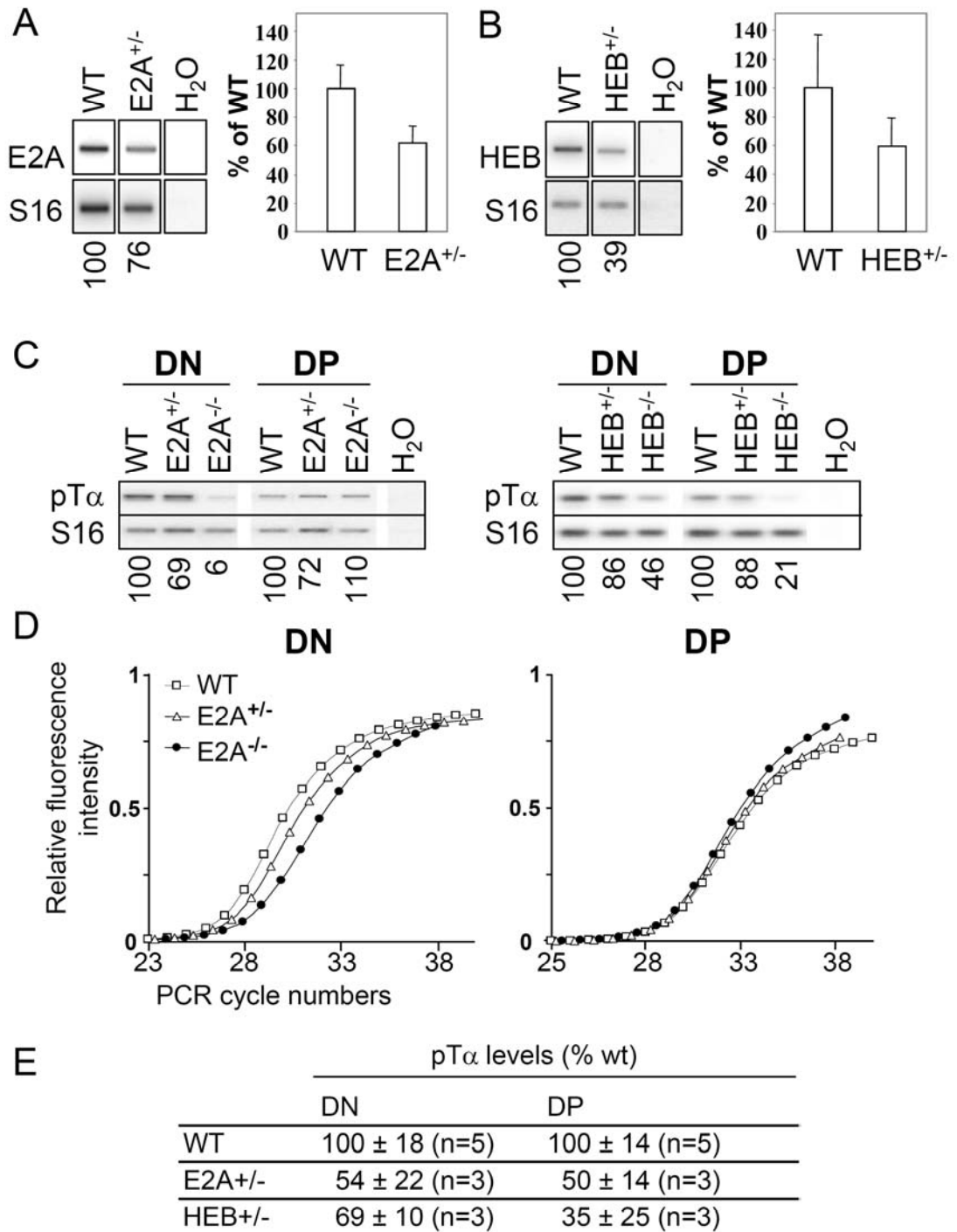
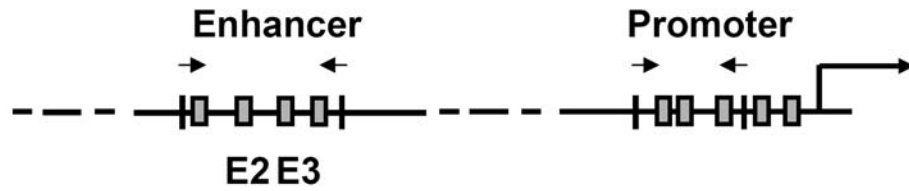


Figure 2.2

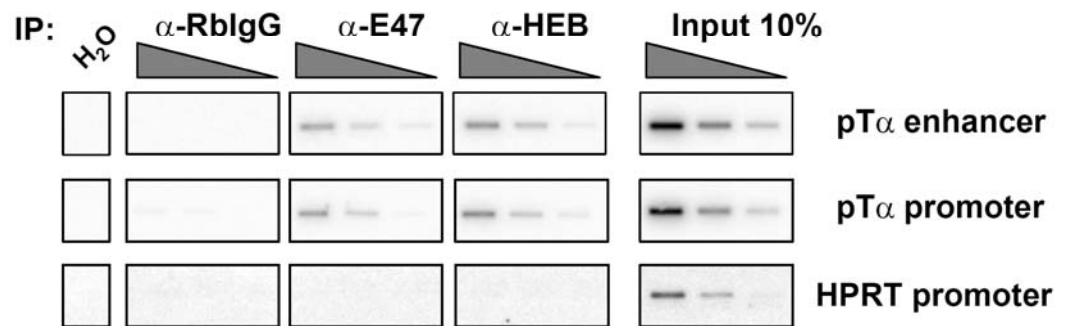
Figure 2.3. E2A and HEB specifically associate with the pT α enhancer and promoter in primary thymocyte.

A) Schematic diagram of the pT α locus: arrows show the position and orientation of primers used for ChIP assays. B) Chromatin immunoprecipitation assays were performed as described in Materials and Methods using crosslinked CD3 $\epsilon^{-/-}$ thymocytes nuclear extracts. Anti-HA and RbIgG were used as isotype matched controls for immunoprecipitations. Fivefold serial dilutions of immunoprecipitated DNA were used for amplification with specific primers for pT α enhancer and promoter regions. The HPRT promoter region was amplified as a negative control. Input chromatin served as a positive control for PCR amplification. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis, transferred onto Biodyne B membrane and hybridized with an internal oligonucleotide. C) Western blot of nuclear extract of wild type and CD3 $\epsilon^{-/-}$ thymus, wild type bone marrow and AD10.1 cell lines was performed using specific antibodies against E47, HEB and PTP-1D, the latter as control for loading.

A pT α locus:



B



C

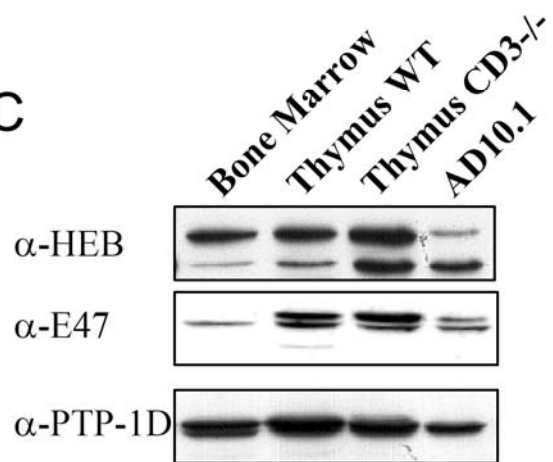


Figure 2.3

Figure 2.4. The integrity of two E-boxes is critical for pT α enhancer activity.

A) Schematic representation of the pT α enhancer showing its different binding sites. B) Point mutations of specific E-box sites impair pT α enhancer activity. The AD10.1 DN T cell line was transfected with wild type or mutant pT α enhancer constructs as shown. Results are expressed as luciferase activity relative to the minimal TATA promoter and represent the average \pm SD of replicate determinations and are representative of (n) independent experiments. Luciferase reporter activities were normalized to that of an internal control (CMV- β gal). C) Sequences of the different E-box sites within the pT α enhancer. Shown in bold are residues that match the core E47 (38) or HEB (39) consensus.

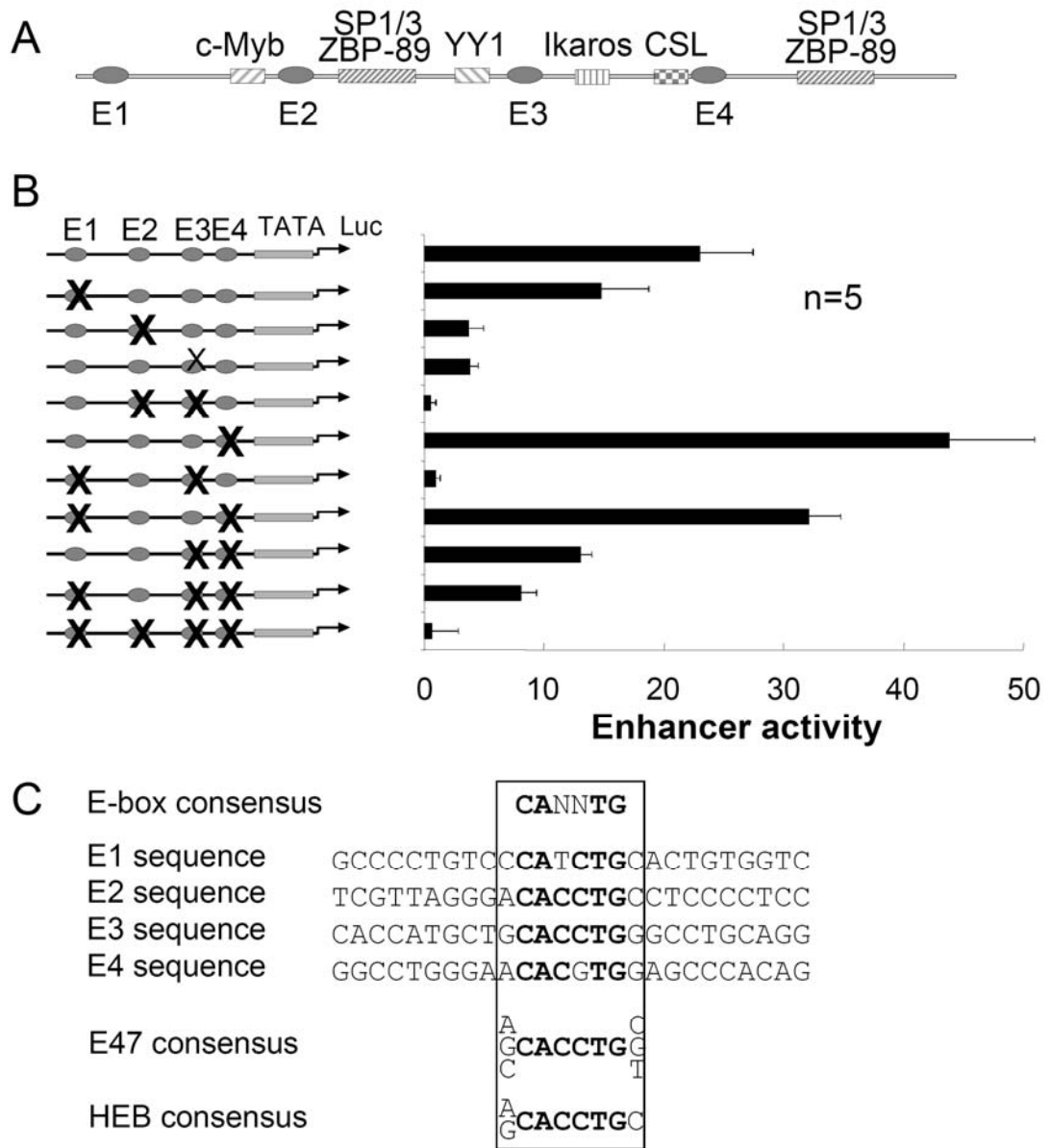


Figure 2.4

Figure 2.5. Repression of pT α enhancer activity by SCL is mediated by the E2 and E3 sites.

A) Western blot against SCL was performed using nuclear extract of AD10.1-MSCV and AD10.1-SCL cell lines, the blots were revealed using a monoclonal anti-SCL antibody, stripped and further analyzed with a polyclonal anti-Sp1 antibody, as control for loading. B) Real time RT-PCR was performed to quantify pT α mRNA levels in AD10.1-MSCV and AD10.1-SCL cell lines. Amplification curves were normalized for the amount of cDNA using S16 as control. pT α mRNA levels in AD10.1-SCL cell lines were 30% of that obtained in the AD10.1-MSCV control. C) SCL expression in AD10.1-MSCV and AD10.1-SCL cell lines was investigated by semi-quantitative RT-PCR. S16 mRNA amplification was used as control for the amount of cDNA. D) The integrity of the two E-box sites is critical for repression of pT α enhancer activity by SCL. AD10.1 cells were transfected with wild type or mutated enhancer constructs, and the MSCV empty vector (open bars) or MSCV SCL-expressing vector (solid bars). Enhancer activities were calculated as in Figure 2.4.

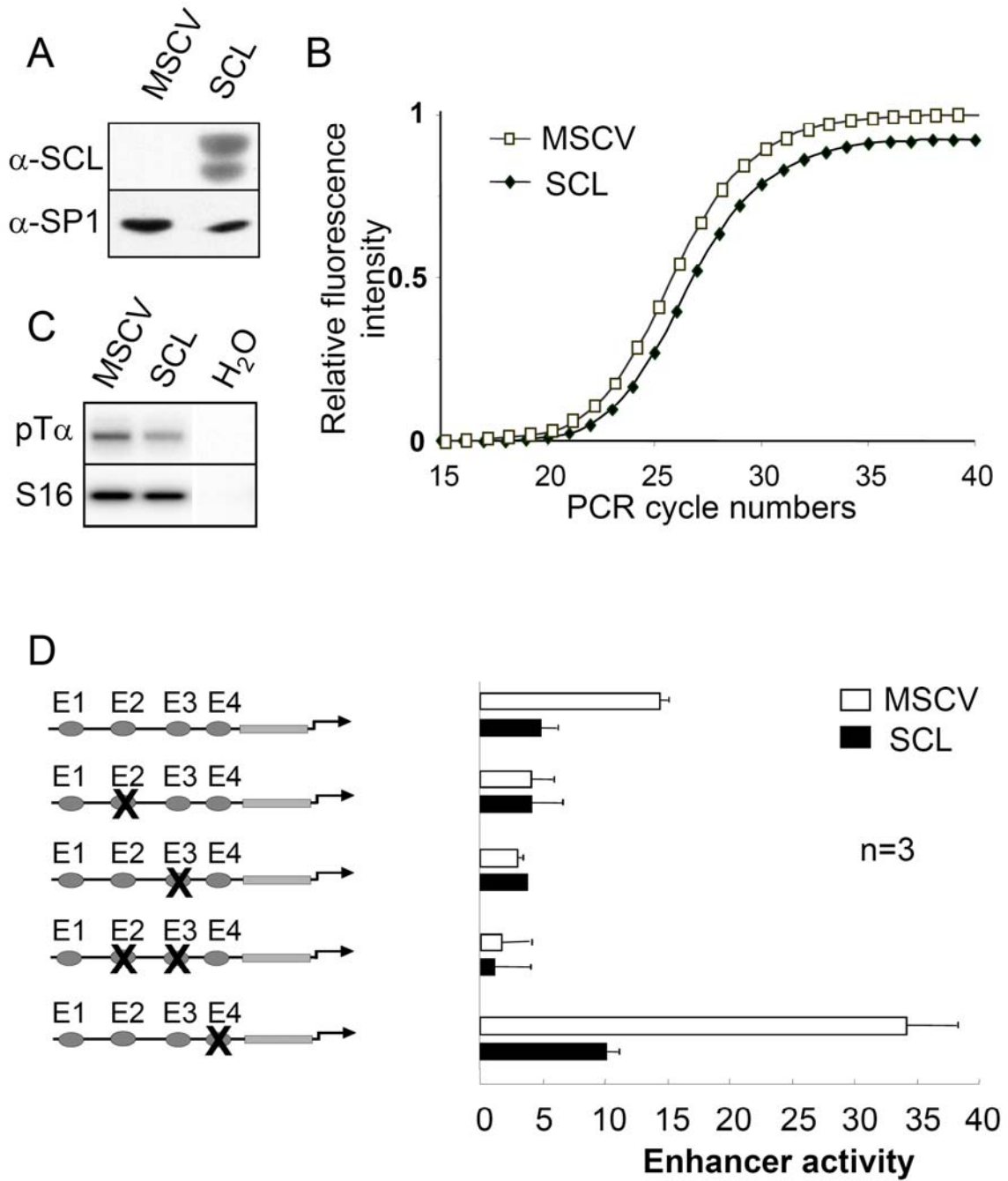


Figure 2.5

Figure 2.6. E2A and HEB heterodimers and SCL-containing complexes preferentially bind E2 and E3 sequence *in vitro*.

A) Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were done using ^{32}P -labeled E2 or E3 probes and AD10.1 cell nuclear extracts transfected or not with MSCV-empty or MSCV-SCL expressing vector. B) Supershift assays were done with AD10.1 and AD10.1-SCL nuclear extracts. Where indicated, antibodies were included in the samples before addition of the labelled probes. Arrows point to the binding of E2A/HEB or SCL-containing complexes. A monoclonal antibody against c-myc was used as an isotype matched control. C) We used AD10.1-SCL nuclear extracts for competition assays with a gradient of 1, 3, 10 and 100-fold molar excess of unlabeled E3 wild type or E3-mutated oligonucleotides (lanes 3-10, 19), or E1, E2 and E4 wild type oligonucleotides (lanes 13-16, 20-27). Arrows point to the different complexes formed on the E3 probe. Dissociation constants estimated by analysis of competition curves are 300 nM (E1), 163 nM (E2), 13 nM (E3) and 720 nM (E4) for each E-box sites.

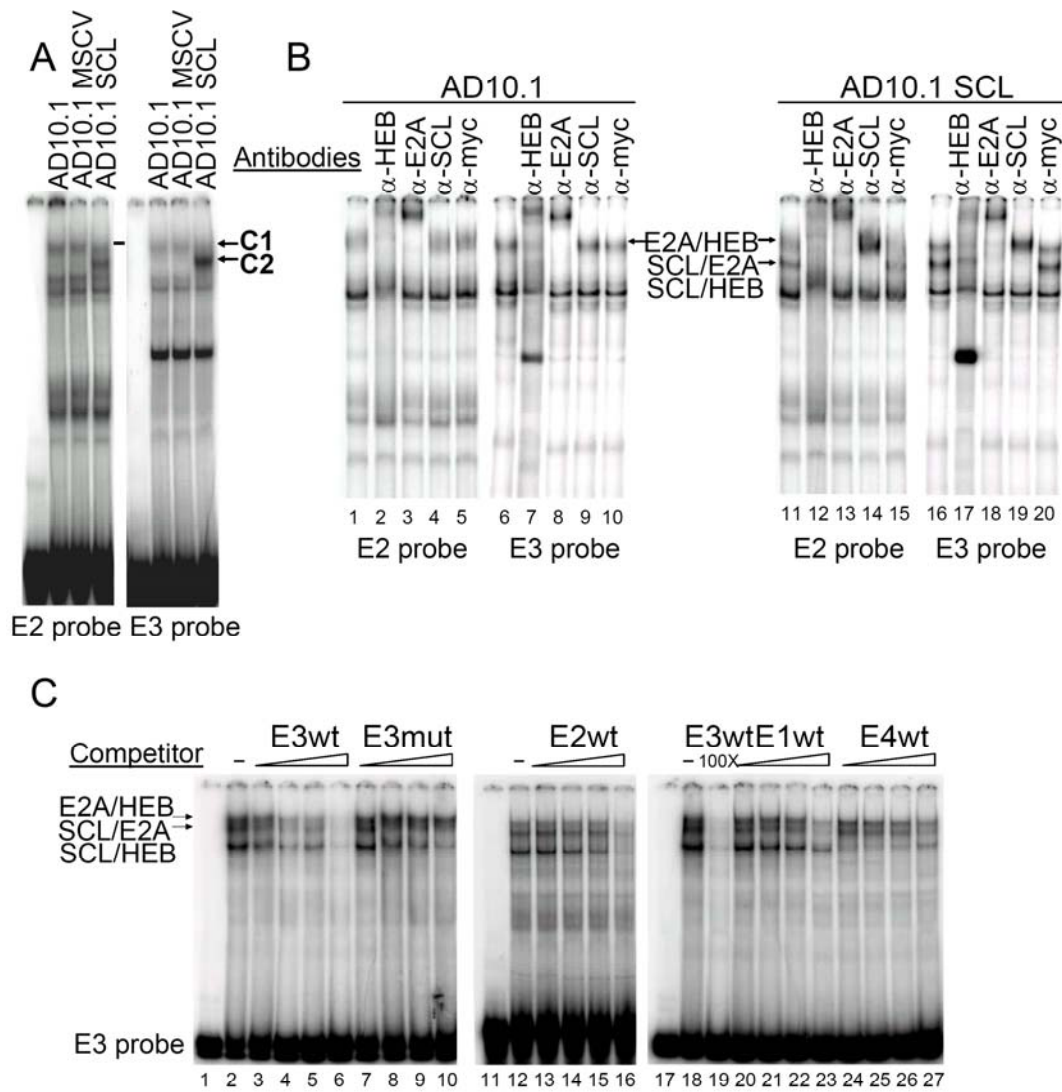


Figure 2.6

Figure 2.7. SCL, E2A and HEB specifically associate with the pT α enhancer and promoter *in situ*.

Chromatin immunoprecipitation assays were performed as in Figure 2.3 using crosslinked AD10.1-MSCV and AD10.1-SCL nuclear extracts. Anti-HA and RbIgG were used as isotype and species matched controls for immunoprecipitations.

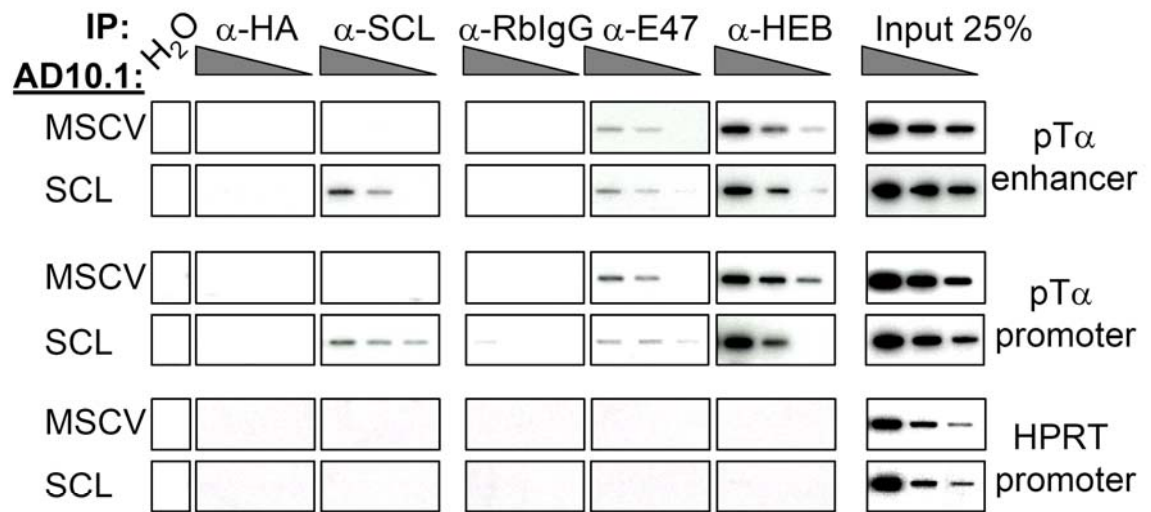


Figure 2.7

Figure 2.8. SCL, E2A and HEB gene expressions determine pT α mRNA levels

A) Thymocytes were fractionated into eight subsets according to their degree of maturity and mRNA levels were investigated by semi-quantitative RT-PCR (DN1 to DN4 : lanes 1-4, DP : lane 5, mature CD4⁺ : lane 6 and mature CD8⁺ : lane 7, as depicted in Figure 2.1A). Specific primers for E2A, HEB, SCL, pT α and ribosomal S16 mRNA were used, the latter as control for the amounts of cDNA. B) mRNA levels were assessed by Southern blot hybridization with internal oligonucleotide probes. Signals were normalized to S16 levels to account variations in cDNA amounts.

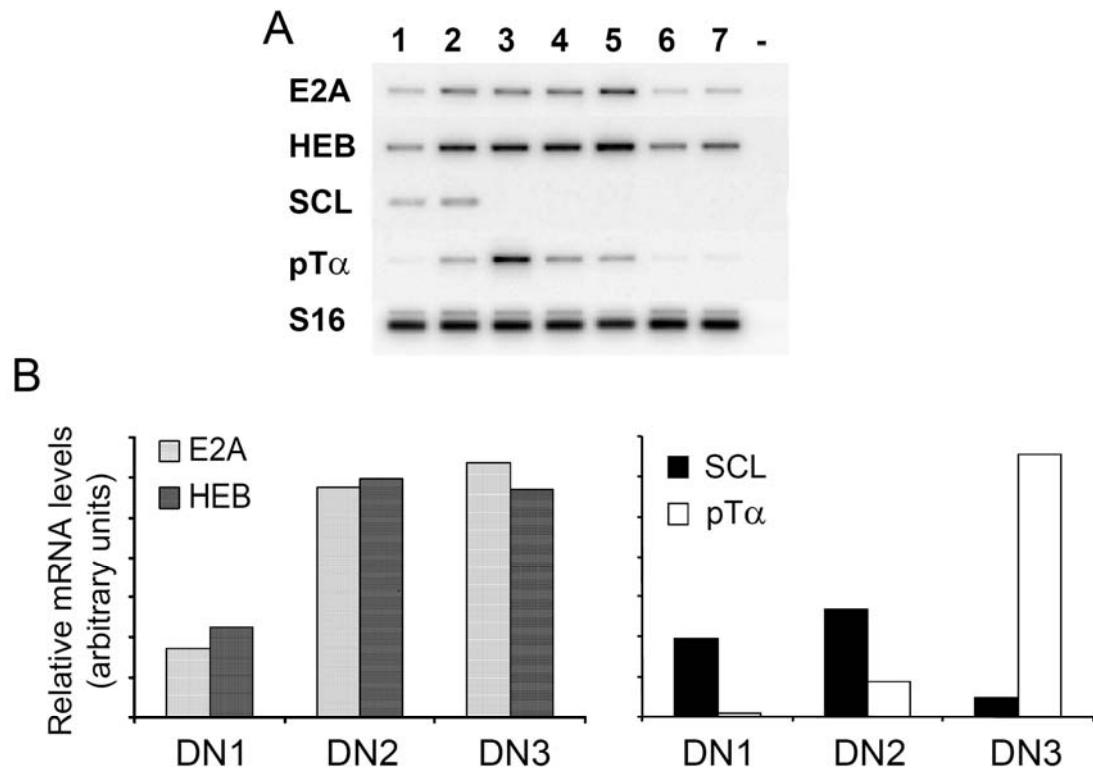


Figure 2.8

2.8 Acknowledgments

We would like to thank Nathalie Tessier and Eric Massicotte (IRCM) for their assistance with cell sorting and Dr Martine Raymond of the IRCM Molecular Biology Service for the use of the Real time PCR. The work was funded by grants from the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and the National Cancer Institute of Canada (NCIC) with funds from the Canadian Cancer Society. M. Tremblay was supported by a studentship from the Fonds de recherche sur la nature et les technologies, S. Herblot, by a postdoctoral fellowship from the Leukemia Research Fund and E. Lecuyer, by a studentship from CIHR.

2.9 Reference List

1. Godfrey,D.I. & Zlotnik,A. Control points in early T-cell development. *Immunol. Today* **14**, 547-553 (1993).
2. Chaffin,K.E. *et al.* Dissection of thymocyte signaling pathways by in vivo expression of pertussis toxin ADP-ribosyltransferase. *EMBO J.* **9**, 3821-3829 (1990).
3. von Boehmer,H. *et al.* Pleiotropic changes controlled by the pre-T-cell receptor. *Curr Opin Immunol* **11**, 135-142 (1999).
4. Reizis,B. & Leder,P. Expression of the mouse pre-T cell receptor alpha gene is controlled by an upstream region containing a transcriptional enhancer. *J Exp Med* **189**, 1669-1678 (1999).
5. Reizis,B. & Leder,P. The upstream enhancer is necessary and sufficient for the expression of the pre-T cell receptor alpha gene in immature T lymphocytes. *J Exp Med* **194**, 979-990 (2001).
6. Reizis,B. & Leder,P. Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes Dev* **16**, 295-300 (2002).
7. Petersson,K., Ivars,F., & Sigvardsson,M. The pT alpha promoter and enhancer are direct targets for transactivation by E box-binding proteins. *Eur. J Immunol.* **32**, 911-920 (2002).
8. Takeuchi,A. *et al.* E2A and HEB activate the pre-TCR alpha promoter during immature T cell development. *J. Immunol* **167**, 2157-2163 (2001).
9. Herblot,S., Steff,A.M., Hugo,P., Aplan,P.D., & Hoang,T. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-Talpha chain expression. *Nat. Immunol.* **1**, 138-144 (2000).
10. Zhuang,Y., Soriano,P., & Weintraub,H. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* **79**, 875-884 (1994).
11. Bain,G. & Murre,C. The role of E-proteins in B- and T-lymphocyte development. *Semin. Immunol.* **10**, 143-153 (1998).

12. Engel,I. & Murre,C. The function of E- and Id proteins in lymphocyte development. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 193-199 (2001).
13. Quong,M.W., Romanow,W.J., & Murre,C. E protein function in lymphocyte development. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 301-322 (2002).
14. Bain,G. *et al.* E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* **17**, 4782-4791 (1997).
15. Barndt,R., Dai,M.F., & Zhuang,Y. A novel role for HEB downstream or parallel to the pre-TCR signaling pathway during alpha beta thymopoiesis. *J Immunol* **163**, 3331-3343 (1999).
16. Blom,B. *et al.* Disruption of alpha beta but not of gamma delta T cell development by overexpression of the helix-loop-helix protein Id3 in committed T cell progenitors. *EMBO J* **18**, 2793-2802 (1999).
17. Yan,W. *et al.* High incidence of T-cell tumors in E2A-null mice and E2A/Id1 double- knockout mice. *Mol Cell Biol* **17**, 7317-7327 (1997).
18. Chervinsky,D.S. *et al.* Disordered T-cell development and T-cell malignancies in SCL LMO1 double-transgenic mice: parallels with E2A-deficient mice. *Mol Cell Biol* **19**, 5025-5035 (1999).
19. Lecuyer,E. *et al.* The SCL-complex regulates *c-kit* expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* . 2002. Ref Type: In Press
20. Wadman,I.A. *et al.* The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J* **16**, 3145-3157 (1997).
21. Hsu,H.L., Wadman,I., Tsan,J.T., & Baer,R. Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop- helix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5947-5951 (1994).
22. Park,S.T. & Sun,X.H. The Tal1 oncoprotein inhibits E47-mediated transcription. Mechanism of inhibition. *J Biol Chem* **273**, 7030-7037 (1998).
23. Voronova,A.F. & Lee,F. The E2A and tal-1 helix-loop-helix proteins associate in vivo and are modulated by Id proteins during interleukin 6-induced myeloid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5952-5956 (1994).

24. Aplan,P.D. *et al.* An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J* **16**, 2408-2419 (1997).
25. Larson,R.C. *et al.* Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J* **15**, 1021-1027 (1996).
26. Rabbitts,T.H. *et al.* Chromosomal translocations and leukaemia: a role for LMO2 in T cell acute leukaemia, in transcription and in erythropoiesis. *Leukemia* **11 Suppl 3**, 271-272 (1997).
27. Zhuang,Y. *et al.* Helix-loop-helix transcription factors E12 and E47 are not essential for skeletal or cardiac myogenesis, erythropoiesis, chondrogenesis, or neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 12132-12136 (1992).
28. Zhuang,Y., Cheng,P., & Weintraub,H. B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol Cell Biol* **16**, 2898-2905 (1996).
29. Bain,G. *et al.* E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements [see comments]. *Cell* **79**, 885-892 (1994).
30. Malissen,M. *et al.* Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3- epsilon gene. *EMBO J.* **14**, 4641-4653 (1995).
31. Chomczynski,P. & Sacchi,N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).
32. Orlando,V., Strutt,H., & Paro,R. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**, 205-214 (1997).
33. Xu,D. *et al.* Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 3826-3831 (2001).
34. Bain,G., Quong,M.W., Soloff,R.S., Hedrick,S.M., & Murre,C. Thymocyte maturation is regulated by the activity of the helix-loop-helix protein, E47. *J Exp Med* **190**, 1605-1616 (1999).

35. Pan,L., Hanrahan,J., Li,J., Hale,L.P., & Zhuang,Y. An analysis of T cell intrinsic roles of E2A by conditional gene disruption in the thymus. *J Immunol.* **168**, 3923-3932 (2002).
36. Wang,B., Simpson,S.J., Hollander,G.A., & Terhorst,C. Development and function of T lymphocytes and natural killer cells after bone marrow transplantation of severely immunodeficient mice. *Immunol. Rev.* **157**, 53-60 (1997).
37. Wang,N. *et al.* Expression of a CD3 epsilon transgene in CD3 epsilon(null) mice does not restore CD3 gamma and delta expression but efficiently rescues T cell development from a subpopulation of prothymocytes. *Int. Immunol.* **10**, 1777-1788 (1998).
38. Blackwell,T.K. & Weintraub,H. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* **250**, 1104-1110 (1990).
39. Hu,J.S., Olson,E.N., & Kingston,R.E. HEB, a helix-loop-helix protein related to E2A and ITF2 that can modulate the DNA-binding ability of myogenic regulatory factors. *Mol Cell Biol* **12**, 1031-1042 (1992).
40. Engel,I., Johns,C., Bain,G., Rivera,R.R., & Murre,C. Early thymocyte development is regulated by modulation of E2A protein activity. *J Exp Med* **194**, 733-745 (2001).
41. Saint-Ruf,C. *et al.* Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* **266**, 1208-1212 (1994).
42. Gounari,F. *et al.* Tracing lymphopoiesis with the aid of a pTalpha-controlled reporter gene. *Nat. Immunol.* **3**, 489-496 (2002).
43. Hsu,H.L., Cheng,J.T., Chen,Q., & Baer,R. Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* **11**, 3037-3042 (1991).
44. Hsu,H.L. *et al.* Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1256-1265 (1994).
45. Goardon,N. *et al.* Ectopic expression of TAL-1 protein in Ly-6E.1-htal-1 transgenic mice induces defects. *Blood* **100**, 491-500 (2002).

46. Eckner,R., Yao,T.P., Oldread,E., & Livingston,D.M. Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev* **10**, 2478-2490 (1996).
47. Massari,M.E. *et al.* A conserved motif present in a class of helix-loop-helix proteins activates transcription by direct recruitment of the SAGA complex. *Mol Cell* **4**, 63-73 (1999).
48. Massari,M.E. & Murre,C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**, 429-440 (2000).
49. Sigvardsson,M., O'Riordan,M., & Grosschedl,R. EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes. *Immunity*. **7**, 25-36 (1997).
50. Liu,X., Prabhu,A., & Van Ness,B. Developmental regulation of the kappa locus involves both positive and negative sequence elements in the 3' enhancer that affect synergy with the intron enhancer. *J Biol Chem* **274**, 3285-3293 (1999).
51. Kee,B.L. & Murre,C. Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J Exp Med* **188**, 699-713 (1998).
52. Goldfarb,A.N., Flores,J.P., & Lewandowska,K. Involvement of the E2A basic helix-loop-helix protein in immunoglobulin heavy chain class switching. *Mol Immunol* **33**, 947-956 (1996).

3 Identification of SCL and LMO1 oncogenes as transcriptional repressors of HEB/E2A in the thymus through functional genomic / genetic approaches

Mathieu Tremblay¹, Sabine Herblot¹, Margarita Todorova¹, Phu Vinh On¹, Véronique Lisi¹, François Major¹, Sébastien Lemieux¹, Trang Hoang¹².

¹Institute of Research in Immunology and Cancer (IRIC) – University of Montreal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

²Pharmacology, Biochemistry and Molecular Biology Departments, University of Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

3.1 Contribution des co-auteurs

M.T.: Design expérimental, réalisation des expériences et analyse des données et rédaction du manuscrit.

S.H : Design expérimental, réalisation des expériences (Figure 3.5) et analyse des données et rédaction du manuscrit.

M.To: Réalisation des expériences (Figure 3.2A).

P.V.O.: Réalisation des expériences (Figure 3.1B).

V.L.: Analyse de données.

F.M.: Design expérimental.

S.L.: Design expérimental et contribution à l'analyse des données (Figure 3.1C-D).

T.H : Design expérimental, analyse et rédaction du manuscrit.

This chapter corresponds to a manuscript to be submitted.

3.2 Abstract

The *TAL1/SCL* and *LMO1* oncogenes are frequently activated in childhood T cell acute leukemia (T-ALL) due to their ectopic expression in the thymus. We provide evidence that in preleukemic thymocytes, *SCL-LMO1* overexpression globally affects the expression of both positive and negative targets of E2A, a key regulator of T lymphopoiesis. We also revealed new target genes of E2A and HEB in primary thymocytes through phylogenetic analysis of conserved E2A-binding sites within promoter regions and by chromatin immunoprecipitation of thymocytes. This assay also showed that SCL, HEB and E2A proteins repress target genes through association to DNA. Investigation of genetic interactions between *SCL-LMO1* and *Heb* or *E2a* showed that whereas *E2a* and *Heb* act in the same genetic pathway as SCL-LMO1 for thymocyte differentiation, both *Heb* and *E2a* are haploinsufficient and synergize with *SCL-LMO1* in regard to leukemia induction. Therefore, this indicates a higher threshold of inhibition for the tumor suppressor than for the differentiation regulator function of E2A and HEB. Together these data reveal that the *SCL* and *LMO1* oncogenes block thymocyte differentiation by inhibiting the function of the E proteins E2A and HEB, a mechanism distinct from the one used for transformation.

3.3 Introduction

T-cell leukemogenesis is a multistep process often initiated by chromosomal rearrangements that place oncogenes under the control of active promoters such as TCR α or TCR β gene regulatory elements (1). Oncogenes involved in T-ALL include *SCL* and *LMO1*. The *SCL* gene encodes a class II tissue specific basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor and is the most frequently activated gene in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia (reviewed by (2)). Chromosomal translocations or site-specific interstitial deletion juxtaposed the *SCL* gene to constitutive promoter and enhancer elements, leading to aberrant *SCL* expression in T cell precursors (3-6). Similarly to *SCL*, *LMO1* and *LMO2* proteins are frequently involved in childhood T cell leukemogenesis (7-9) and furthermore, cooperate with *SCL* to induce T-ALL in transgenic mice (10,11). While *SCL* functions to specify hematopoietic precursors during development (12,13), drive terminal erythroid and megakaryocyte differentiation in the adult (14,15), as well as promote the survival of immature multipotent progenitors (Lacombe 2009), *Scl* expression has to be downregulated for proper lymphoid differentiation (16-18). This is also true of the *LMO2* factor which is essential for hematopoiesis, as shown by foetal liver defect in primitive hematopoiesis and failure of adult hematopoiesis and angiogenesis in the *Lmo2* knockout mice (8,19).

At the molecular level, *SCL* and *LMO1/2* are part of multimeric transcriptional complexes involved in transcriptional activation or repression depending on target genes and on the

cellular context (20-22). For instance, the ectopic expression of *SCL* and *LMO1/2* in thymus represses the transcription of the E proteins target genes *CD4*, *pTα* (*Ptcra*) and *Cd5* (18,23,24), whereas other genes such as *Raldh2* and *Talla1* have been shown to be induced (21,25). E proteins which include E12 and E47, both encoded by the *E2a* (*Tcfe2a*) gene, *Heb* (*Tcf12*) and *E2-2* (*Tcf4*) (26) are key transcriptional regulators of thymocyte development (27,28). Whereas some E2A targets have been identified in various cell lines (29,30), only some were confirmed in primary thymic cells (27,31,32). Indeed, *E2a*^{-/-} mice showed reduced thymic cellularity and defective thymopoiesis with an accumulation of DN1 cells and an accelerated passage from the DP to SP stage (33). On the other hand, *Heb*^{-/-} mice presented a differentiation block at the DN to DP transition similar to what was observed in *SCL-LMO1/2* double transgenic mice (27). In addition, *E2a*^{-/-} and *Heb*^{-/-} mice were reported to develop T-ALL (10,11), suggesting that *SCL-LMO1/2*-induced leukemogenesis could result from the inhibition of E-proteins tumor suppressor function. Even if mouse models of T-ALL present aberrant T lymphopoiesis, block of differentiation is usually not enough for leukemia induction as pre-TCR deficient mice present a block in thymocyte differentiation but do not succumb to leukemogenesis (34-36).

Here we addressed the association between differentiation block induced by *SCL* and *LMO1* oncogenes and leukemogenesis process using a combination of transcriptomic and genetic approaches. Investigation of the effect of abnormal expression of *SCL* and *LMO1* on thymic differentiation at the preleukemic stage through global gene expression analysis

showed that *SCL* and *LMO1* function as transcriptional repressors of E2A and HEB differentiation regulator activities. Moreover, genetic interaction analysis showed that both *E2a* and *Heb* are haploinsufficient in regard to *SCL-LMO1* induced leukemia, acting in separate pathways.

3.4 Experimental procedures

Cell lines, cell culture and mice

The DN T cell line AD10.1 was cultured in IMDM (Invitrogen, Burlington) containing 10 % inactivated foetal calf serum (FCS) and 50 μ M β -mercaptoethanol. NIH3T3 and 293T cell lines were cultured as described previously (37). We used the previously described *A(5)3SCL* (*SCL*^{tg}) and *Lck-LMO1* (*LMO1*^{tg}) transgenic mouse lines. Both mouse lines were backcrossed onto a C57BL6/J background for more than 7 generations. *Cd3 ϵ* ^{-/-} mice (C57BL6/J) were kindly provided by Dr. B. Malissen (Centre d'Immunologie INSERM-CNRS de Marseille-Luminy, Marseille). *E2a*^{-/-} and *Heb*^{+/-} mice were kindly provided by Dr. Y. Zhuang (Duke University Medical center, Durham, NC) and bred with C57BL6/J mice for more than 10 generations. Animals were maintained under pathogen free conditions according to institutional animal care and use guidelines.

FACS analysis and cell sorting

Single cell suspensions were prepared from thymi of mice at the indicated ages. All antibodies used for flow cytometry analysis were from Pharmingen (BD Biosciences, Mississauga, ON), we used anti-CD44 (IM7), anti-CD25 (PC61.5), anti-CD4 (RM4-4), anti-CD8 (53-6.7) and anti-Thy1.2 (30-H12). Dead cells were excluded using propidium iodide. FACS analysis was performed on LSRII cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON).

RNA preparation, microarray and real-time RT-PCR analysis

Total RNAs were prepared from thymocyte of 3 weeks-old mice using RNeasy mini kit (Qiagen, Mississauga, ON). Global RNA amplification and hybridization to the murine Affymetrix gene expression array (MOE430A) was performed by the Ottawa Genome Center using standard Affymetrix protocols. The hybridized GeneChips were scanned, and the raw image files analysed using Affymetrix Microarray Suite 4.0's empirical algorithm to generate numeric average difference values and qualitative absent/marginal/present call values. The resulting processed data were further examined using Microsoft Excel and R softwares. Negative and low average difference values produced by the empirical algorithm were arbitrarily reassigned threshold values of 50 for purposes of calculating fold changes. The average fold change value used to compare the *Cd3ε*^{-/-} *SCL*^{tg} *LMO1*^{tg} dataset against the *Cd3ε*^{-/-} dataset was calculated as ratios of the means of the replicates. Distribution analysis was performed using the R software. (pvalue corrected for the false discovery rate). First strand cDNA synthesis and PCR were performed as described (18). Primer sequences used for specific mRNA amplification are available upon request. Real-time quantitative PCR was done with SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) or the TaqMan PCR master mix (Applied Biosystems) on MX3000 (Stratagene, La Jolla, CA) or ABI apparatus (Applied Biosystems).

ChIP assays

Chromatin immunoprecipitations were performed as described previously (23) using the

following antibodies: anti-E47 rabbit polyclonal antiserum N-649 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), anti-HEB rabbit polyclonal antiserum (Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-SCL mouse monoclonal antibodies BTL73 and BTL136 (provided by Dr. D. Mathieu-Mahul, Institut de Génétique Moléculaire, Montpellier), anti-rabbit IgG (Sigma, St-Louis, MI) and anti-HA mouse monoclonal antisera (Covance, Princeton, NJ). Oligonucleotide sequences are available upon request.

Bioinformatic analysis

Differentially expressed genes between $Cd3\epsilon^{-/-}$ and $Cd3\epsilon^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}$ thymocytes samples were determined using a linear model and the empirical Bayes method previously described (38). The software Limma package for the R computing environment was used for both normalization and comparison of probe signals (Limma is part of the Bioconductor project at <http://www.bioconductor.org>). Differential expression of selected genes was confirmed by Q-PCR as described above. Genomic sequences from both mouse and human were analysed for the presence of E-boxes consensus binding sequences using Transfac matrices (E47 matrix: M00002 and M00071; TAL1/SCL matrix: M00065 and M00066). The murine and human genomic sequences were aligned and the conserved binding sites were identified by identical position in both sequences relative to the ATG.

3.5 Results

3.5.1 Global decrease in gene expression in *SCL*^{tg} *LMO1*^{tg} thymocytes.

The *SCL* and *LMO1* oncogenes block thymocyte differentiation at the preleukemic stage prior to an induction of T-ALL (18,24,39). In the T lineage, *SCL* and *LMO1* or *LMO2* were previously shown to activate the expression of *TALLA1* (25) and to inhibit the expression of several E protein target genes, i.e. *Ptrca*, *Cd4* and *Cd5* (18,23,40) whereas in the erythroid lineage, *SCL* is a transcriptional activator (20,37,41-45). We therefore address the question whether *SCL* and *LMO1* activate or inhibit gene expression in the thymus by assessing global gene expression in transgenic thymocytes compared to non transgenic thymocytes. To circumvent cellular heterogeneity within the thymus, transgenic mice expressing *SCL* and *LMO1* were crossed with C57Bl6/J-*Cd3ε*-deficient mice. Indeed, in the absence of *CD3ε*, thymocytes are arrested at the DN3 stage due to abrogation of pre-TCR as well as TCR signalling affected by transgenic expression of *SCL* and *LMO1* (Supplemental Figure 3.S1A). Global gene expression was determined using thymocyte RNA obtained from three *Cd3ε*^{-/-} *SCL*^{tg} *LMO1*^{tg} mice or their normal counterparts (*Cd3ε*^{-/-}) and the Affymetrix technology. Datasets of genes with a p value lower than 0.01 were considered as affected by the oncogenes. This analysis revealed that ectopic expression of *SCL* and *LMO1* is mainly associated with a downregulation of gene expression (Figure 3.1A). The number of genes that are downregulated (69 %) far exceeded the number of genes that are upregulated (31 %). These observations suggest that *SCL-LMO1* mainly functions as transcriptional repressors in the thymus.

3.5.2 *SCL-LMO1* globally affect the expression of both positive and negative targets of E2A.

We and others have previously shown that SCL inhibits several E2A target genes in T cell lines and double positive thymocytes. Both E2A and HEB bind as homodimers or heterodimers to the CAGGTG E box with high affinity. We therefore use the E47 matrix (Supplemental Figure 3.S1B) to assess whether this preferred binding site is enriched in the promoters of the 237 genes that are significantly affected by SCL-LMO1 transgenic expression. We restricted our search to E boxes that are conserved between the murine and human genes, within 5 kb upstream and 2 kb downstream of the transcriptional initiation sites (Figure 3.1B). Their occurrence within this genomic region of genes that are affected by SCL-LMO1 was compared to that of all annotated genes. Genomic regions were divided into 1 kb intervals. This analysis revealed a significant enrichment for E47 consensus binding sites within the -5, -3 and -1 kb relative to transcription start sites, which was two-fold or higher. In addition, E47 binding sites were specifically depleted within the -4kb interval of these genes compared to the other genes in the genome and no enrichment was found at the -2 kb interval whereas the enrichment was still significant when the upstream 5kb genomic region was considered as a single interval.

SCL binds DNA as heterodimers with E2A or HEB. Binding site selection indicates high affinity binding to the SCL consensus (CAGATG), although the G at position +4 was tolerated (46). We therefore conducted the same analysis with the TAL1/SCL matrix (Supplemental Figure 3.S1B) and found that the position specific enrichment in E47 consensus binding site within the -3 and -1 kb intervals was associated with a depletion in SCL consensus binding sites. This striking inverse correlation suggests a phylogenetically conserved counter-selection between SCL and E47 binding sites.

Using conditional E47 expression in the 1F9 thymoma cell line, Schwartz et al (29) identified a total of 127 genes that are regulated by E47, of which 60% are upregulated

whereas the other 40% are downregulated. We next addressed the question whether the genes that are affected by SCL-LMO1 are enriched for these E47-regulated genes (29). The occurrence of E47-dependent genes in the dataset affected by *SCL-LMO1* is 8.4% whereas their occurrence in the microarray is 0.8%, representing a 10-fold enrichment for E47 targets. We next analysed separately genes that are upregulated or downregulated by E47. The continuous lines in Figure 3.1C and D represents the distribution of all genes based on their relative expression levels calculated as log₂ fold change between *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} thymocytes and their non transgenic littermates. Superimposed to this is the distribution of the relative expression levels of genes that are reported to be upregulated by E47 (Figure 3.1C). Using this model, an absence of regulation of E47 target genes by SCL-LMO1 would be represented by a superimposition of the two distributions whereas a left shift corresponds to an antagonism between SCL-LMO1 and E47/E2A and a right shift, to a cooperation between these factors. As shown in Figure 3.1C, the distribution of E47 targets is not normal and significantly differs from the parental distribution, in that it presents an important left shoulder, consistent with the possibility that a subset of E47-upregulated genes are repressed by SCL and LMO1. Conversely, for genes that are down-regulated by E47, a left shift corresponds to cooperation whereas a right shift indicates antagonism. As shown in Figure 3.1D, a subset of E47-downregulated genes appears to be upregulated by *SCL* and *LMO1*. Together, these distributions are suggestive of an antagonistic effect of SCL-LMO1 on E2A. All genes regulated by E47 that are significantly affected by *SCL* and *LMO1* ($p \leq 0.01$) were then confirmed by Q-PCR. There was an overall concordance between microarray data and Q-PCR data for the 27 genes tested (Figure 3.1E). Only 5 of 27 genes showed more pronounced differences when assessed by Q-PCR. Thus our results support the view that the main effect of *SCL-LMO1* is to counteract E protein activity in the thymus.

3.5.3 Association of HEB, E47 and SCL with promoters of known E47-upregulated target genes.

Within these 27 E47-regulated genes that are affected by SCL-LMO1, we found genes that are important for thymocyte differentiation (*Rag1*, *Rag2*, *Ptcra*, *Il7r*, *Cdh1*), for DNA repair (*Rad54l*), for RNA metabolism (*Rrm2*) and translation (*Eif4e*). We therefore addressed the question whether both E2A and HEB occupy the regulatory regions (promoters or enhancers) of these genes *in situ* by performing chromatin immunoprecipitation (ChIP) using the AD10.1 T cell line. We compared chromatin extracts that are immunoprecipitated by antibodies against E47 or HEB with those that are found associated with control immunoglobulins. We found that both E47 and HEB specifically associate *in situ* to the regulatory regions of these E47-upregulated target genes (Figure 3.2A). Our results indicate that these E2A regulated genes are direct targets of both E47 and HEB in thymocytes. Furthermore, E47 binding sites are found within 1 Kb upstream of the transcription initiation sites of these genes, consistent with data shown in Figure 3.1B indicating an enrichment for E47 binding sites in this region (Figure 3.2B).

Known E47-upregulated genes are downregulated by *SCL* and *LMO1* indicative of an antagonism between SCL-LMO1 and E2A in a preleukemic setting. This inhibition can occur by sequestering these partners (E2A and/or HEB) away from DNA, in an-Id like manner (47), or by associating with these factors on DNA. As shown in Figure 3.2A, when SCL is overexpressed in these cells, it is found associated with E47 and HEB to the same regulatory regions, indicating that SCL does not prevent occupancy of these loci by E47 or HEB.

3.5.4 Identification of new E47, HEB as well as SCL targets by ChIP *in situ*.

Among the genes found affected by *SCL* and *LMO1* expression, we identified 74 genes that possess a phylogenetically conserved E47 consensus binding site (E-box) near their

transcriptional initiation sites (Figure 3.1B). In addition to known E47-regulated genes (Figure 3.1E), we confirmed the expression of 13 of these genes by Q-PCR showing that they were affected by *SCL-LMO1* on the microarray dataset (Figure 3.3B). We found both an upregulation (*Usf1*, *Runx1*, *Trfr2*, *Rab38*, *Nfe2*, *Lyl1* and *Hhex*) as well as a downregulation (*Rasl11b*, *Rfc4*, *Tgfb1*, *Rpn1*, *Cdk4*, *Nsg2*) of their expression (Figure 3.3B), confirming our microarray data. To address the question whether these genes are direct E47 or HEB target genes, we perform ChIP as above. We chose a set of genes for which we identified conserved E boxes between -1 Kb and +1 Kb (Figure 3.3C). HEB and E47 were associated to the regulatory regions of these genes. When SCL was ectopically expressed, it was also bound to these regulatory regions. We therefore identified new target genes of E47 and HEB. Furthermore, *SCL* inhibits expression of these genes by occupying their promoters in the same way as shown for known E47-regulated genes when abnormally expressed.

3.5.5 Decreased *Heb* or *E2a* gene dosage does not affect thymocyte differentiation arrest caused by *SCL-LMO1*.

SCL-LMO1 inhibit E protein activity, impair thymocyte differentiation and induce T-ALL (10,18,23,24,39,40). If the inhibition of E protein activity underlies both differentiation arrest and leukemia induction, we reasoned that removing one allele of *E2a* or *Heb* would not exacerbate the defects caused by *SCL-LMO1* *in vivo*. We first verified mRNA expression of *E2a* and *Heb* in the thymus of heterozygous mice and found a reduction of 40% and 60% in respective mRNA levels (Figure 3.4A). We therefore examined the effect of reducing *E2a* or *Heb* on thymocyte differentiation during the preleukemic stage. Within the DN subset, thymocyte maturation can be followed according to the sequential expression of CD44 and CD25 molecules, thus identifying 4 sub-populations (DN1 to DN4) as well as of CD4 and CD8 molecules for the population DP, SP4 and SP8 as described in Figure 3.4B. *SCL^{tg}LMO1^{tg}* mice reproducibly showed an increase in DN1 cell population and a decrease in the DN2 and DN3 thymocyte subsets. This differentiation

defect is not affected by the removal of one *E2a* or *Heb* allele. Similarly, the decrease in the DP population as well as the altered CD4/CD8 ratio caused by the transgenes were not affected in *E2a*^{+/-} and *Heb*^{+/-} mice. These results show that thymocyte differentiation blockade caused by the *SCL-LMO1* oncogenes is not exacerbated by *E2a* or *Heb* haploidy. The absence of synergy suggest that differentiation blockade during the preleukemic stage is caused by an inhibition of E2A-HEB activity.

3.5.6 Decreased *Heb* or *E2a* gene dosage accelerates *SCL-LMO1*-dependent leukemia.

Since *SCL-LMO1* acts in the same genetic pathway as *E2a* or *Heb* in thymocyte differentiation, we addressed the question whether it is also the case for leukemia induction. To this end, we observed the time of leukemia onset in *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} mice crossed with *E2a*^{+/-} or *Heb*^{+/-} mice (Figure 3.5A). Loss of one allele of *E2a* or *Heb* was not sufficient to cause leukemia. Overexpression of *SCL-LMO1* led to leukemia with a median survival of 136 days (Figure 3.5B). In this context, loss of one allele of *E2a* significantly accelerated leukemia onset with a median time of 111 days (p<0.02). Furthermore, loss of *Heb* allele caused an even stronger acceleration of leukemia onset induced by *SCL* and *LMO1* with a median survival time of 91 days (p<0.0001). Our results indicate that both *Heb* as well as *E2a* are haploinsufficient in regard to leukemogenesis induced by *SCL-LMO1*. These results are in agreement with the recent report showing an acceleration of *SCL*-induced leukemogenesis in the absence of an allele of either *E2a* or *Heb* (40). This acceleration did not affect the leukemic phenotype corresponding to CD8 ISP and/or immature DP phenotype (Figure 3.4C). These results argue in favour of genetic interactions between *Heb* or *E2a* and *SCL-LMO1* in the induction of T- ALL and support a role for HEB and E2A as tumour suppressors in the thymus. Contrary to thymocyte differentiation where *E2a* and *Heb* act in the same genetic pathway as *SCL-LMO1*, the synergy observed in leukemia induction indicates either that their inhibition by *SCL* and *LMO1* is insufficient or that they act in separate pathways. Together, these observations are

consistent with the view that differentiation blockade and the induction of T-ALL by the *SCL-LMO1* oncogenes occurs through distinct mechanisms.

3.6 Discussion

In the present study, we revealed a differential genetic interaction between *E2a* or *Heb* and *SCL-LMO1* in thymocyte differentiation and leukemia induction. In thymocyte differentiation, SCL-LMO1 acts in the same genetic pathway as E2A and HEB, therefore inhibiting E2A and/or HEB function. We further showed that *E2a* or *Heb* loss of function and *SCL-LMO1* overexpression cooperate together for leukemia induction; first, revealing the role of E2A and HEB as tumor suppressor genes and second, that E2A or HEB function is either insufficiently inhibited or that they act in parallel or in independent pathways. We also showed that the SCL and LMO1 oncogenes repress the expression of a subset of E2A and HEB target genes in preleukemic thymocytes. Moreover, using bioinformatic and molecular approaches, we identified new target of E2A and HEB in a normal thymic context, which are also regulated by SCL when ectopically expressed such as in T-ALL.

3.6.1 Upregulation of *Lyl1* and *Hhex* gene expression by *SCL-LMO1*

Our results identify two novel genes which are targets of E2A and HEB, *Lyl1* and *Hhex*, and induced by the *SCL-LMO1* oncogenes. Interestingly, LYL1, encoding a hematopoietic bHLH transcription factor (48), is also an oncogene (49) whose expression is activated by chromosomal translocations in childhood T-ALL (50), much in the same way as SCL. Our results indicated that *Lyl1* is among the genes with the highest expression level induction by *SCL-LMO1* in preleukemic DN3 thymocytes. Normally, *Lyl1* is co-expressed with *Scf* and *Lmo2* in DN1 cells and is downregulated during thymopoiesis (51). The oncogenic

activities of *LYL1* and *SCL* result from their dysregulated expression in the thymus (49), suggesting that the high induction of *Lyl1* by *SCL-LMO1* may represent a feed forward loop in leukemogenesis. Furthermore, *Hhex/Prh* is a homeobox gene which is required for hemangioblast differentiation into hematopoietic progenitors (52). Similar to *Scl*, *Hhex* is expressed at low levels in DN3 thymocytes (our data) but not in the total thymocytes population of DP cells (53). Furthermore, the downregulation of *Hhex* is required for proper thymocyte differentiation (54). Overexpression of *HHEX* by retroviral gene transfer causes B and T cell lymphomas (55). Finally, the phenotypes of leukemic cells induced by *LYL1* and *HHEX* in transgenic mice are similar to *SCL-LMO1* induced leukemia. Together, these observations suggest that the induction of *Lyl1* and *Hhex* in primary thymocytes could reinforce the leukemogenic property of *SCL-LMO1*.

3.6.2 The tumor suppressor function for E2A and HEB

Both *E2a*^{-/-} and *Heb*^{-/-} mice that survive to adulthood develop leukemias, suggesting a tumor suppressor function for E proteins. In addition, *Id1* transgenic mice also succumb to leukemia (56). As reported for *SCL* induced leukemia, removal of one *E2a* or *Heb* allele accelerates leukemia induced by *SCL* in transgenic mice, suggesting that E2A and HEB can indistinctly delay leukemia (40). In accordance with this, we showed here that both E2A and HEB are haploinsufficient in regard with tumor suppression. Our study indicates that *SCL-LMO1* either insufficiently inhibited E protein tumor suppressor function or that they act in parallel or in independent pathway in regard to leukemia induction. Previous works suggested that *SCL* inhibits the expression of genes that are activated by E2A and HEB,

including *Ptcra*, *Cd4*, *Cd5* (18,23,24,57). Here we have shown by global profiling that SCL inhibits the expression of a subset of genes that are upregulated by E47 (29). Conversely, genes that are downregulated by E47 are upregulated by *SCL-LMO1*, altogether pointing for an antagonist action of SCL on E proteins in the preleukemic thymus. Moreover, both E2A and HEB have anti-proliferative activities at the DN3 stage (58). While it remains possible that their tumor suppressor function may be linked to this antiproliferative activity, the haploinsufficiency of *E2a* and *Heb* in *SCL^{tg}LMO1^{tg}* mice suggests that their role in tumor suppression may implicate additional properties.

3.7 Figure

Figure 3.1. *SCL* and *LMO1* overexpression in preleukemic thymocytes affects genes regulated by E47.

A) *SCL* and *LMO1* overexpression in the thymus causes a global repression of gene expression. Shown is the percentage of genes found significantly (pvalue<0.01) downregulated and upregulated between *Cd3ε*^{-/-} thymocytes expressing or not *SCL* and *LMO1*. B) Analysis of the genomic regions upstream of significantly affected genes (pvalue<0.01) for conserved E47 or SCL consensus binding sites between human and mouse genomes. The histogram represents the fold enrichment of transcription binding sites in the promoter regions over the genomic occurrence based on position around the transcription initiation site. Asterix correspond to a p-value<0.05. C-D) *SCL* and *LMO1* overexpression represses a subset of E47 regulated genes. Shown is the distribution of genes upregulated (C) or downregulated (D) by E47 (29) (black bar) superimposed to the distribution of all the genes found on affymetrix chip (black line) based on their log₂ ratio between *SCL* and *LMO1* expressing thymocyte and control. E) Downregulation of genes positively regulated by E47 as well as upregulation of genes negatively regulated by E47 in the presence of *SCL* and *LMO1*. Microarray data and quantitative RT-PCR are shown as ratio of *Cd3ε*^{-/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} on *Cd3ε*^{-/-} control thymus and normalised to *Hprt*. Data shown as mean ± standard deviation of 3 independent RNA samples.

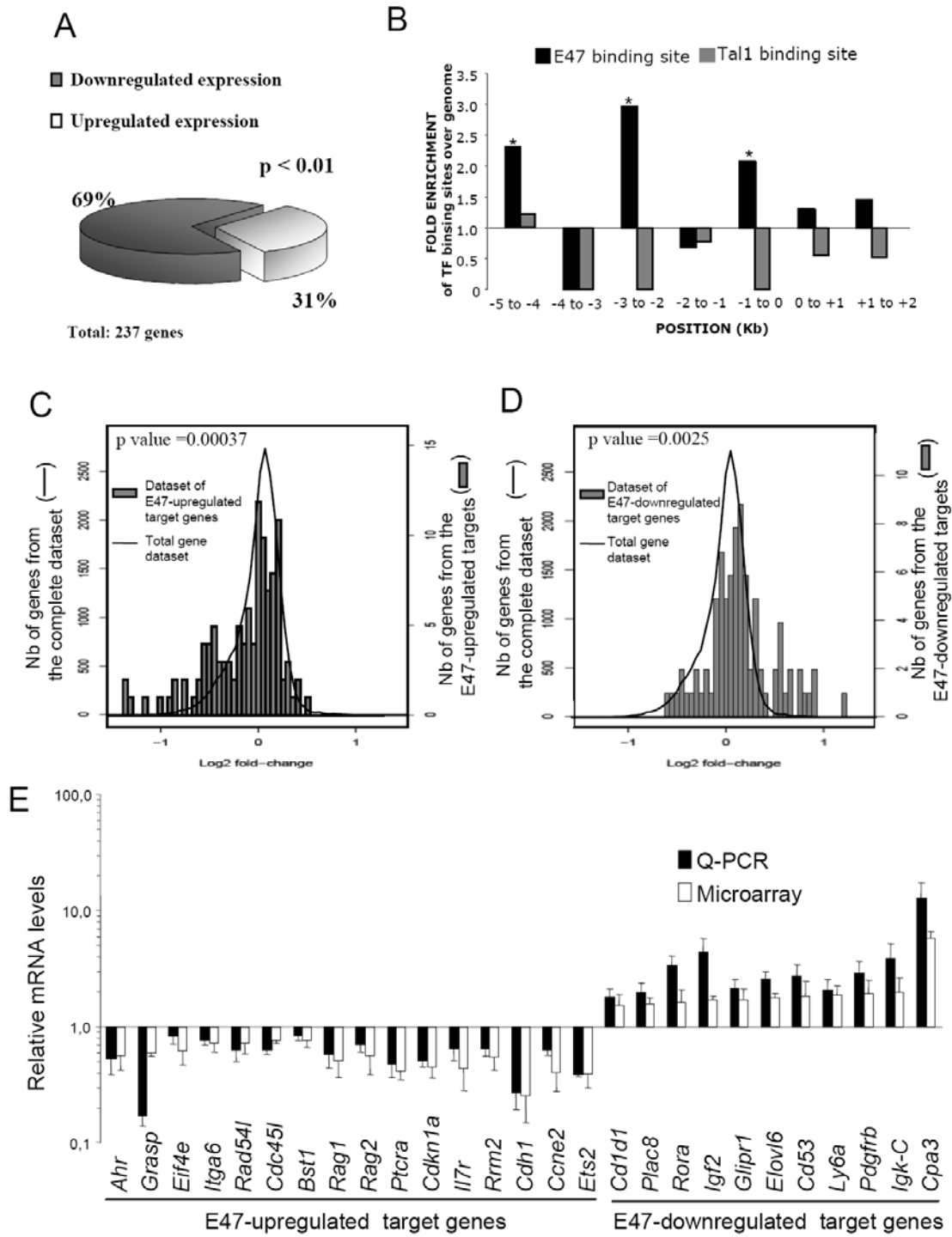


Figure 3.1

Figure 3.2. HEB, E47 and SCL occupy DNA of known E47-regulated genes.

A) HEB and E47 specifically associate to genomic regions upstream of genes significantly affected by *SCL* and *LMO1*. Chromatin immunoprecipitation assays were performed with the indicated antibody or control IgGs on AD10.1-MSCV and AD10.1-*SCL* crosslinked cellular extracts. The indicated regulatory regions were amplified by real-time PCR. Data are expressed as fold enrichment over control IgGs for both *SCL* expressing and control cells. The *Hprt* promoter region was amplified as a negative control (data not shown). B) SCL specifically occupies the upstream genomic region of genes affected by *SCL* and *LMO1*. ChIP assay were done as in A. Data are expressed as fold enrichment over control IgGs and represent the amount of DNA immunoprecipitated in *SCL* expressing cells over control cells.

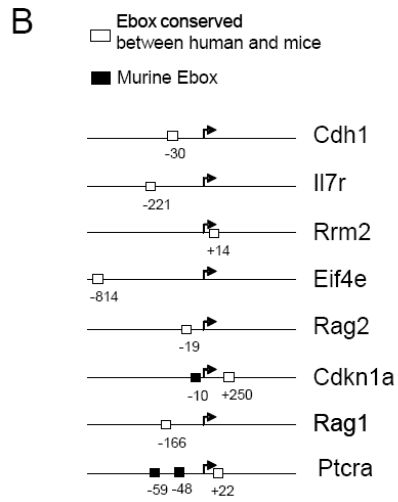
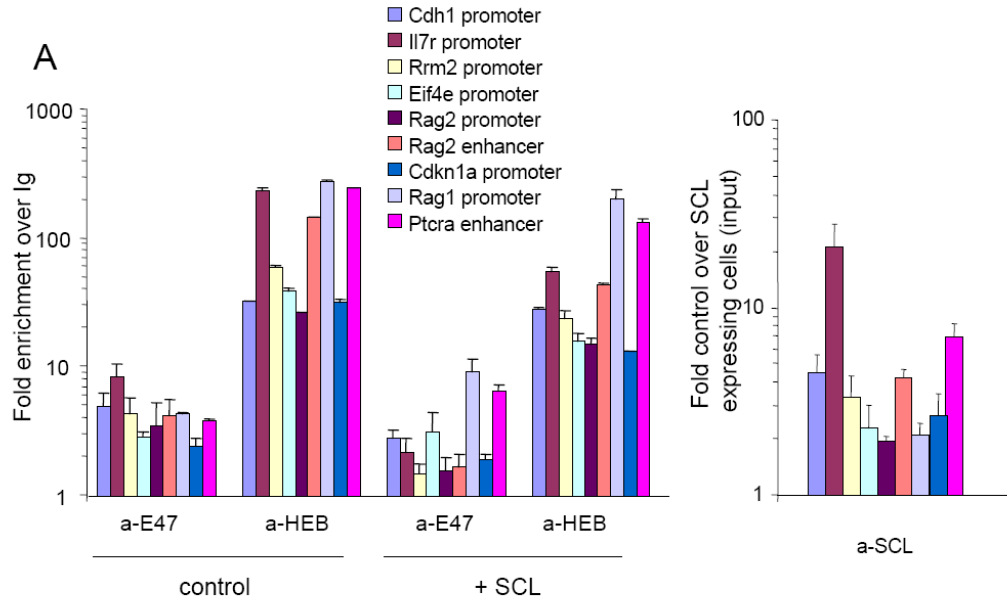


Figure 3.2

Figure 3.3. Identification of new target genes of HEB, E47 and SCL.

A) Representation of conserved E box sequences in regulatory region of *SCL-LMO1* affected genes. B) Effect of SCL and LMO1 overexpression on potential E47 target genes. Relative expression levels from microarray data as well as quantitative RT-PCR are shown as ratio of *Cd3ε*^{-/-} control thymus normalised to *Hprt* and represent the mean ± standard deviation of 3 independent RNA samples. C) Genomic upstream region of genes affected by *SCL* and *LMO1* are specifically occupied by E47, HEB and SCL. CHIP assay were done as in Fig. 3.2A. Data are expressed as fold enrichment over control IgGs.

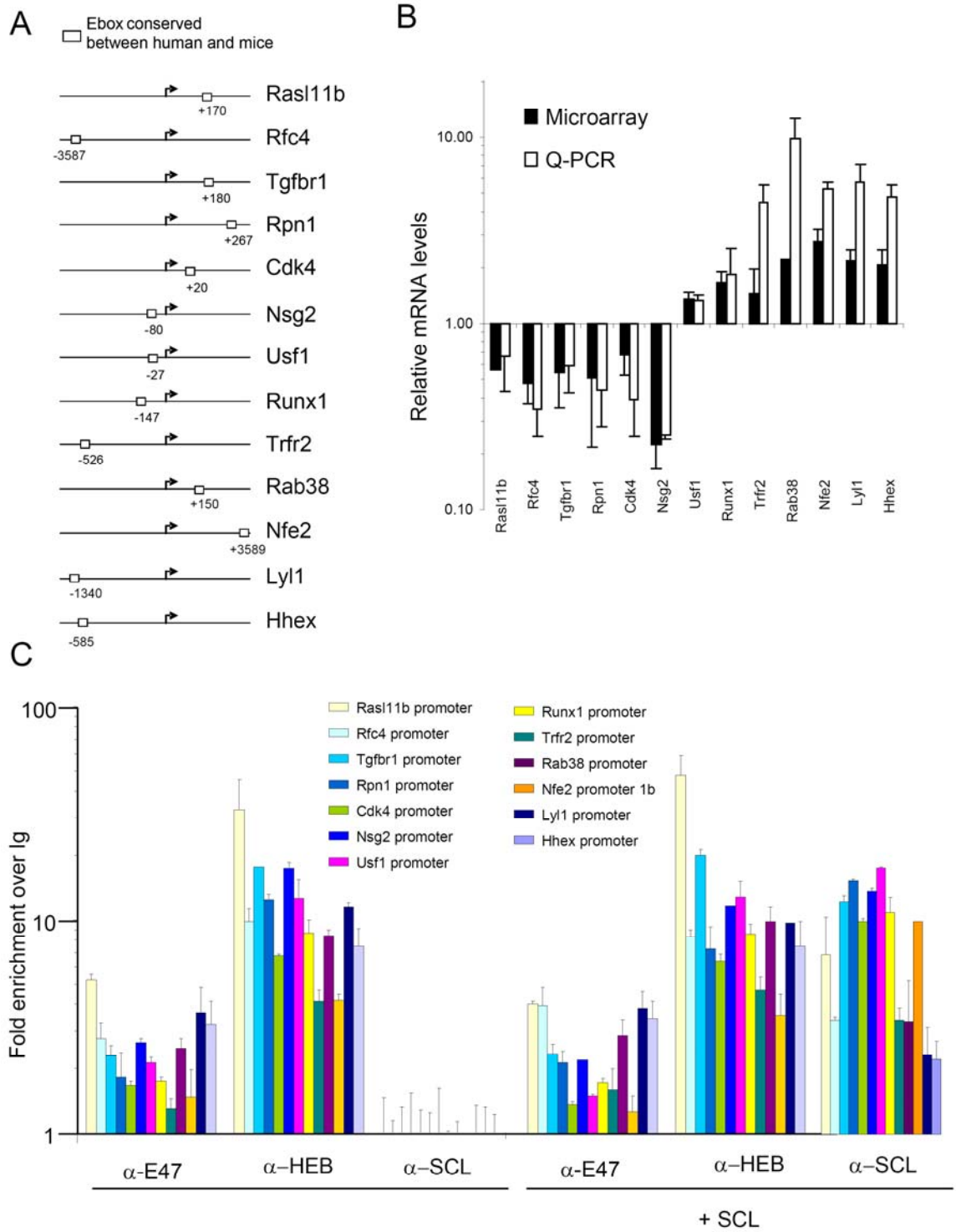


Figure 3.3

Figure 3.4. Effect of *E2a* and *Heb* allele loss on *SCL-LMO1* preleukemic phenotype.

A) *E2a* and *Heb* expression levels in the thymus of wild type and heterozygous mice were performed by quantitative RT-PCR. mRNA levels are shown as ratio of wild type and were normalized to *S16* control gene. B) Thymocyte differentiation scheme. C) Thymocytes from wild type, *E2a*^{+/-}, *Heb*^{+/-}, *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg}, *E2a*^{+/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} and *Heb*^{+/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} mice were stained with antibodies against CD25, CD44, CD4, CD8 and Thy1.2 and analysed by flow cytometry.

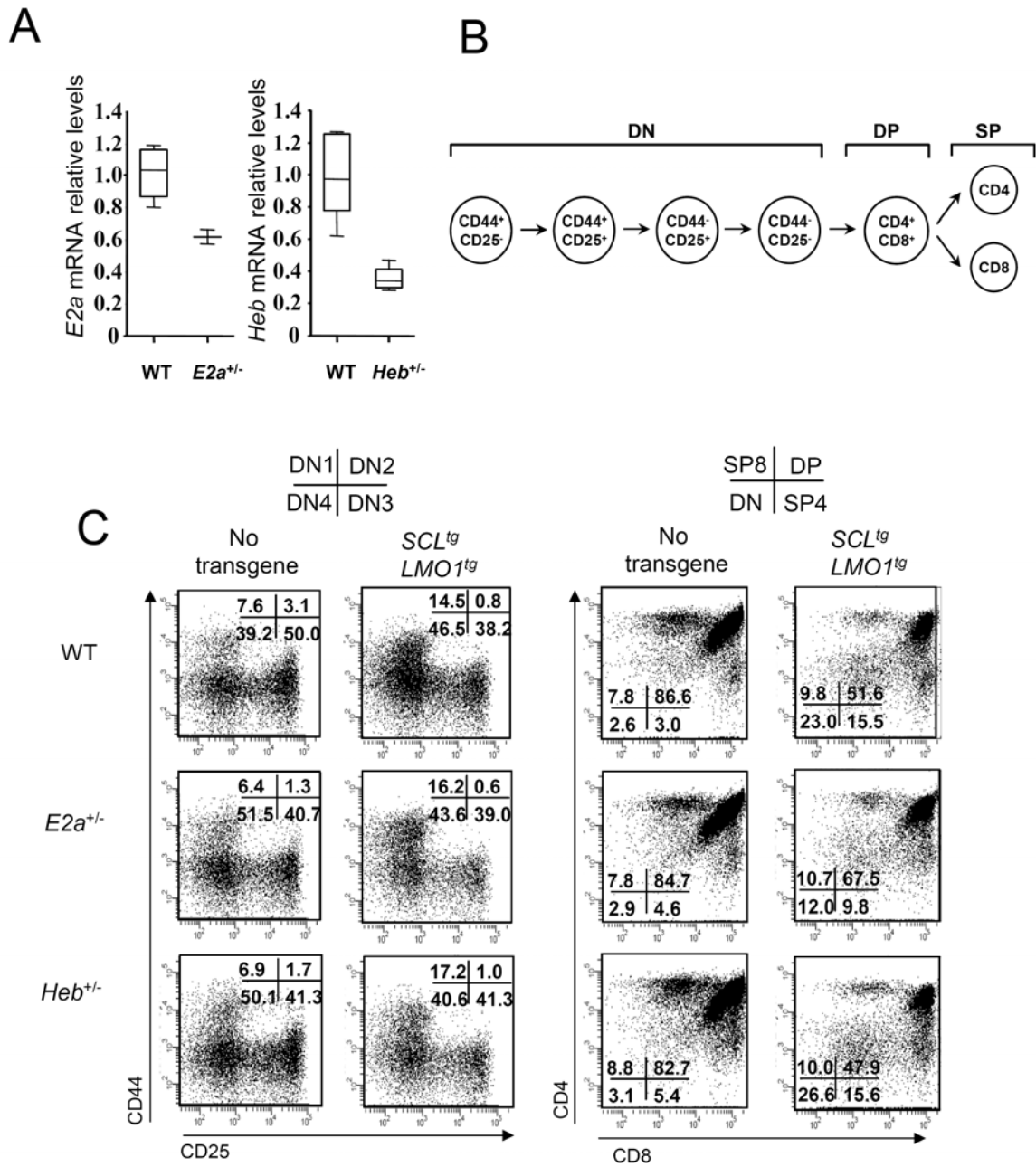


Figure 3.4

Figure 3.5. Genetic interaction between *Heb*, *E2a* and *SCL-LMO1* in leukemogenesis.

A) Kaplan-Meier curves of the time of onset to leukemia for *SCL^{tg}LMO1^{tg}*, *E2a^{+/-}* *SCL^{tg}LMO1^{tg}* and *Heb^{+/-}* *SCL^{tg}LMO1^{tg}* mice. A drop in the line represents the sacrifice or death of an animal diagnosed at necropsy with malignant thymic lymphoma. B) Survival analysis of *SCL^{tg}LMO1^{tg}* mice in wild type, *E2a^{+/-}* as well as *Heb^{+/-}* background. The number of weeks corresponding to 33% of survival is shown (* p<0.002; ** p<0.001). Cohorts of n mice were analysed per genotype. C) Immunostaining of representative *SCL-LMO1* induced leukemia. Flow cytometry analysis was performed on thymic lymphoma from *SCL^{tg}LMO1^{tg}*, *SCL^{tg}LMO1^{tg}* *Heb^{+/-}* and *SCL^{tg}LMO1^{tg}* *E2a^{+/-}* mice using antibodies against CD4, CD8 and Thy1.2.

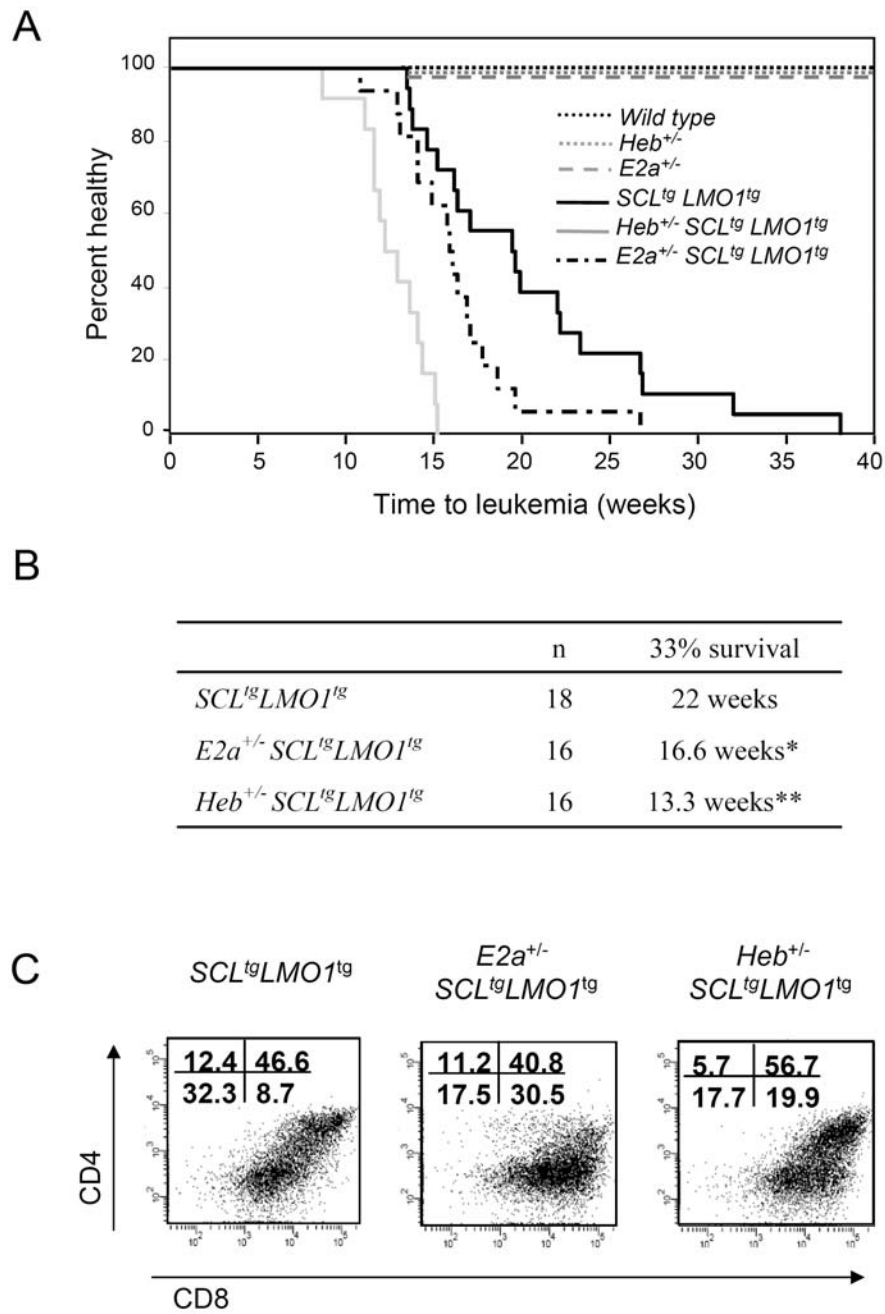
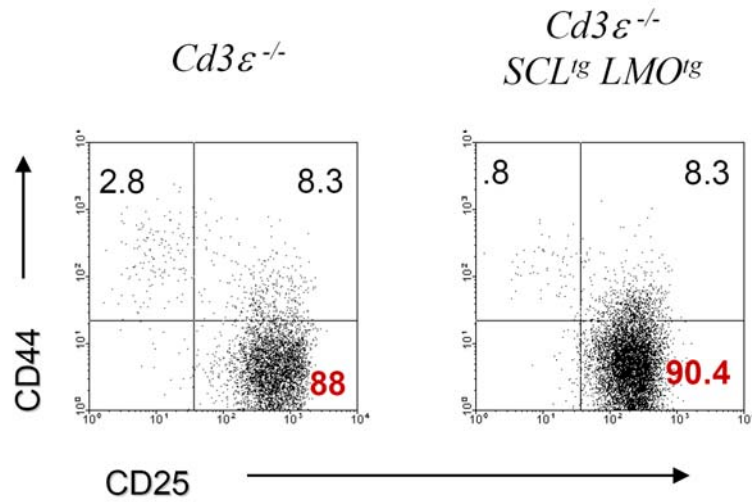


Figure 3.5

Figure 3.S1. Thymocyte population of in *Cd3ε*^{-/-} and *SCL^{tg}LMO1^{tg}Cd3ε^{-/-}*

A) Preleukemic thymocytes from wild type, *Cd3ε*^{-/-} and *SCL^{tg}LMO1^{tg}Cd3ε^{-/-}* mice were stained with antibodies against CD25, CD44, CD4, CD8 and Thy1.2 and analyzed by flow cytometry. B) Tranfac matrix used for promoter analysis.

A



B

Transcription factor	Transfa c matrix	Consensus sequence
E47	M00002	VSNGCAGGTGKNCNN
E47	M00071	NNNMRCAGGTGTTMNN
TAL1	M00065	NNNAACAGATGKTNNN
TAL1	M00066	NNNAACAGATGKTNNN

Figure 3.S1

Figure 3.S2. E proteins mRNA expression is not affected by SCL and LMO1 overexpression in the thymus.

A) Expression levels of E protein members is unaffected by *SCL-LMO1* overexpression in thymocyte. Microarray data and quantitative RT-PCR were done as in Figure 3.1E.

A

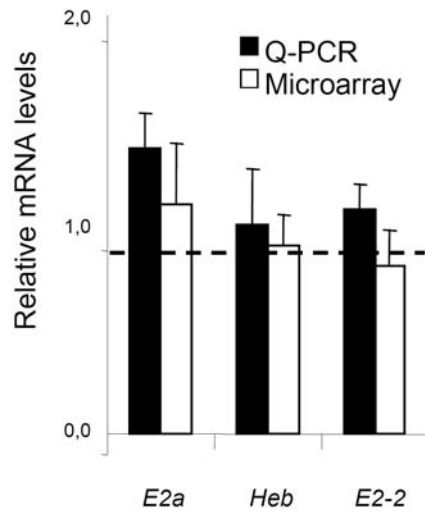


Figure 3.S2

3.8 Acknowledgments

We would like to thank Danièle Gagné (IRIC) for their assistance with cell sorting, Annie Perreault, Veronique Mercille and Veronique Litalien for mice handling, Phu Vinh On and Patrick Gendron for their assistance with bioinformatic analysis. The work was funded by grants from the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and the National Cancer Institute of Canada (NCIC). M. Tremblay and V. Lisi were supported by doctoral awards from the Canadian Institutes for Health Research, M. Todorova by a studentship by CRSNG, M. Desrosiers by a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and S. Herblot by a postdoctoral fellowship from the Leukemia Research Fund of Canada.

3.9 References

1. Look, A.T. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278**, 1059-64 (1997).
2. Begley, C.G. & Green, A.R. The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood* **93**, 2760-70 (1999).
3. Aplan, P.D. et al. Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity. *Science* **250**, 1426-9 (1990).
4. Begley, C.G. et al. Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2031-5 (1989).
5. Aplan, P.D., Raimondi, S.C. & Kirsch, I.R. Disruption of the SCL gene by a t(1;3) translocation in a patient with T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* **176**, 1303-10 (1992).
6. Aplan, P.D. et al. Involvement of the putative hematopoietic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **79**, 1327-33 (1992).
7. Kohn, D.B., Sadelain, M. & Glorioso, J.C. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer* **3**, 477-88 (2003).
8. Rabbitts, T.H. LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. *Genes Dev* **12**, 2651-7 (1998).
9. Rabbitts, T.H. et al. Chromosomal translocations and leukaemia: a role for LMO2 in T cell acute leukaemia, in transcription and in erythropoiesis. *Leukemia* **11 Suppl 3**, 271-2 (1997).
10. Aplan, P.D. et al. An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J* **16**, 2408-19 (1997).
11. Larson, R.C. et al. Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J* **15**, 1021-7 (1996).
12. Robb, L. et al. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7075-9 (1995).
13. Shivdasani, R.A., Mayer, E.L. & Orkin, S.H. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* **373**, 432-4 (1995).
14. Hall, M.A. et al. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 992-7 (2003).

15. Mikkola, H.K. et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* **421**, 547-51 (2003).
16. Goardon, N. et al. Ectopic expression of TAL-1 protein in Ly-6E.1-htal-1 transgenic mice induces defects in B- and T-lymphoid differentiation. *Blood* **100**, 491-500 (2002).
17. Herblot, S., Aplan, P.D. & Hoang, T. Gradient of E2A activity in B-cell development. *Mol Cell Biol* **22**, 886-900 (2002).
18. Herblot, S., Steff, A.M., Hugo, P., Aplan, P.D. & Hoang, T. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol* **1**, 138-44 (2000).
19. Warren, A.J. et al. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* **78**, 45-57 (1994).
20. Lecuyer, E. et al. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* **100**, 2430-40 (2002).
21. Ono, Y., Fukuhara, N. & Yoshie, O. TAL1 and LIM-only proteins synergistically induce retinaldehyde dehydrogenase 2 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by acting as cofactors for GATA3. *Mol Cell Biol* **18**, 6939-50 (1998).
22. Grutz, G., Forster, A. & Rabbitts, T.H. Identification of the LMO4 gene encoding an interaction partner of the LIM-binding protein LDB1/NLI1: a candidate for displacement by LMO proteins in T cell acute leukaemia. *Oncogene* **17**, 2799-803 (1998).
23. Tremblay, M., Herblot, S., Lecuyer, E. & Hoang, T. Regulation of pT alpha gene expression by a dosage of E2A, HEB, and SCL. *J Biol Chem* **278**, 12680-7 (2003).
24. Chervinsky, D.S. et al. Disordered T-cell development and T-cell malignancies in SCL LMO1 double-transgenic mice: parallels with E2A-deficient mice. *Mol Cell Biol* **19**, 5025-35 (1999).
25. Ono, Y., Fukuhara, N. & Yoshie, O. Transcriptional activity of TAL1 in T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) requires RBTN1 or -2 and induces TALLA1, a highly specific tumor marker of T-ALL. *J Biol Chem* **272**, 4576-81 (1997).
26. Quong, M.W., Romanow, W.J. & Murre, C. E protein function in lymphocyte development. *Annu Rev Immunol* **20**, 301-22 (2002).
27. Barndt, R.J., Dai, M. & Zhuang, Y. Functions of E2A-HEB heterodimers in T-cell development revealed by a dominant negative mutation of HEB. *Mol Cell Biol* **20**, 6677-85 (2000).
28. Bergqvist, I. et al. The basic helix-loop-helix transcription factor E2-2 is involved in T lymphocyte development. *Eur J Immunol* **30**, 2857-63 (2000).
29. Schwartz, R., Engel, I., Fallahi-Sichani, M., Petrie, H.T. & Murre, C. Gene expression patterns define novel roles for E47 in cell cycle progression, cytokine-mediated signaling, and T lineage development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9976-81 (2006).

30. Ikawa, T., Kawamoto, H., Goldrath, A.W. & Murre, C. E proteins and Notch signaling cooperate to promote T cell lineage specification and commitment. *J Exp Med* **203**, 1329-42 (2006).
31. Xu, W. & Kee, B.L. Growth factor independent 1B (Gfi1b) is an E2A target gene that modulates Gata3 in T-cell lymphomas. *Blood* **109**, 4406-14 (2007).
32. Yang, Y. et al. The E47 transcription factor negatively regulates CD5 expression during thymocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3898-902 (2004).
33. Kee, B.L., Bain, G. & Murre, C. IL-7Ralpha and E47: independent pathways required for development of multipotent lymphoid progenitors. *EMBO J* **21**, 103-13 (2002).
34. Xu, Y., Davidson, L., Alt, F.W. & Baltimore, D. Function of the pre-T-cell receptor alpha chain in T-cell development and allelic exclusion at the T-cell receptor beta locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2169-73 (1996).
35. Haks, M.C., Krimpenfort, P., Borst, J. & Kruisbeek, A.M. The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalphabeta and TCRgammadelta lineages. *EMBO J* **17**, 1871-82 (1998).
36. Wang, B. et al. T lymphocyte development in the absence of CD3 epsilon or CD3 gamma delta epsilon zeta. *J Immunol* **162**, 88-94 (1999).
37. Lahlil, R., Lecuyer, E., Herblot, S. & Hoang, T. SCL assembles a multifactorial complex that determines glycoporphin A expression. *Mol Cell Biol* **24**, 1439-52 (2004).
38. Smyth, G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**, Article3 (2004).
39. Chervinsky, D.S., Lam, D.H., Melman, M.P., Gross, K.W. & Aplan, P.D. scid Thymocytes with TCRbeta gene rearrangements are targets for the oncogenic effect of SCL and LMO1 transgenes. *Cancer Res* **61**, 6382-7 (2001).
40. O'Neil, J., Shank, J., Cusson, N., Murre, C. & Kelliher, M. TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB. *Cancer Cell* **5**, 587-96 (2004).
41. Goardon, N. et al. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J* **25**, 357-66 (2006).
42. Lecuyer, E. et al. Protein stability and transcription factor complex assembly determined by the SCL-LMO2 interaction. *J Biol Chem* **282**, 33649-58 (2007).
43. Xu, Z., Huang, S., Chang, L.S., Agulnick, A.D. & Brandt, S.J. Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol Cell Biol* **23**, 7585-99 (2003).
44. Vitelli, L. et al. A pentamer transcriptional complex including tal-1 and retinoblastoma protein downmodulates c-kit expression in normal erythroblasts. *Mol Cell Biol* **20**, 5330-42 (2000).
45. Tripic, T. et al. SCL and associated proteins distinguish active from repressive GATA transcription factor complexes. *Blood* **113**, 2191-201 (2009).

46. Hsu, H.L. et al. Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* **14**, 1256-65 (1994).
47. O'Neil, J., Billa, M., Oikemus, S. & Kelliher, M. The DNA binding activity of TAL-1 is not required to induce leukemia/lymphoma in mice. *Oncogene* **20**, 3897-905 (2001).
48. Capron, C. et al. The SCL relative LYL-1 is required for fetal and adult hematopoietic stem cell function and B-cell differentiation. *Blood* **107**, 4678-86 (2006).
49. Zhong, Y., Jiang, L., Hiai, H., Toyokuni, S. & Yamada, Y. Overexpression of a transcription factor LYL1 induces T- and B-cell lymphoma in mice. *Oncogene* **26**, 6937-47 (2007).
50. Mellentin, J.D., Smith, S.D. & Cleary, M.L. lyl-1, a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif. *Cell* **58**, 77-83 (1989).
51. Ferrando, A.A. et al. Biallelic transcriptional activation of oncogenic transcription factors in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **103**, 1909-11 (2004).
52. Guo, Y. et al. The homeoprotein Hex is required for hemangioblast differentiation. *Blood* **102**, 2428-35 (2003).
53. Bedford, F.K., Ashworth, A., Enver, T. & Wiedemann, L.M. HEX: a novel homeobox gene expressed during haematopoiesis and conserved between mouse and human. *Nucleic Acids Res* **21**, 1245-9 (1993).
54. Mack, D.L. et al. Down-regulation of the myeloid homeobox protein Hex is essential for normal T-cell development. *Immunology* **107**, 444-51 (2002).
55. George, A., Morse, H.C., 3rd & Justice, M.J. The homeobox gene Hex induces T-cell-derived lymphomas when overexpressed in hematopoietic precursor cells. *Oncogene* **22**, 6764-73 (2003).
56. Kim, D., Peng, X.C. & Sun, X.H. Massive apoptosis of thymocytes in T-cell-deficient Id1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* **19**, 8240-53 (1999).
57. Hsu, H.L., Wadman, I., Tsan, J.T. & Baer, R. Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop-helix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5947-51 (1994).
58. Wojciechowski, J., Lai, A., Kondo, M. & Zhuang, Y. E2A and HEB are required to block thymocyte proliferation prior to pre-TCR expression. *J Immunol* **178**, 5717-26 (2007).

4 Collaboration between the oncogenic transcription factors *SCL* and *LMO1* and signaling pathways in leukemogenesis: A role for *pre-TCR* signaling and *Notch1*

Mathieu Tremblay¹, Sabine Herblot¹, Josée Hébert³ and Trang Hoang^{1,2}

¹Institute of Research in Immunology and Cancer – University of Montreal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

²Pharmacology, Biochemistry, Medicine and Molecular Biology Departments, Faculty of Medicine, University of Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

³Banque de Cellules Leucémiques du Québec, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Québec, Canada, H1T 2M4

4.1 Contribution des co-auteurs

M.T.: Design expérimental, réalisation des expériences et analyse des données et rédaction du manuscrit.

S.H : Design expérimental, contribution aux expériences des Figure 4.1A, 4.3A et 4.S1 et analyse des données et rédaction du manuscrit.

J.H: Contribution aux expériences des Figure 4.3A-B.

T.H : Design expérimental, analyse et rédaction du manuscrit.

This chapter corresponds to a manuscript to be submitted.

4.2 Summary

Tumors have distinctive histological characteristics but the process of cell type-specific transformation remains to be elucidated. The genes encoding the *TAL1/SCL* and *LMO1/2* oncogenic transcription factors are recurring targets of chromosomal translocations in T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and the two genes genetically interact to induce T-ALL in transgenic mice. We provide genetic evidence that pre-TCR signaling collaborates with *SCL-LMO1* to accelerate leukemia onset and to induce full penetrance in transgenic mice. In contrast, antigen-dependent TCR signaling does not collaborate with these oncogenes. *Notch1* drives the T versus B cell fate and the *NOTCH1* gene is activated in almost all cases of pediatric T-ALL. We found that activating *Notch1* mutations and the expression of NOTCH1 target genes co-segregate with competence for pre-TCR signaling in our transgenic model of T-ALL, i.e. *Cd3ε*-deficient T-ALL do not harbour activating *Notch1* mutations and express lower levels of NOTCH1 target genes as compared to *Cd3ε*-proficient T-ALL. Our observations suggest that *Notch1* mutants and the pre-TCR operate in the same genetic pathway to collaborate with the *SCL-LMO1* oncogenes in T-ALL. Since NOTCH1 and the pre-TCR are critical for the α/β T lineage, our studies are consistent with the view that cell-type specific transformation can result from the collaboration between oncogenic transcription factors and signaling pathways that determine cell fate.

4.3 Introduction

Studies of human cancers and various strategies in mice have converged on identifying cooperating sets of oncogenes that transform normal cells into fully metastasizing cancer cells (1,2). The classical cooperation between activated RAS and the nuclear oncoprotein MYC (3) establishes the paradigm that aberrant signaling enhances the transforming ability of oncogenic transcription factors in primary cells. Pathways to cell transformation minimally involve “enhanced self-renewal capacity, increase in autonomous growth and, ultimately, escape from terminal differentiation” (4). In principle, two genes with the same biological outcome do not collaborate with each other and are considered part of the same complementation group. Retroviral tagging strategies revealed that some mutations are mutually exclusive, such as *c-Myc* and *N-Myc*, indicating that mutations of *N-Myc* are not selected for when *c-Myc* is activated. However, both *c-Myc* and *N-Myc* collaborate with *Pim1*, encoding a Ser/Thr kinase, hence establishing *c-Myc* and *N-Myc* as part of the same complementation group, and *Pim1* as belonging to a separate complementation group. While these models provide important frameworks to understanding the process of cell transformation, it remains to be elucidated how tumors acquire distinctive histological features, which often translate into distinct clinical outcomes. One mechanism that was previously shown for acute promyelocytic leukemia involves the collaboration between the primary oncogene, *PLZF-RAR α* , and the tumor modifier gene, *RAR α -PLZF*, that transforms a chronic myeloid leukemia into APL (5).

T cell maturation critically depends on the expression of functional T cell receptors (TCR) and, in the $\alpha\beta$ lineage, follows a phase of intense cell proliferation controlled by the pre-TCR, at the β -selection checkpoint. The association between the pre-T α polypeptide (pT α), the rearranged TCR β chain and CD3 signaling molecules, that forms the pre-TCR, allows for cell survival and proliferation, as well as progression from the CD4⁻CD8⁻ double negative (DN) to the CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) stages (6). A pre-T cell receptor

lacking the TCR beta variable domain cause an expansion of the DP population that precedes overt T cell leukemia, suggesting that abnormal pre-TCR function can be oncogenic (7). Recent evidence suggests that the pre-TCR signal is important for *NOTCH3*- and *TEL-JAK2*-induced leukemias (8,9), suggesting that developmental processes required for normal differentiation can be implicated in the pathogenesis of T-ALL. However, the pre-TCR is dispensable for T-ALL induced by *E47*- or *Trp53*-deficiency (10,11). Hence, the importance of the pre-TCR in T cell transformation induced by oncogenic events remains to be clarified.

Notch1 signaling regulates the T- versus B-cell fate choice in pre-thymic progenitors (12,13) and is therefore critical for T cell development. *Notch1* has been shown to cooperate with *E2a* to specify T lineage commitment (14) and regulates the expression of important genes such as *Hes1* and *Ptcra* (14). Moreover, activating mutations in the *Notch1* gene are found in more than 80% of *SCL-LMO1* leukemias in both human and mice (15,16). *NOTCH1* mutations frequently result in the production of the intracellular domain of NOTCH1 (ICN1), which is constitutively active in the absence of ligand, or mutations in the C-terminal PEST domain that stabilizes ICN1.

The *SCL* (*SCL*) gene encodes a class II tissue specific basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor and is frequently activated by chromosomal rearrangements in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia (17). In addition, *SCL* gene expression is abnormally high in 40-60% childhood T-ALL lacking rearrangement at the *SCL* locus (18,19). While *SCL* function is essential to specify hematopoietic precursors during development (reviewed by (17,20,21), to drive terminal erythroid and megakaryocyte differentiation in the adult (22,23), *SCL* expression has to be down-regulated for proper lymphoid differentiation (24-26). Similarly to *SCL*, *LMO1/2* proteins are frequently involved in childhood T cell leukemogenesis (27,28). Furthermore, *LMO1* or *LMO2* cooperate with *SCL* to induce T-ALL in transgenic mice (29,30), suggesting that *SCL* and

LMO1/2 belong to two separate complementation groups. Nonetheless, *SCL-LMO1/2* are not sufficient *per se* to induce leukemia in transgenic mice, as evidenced by a variable latency before leukemia onset.

In the present study, we investigated the collaborating events in *SCL-LMO1*-induced T-ALL using a transgenic mouse model that closely reproduces the human disease.

4.4 Experimental procedures

Mouse models

We used the previously described A(5)3SCL (*SCL*^{Tg}) and lck-LMO1 (*LMO1*^{Tg}) transgenic mouse lines (29). Both mouse lines were backcrossed onto a C57BL6/J background for more than 12 generations. *Rag1*^{-/-} mice from Jackson laboratory and *Cd3ε*^{-/-} mice from P. Hugo (31) were on a C57BL6/J background. *Abb*^{-/-}*B2m*^{-/-} mice were on a C57BL6/J background and purchased from Taconic. All animals were maintained in pathogen-free conditions according to institutional animal care and use guidelines.

Notch1 sequencing

Amplification of *Notch1* exons 26, 27, and 34 from cDNA of tumor cells was performed by PCR. Amplification products were sequenced in both directions. Residues are numbered according to their location in *Notch1* sequence (Ensembl sequence ENSMUSG00000026923).

Clonality analysis

Genomic DNA was obtained from proteinase K, phenol/chloroform extraction. *Tcrb* rearrangements were determined by PCR amplification using primers, followed by 1.2% agarose gel electrophoresis.

RNA analysis

Total RNAs were prepared from 10,000 sorted cells as previously described (26). Primer sequences used for specific mRNA amplification are available upon request. For real-time quantitative PCR, we used Sybergreen detection kits (Qiagen, Mississauga, ON) according to the manufacturer's instructions and the Stratagene Mx3000 apparatus (Stratagene, La Jolla, CA).

Western blot analysis

Total thymus or DN purified subsets from wild type or *Cd3ε*^{+/-} mice were lysed in RIPA buffer containing a cocktail of protease inhibitors. Protein extracts were resolved on a 12% SDS-PAGE, transferred on PVDF membranes and hybridized with antibodies against CD3ε or PTP1D (Santa-Cruz Biotechnology Inc., CA).

4.5 Results

4.5.1 pre-TCR deficiency delays leukemia onset in *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} mice

Global gene profiling of childhood T-ALL patient samples indicated that high *SCL* expression is associated with high TCR expression (18). We therefore addressed the question whether pre-TCR or TCR signaling could contribute to *SCL*-dependent leukemias. The pre-TCR and TCR require association with the CD3 complex for signaling (31). To directly address the importance of pre-TCR/TCR signaling, we crossed *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} mice with *Cd3ε*-deficient mice. Normally, *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} mice develop T-ALL with 100 % penetrance between 3 and 6 months. However, on a *Cd3ε*^{-/-} background, the kinetics of onset of *SCL*-*LMO1*-induced leukemia was delayed by 224 days when compared to *Cd3ε*^{+/+} littermates (Figure 4.1A). Furthermore, the penetrance of the disease decreased by 50%. These results indicate a strong genetic interaction between the *SCL*-*LMO1* oncogenes and *Cd3ε*. These results differ to some extent with the recent report by Fasseu et al. showing a complete dependence of *SCL*-*LMO1*-induced leukemogenesis on CD3ε signaling (32). This discrepancy is currently unresolved but could be due to differences in genetic backgrounds. All our mice have been backcrossed on a C57BL6 background for more than 10 generations, excluding the possibility that differences between *Cd3ε*^{+/+} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} and *Cd3ε*^{-/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} mice could be due to background variations brought about by the crosses. Together, these observations indicate that pre-TCR/TCR signaling collaborates with the *SCL*-*LMO1* oncogenes to accelerate and increase the penetrance of leukemia.

Cd3ε is haplosufficient for thymocyte differentiation (31), and immunostaining analysis of thymocytes from mice lacking one *Cd3ε* allele did not reveal any alteration in thymocyte subsets nor thymocyte numbers (data not shown). We therefore addressed the question whether the requirement in *Cd3ε* for *SCL-LMO1*-induced leukemogenesis is dose-dependent. Surprisingly, leukemia onset in *Cd3ε*^{+/-}*SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} mice was intermediate between *Cd3ε*^{+/+} and *Cd3ε*^{-/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} littermates, with 26% survival at 175 days compared to 94% in *Cd3ε*^{-/-} and 0% in *Cd3ε*^{+/+} (Figure 4.1C). This *Cd3ε* haploinsufficiency correlates with a two-fold decreased *Cd3ε* mRNA and protein levels, as assessed by quantitative RT-PCR analysis (Figure 4.S1A) and by Western blot analysis using protein extracts prepared from total thymi or DN purified thymocytes, respectively (Figure 4.S1B). CD3ε-surface expression assessed by flow cytometry was also decreased in both CD3ε^{int} and CD3ε^{hi} populations from *Cd3ε*^{+/-} thymus as compared to *Cd3ε*^{+/+} thymus (Figure 4.S1C). Together, these observations reveal that *Cd3* is haploinsufficient in *SCL-LMO1*-dependent leukemogenesis. Furthermore, the threshold for CD3 signaling in thymocyte differentiation is lower than that required for collaboration with the *SCL* and *LMO1* oncogenes.

Previous reports indicate that *Cd3ε* deletion also affects *Cd3δ* expression (31). To exclude the possibility that other genes outside of the pre-TCR/TCR pathway might be affected by this deletion, we took an independent genetic approach with *Rag1*-deficient mice in which T cell differentiation is arrested at the DN3 stage because of the absence of a rearranged TCRβ chain. We therefore crossed *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} mice with *Rag1*^{-/-} mice and observed leukemia development (Figure 4.1B). Interestingly, *Rag1*-deficient mice expressing the *SCL-LMO1* oncogenes develop leukemia with a similar kinetic as *Cd3ε*^{-/-}*SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} mice. Of note, the survival curves for *Rag1*^{-/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} and *Cd3ε*^{-/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} mice are almost superimposable. *Rag1*^{-/-} cells are unable to rearrange their *Tcr* genes and

therefore unable to express either the pre-TCR, the TCR α/β or γ/δ , whereas *Cd3*-deficient cells have non-functional pre-TCR/TCRs. Together, our observations concur to indicate the importance of pre-TCR/TCR signaling as a collaborating event with the *SCL* and *LMO1* oncogenes. Moreover, the observations that T-ALL still develop in *Cd3 ϵ ^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* and *Rag1^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* mice indicate that the cellular target of transformation of the *SCL-LMO1* oncogenes are in this case immature pro-T cells before the β -selection checkpoint and, therefore, that the cellular target of these oncogenes is not a pre-T cell.

4.5.2 MHC-mediated antigen presentation deficiency do not affect leukemia onset in *SCL^{tg}LMO1^{tg}* mice

Activation of TCR signaling is dependent on either MHC class I or MHC class II antigen presentation by APC (33,34) whereas the pre-TCR is antigen-independent (35,36). To directly address the functional importance of the TCR, *SCL^{tg}LMO1^{tg}* mice were crossed with mice deficient for the β 2-microglobuline gene (*β 2m*) and for the *H2-Ab1* gene (*Abb*). These mice are MHC class I and class II deficient, respectively (37,38) and are therefore deficient for antigen-presentation. In *Abb^{-/-}/ β 2m^{-/-}* mice, the kinetics of *SCL-LMO1*-induced leukemia was not affected when compared to wildtype littermates (Figure 4.1B). These results indicate that the collaboration between CD3 and the *SCL-LMO1* oncogenes is antigen-independent and therefore, that pre-TCR and not TCR signaling collaborates with the *SCL-LMO1* oncogenes to accelerate and increase the penetrance of leukemia.

4.5.3 Co-segregation between *Cd3* and *Notch1* mutations in *SCL*-dependent leukemogenesis.

To further assess whether other genetic events might collaborate with the *SCL-LMO1* oncogenes, we perform cytogenetic analysis of tumors from *SCL^{tg}LMO1^{tg}* by SKY and G-banding. This analysis revealed that a majority of tumors exhibit a normal karyotype

(Figure 4.2C). One out of four tumors showed the presence of trisomies of chromosomes 7 and/or 16 (Figure 4.2A-B). Thus, the absence of gross structural anomaly indicates that the *SCL-LMO1* oncogenes do not cause major chromosomal instability.

In addition to chromosomal translocations, genes that control thymocyte development are often deregulated by mutations in T-ALL, as exemplified by the frequent occurrence of *Notch1* mutations. We therefore sequenced the *Notch1* protooncogene from *SCL-LMO1* leukemias arising in *Cd3ε^{+/+}* and *Cd3ε^{-/-}* mice. We found mutations in the PEST domain of *Notch1* in 4 out of 5 *Cd3ε^{+/+}* leukemias. These frame shift insertions and mutations disrupt the PEST domain of NOTCH1 and may stabilize the protein. No PEST domain mutation was found in sample #241 from a *Cd3ε^{+/+}* mouse. In contrast, no mutation was detected in 7 different *Cd3ε^{-/-}* leukemias induced by *SCL-LMO1*. Together, these observations indicate that in the absence of pre-TCR signaling, *Notch1* mutations are not selected for, consistent with the view that Notch and the pre-TCR operate in the same genetic pathway.

We therefore verified the expression of a subset of NOTCH1 target genes in *SCL-LMO1* induced leukemias. As shown in Figure 4.3, mRNA expression levels of *Hes1*, *Hes5*, *Hey1*, *Nrarp* were consistently lower in *Cd3ε^{-/-}* tumor samples, while their expression levels were higher in *Cd3ε^{+/+}* tumors. Two other target genes, *Cdkn1a* and *Dtx1*, were also lower in *Cd3ε^{-/-}* leukemias, although these two genes exhibit higher sample to sample variations. These results suggest that NOTCH1 activity is higher in *Cd3ε^{+/+}* tumors and correlates with our finding that *Notch1* activating mutations are present in *Cd3ε^{+/+}* *SCL-LMO1* but not in *Cd3ε^{-/-}* *SCL-LMO1* leukemias. In contrast, most other genes that are important regulators of T cell development and functions (data not shown) were not affected by the absence of *Cd3ε* in leukemic cells, indicating specific modulation of *Notch1* targets.

4.6 Discussion

Using a genetic approach, we provide evidence that pre-TCR signaling collaborates with the *SCL-LMO1* oncogenes in leukemogenesis and that *Notch1* and the pre-TCR operate in the same pathway in this process..

4.6.1 The pre-TCR as a collaborating event in leukemogenesis

Primary oncogenic events, such as those triggered by chromosomal translocations are generally insufficient by themselves to cause leukemias and require secondary cooperative mutations to fully transform cells. These collaborating events may be different, depending on the initiating cytogenetic event and on the target cell of transformation. Global gene-expression profiling has the potential to reveal new dimensions of the pathologic features of ALL and to identify such collaborating events, as exemplified by the identification of high *Flt3* levels in cases of T-ALL with *MLL* rearrangements (39). These observations combined with *in vitro* studies have led to clinical trials that include FLT3 inhibitors in primary infant and childhood *MLL*-rearranged ALL (39-41). Similarly, the discovery of the high frequency of *Notch1* activating mutations in human T-ALL cases (15,42) led to clinical trial of γ -secretase inhibitor in this pathology.

We identified the pre-TCR pathway as an important collaborating event in *SCL*-induced T-ALL. Our genetic approach using *Cd3 ϵ* -deficient mice in which the pre-TCR or TCR signal is abrogated provides direct evidence for an important role for the pre-TCR in *SCL*-dependent leukemogenesis. The functional importance of the pre-TCR in leukemogenesis has been previously reported in *Notch3*- (8) and *TEL-JAK2*-transgenic mouse models (9) as well as in *Ikaros*-deficient mice (43). In contrast, pre-TCR signaling is dispensable in T-ALL induced by loss of *Atm* or *Trp53* (10,44), suggesting that pre-TCR signaling is parallel to or upstream of *Trp53* inactivation in leukemogenesis. In addition, loss of *Trp53* (45) or an active pre-TCR signaling ((32), the present study) accelerates *SCL*-dependent

leukemias. Together, these observations are consistent with the view that pre-TCR signaling and *Trp53* belong to the same complementation group, and suggest that the pre-TCR may be upstream of *Trp53*, as has been shown for the TCR. Nonetheless, using the *Abb^{-/-}β2m^{-/-}* mice, we show that antigen-dependent TCR signaling does not collaborate with the *SCL-LMO1* oncogenes, suggesting that pre-TCR signaling may involve additional molecular pathways.

Activating *Notch1* mutations are frequent occurrence in T-ALL and have been shown to confer transplantability of *SCL-LMO1*-induced leukemias (46). Here, we find activating *Notch1* mutations in *Cd3ε^{+/+}* but not *Cd3ε^{-/-}* leukemias, suggesting that *Notch1* mutations are selected for in pre-TCR-proficient cells exclusively. We therefore infer that activating *Notch1* mutations and the pre-TCR operate within the same genetic pathway that collaborates with the *SCL-LMO1* oncogenes. The *pTα* gene is a direct NOTCH target (47) and the pre-TCR is essential for *NOTCH3*-induced leukemias (8). Together, these observations place the pre-TCR downstream of NOTCH in T-ALL, consistent with the view that pre-TCR signaling, *Notch1/3* and *Trp53* inactivation may belong to the same complementation group that collaborates with the *SCL* and *LMO1* oncoproteins in T-ALL. Consistent with this, *Notch1* has been shown to down-regulate *Trp53* in an Arf-independent manner (48). *SCL-LMO1/2* and *Myc* are considered master oncogenes in T-ALL (49) and previous work places *Myc* downstream of NOTCH1 (50-52). As a corollary, *Notch1* and *Myc* mutations are mutually exclusive in large scale insertional mutagenesis screens (53) It will be interesting to assess whether *c-Myc* collaborates or not with the *SCL* and *LMO1/2* oncogenes.

4.6.2 Target cell of transformation

The nature of the target cells of transformation by oncoproteins remains an open question. The fact that cancer results from multiple genetic hits (2) argues for the likelihood that the

initiating event must occur in a cell with extended life span to acquire additional genetic anomalies. Acute leukemias can be broadly classified into distinct morphological subtypes associated with characteristic cell surface phenotypes. It was therefore commonly held that the tumor phenotype reflects the identity of the cell of origin. However, the cellular phenotype can be modified by oncogenes. For instance, expression of *BCL2* or *NOTCH1/3* is sufficient to allow for DN to DP progression in the absence of pre-TCR signaling in several transgenic mouse models (54,55). Similarly, the inhibition of E-proteins function in the thymus induces the DN to DP transition in the absence of the pre-TCR signal (56). Consistent with this, our observations indicate that ectopic expression of the *SCL-LMO1* oncogenes in the thymus of *Rag1*- or *Cd3ε*-deficient mice induce tumors that are DP or immature SP CD8⁺ cells, even though these thymocytes should be arrested at the DN3 stage due to pre-TCR deficiency. The DP population is transient in the thymus and most of DP thymocytes are eliminated by apoptosis. Thus, even if oncogene activation can occur in these cells, the probability of survival and subsequent clonal evolution is limited. Our genetic approach indicates that the *SCL-LMO1* oncogenes can transform DN3 cells or earlier stages. Interestingly, DN1/2 cells have a high proliferative potential in the thymus and may therefore represent cellular targets of transformation. Indeed, DN1/ETP thymocytes have a high proliferative potential with a capacity to expand 10000 fold (57) and therefore represent an attractive target population for oncogenic transformation. Collaborating events could occur in these cells or at later stages when the pre-TCR is active. In support for this hypothesis, expression of the intra-cellular domain of *NOTCH1* in bone marrow cells has been shown to induce monoclonal tumors characterized by a unique TCR-beta chain and diverse TCR-alpha chains, suggesting that transformation occurs at a stage after or concomitant to pre-TCR signaling (52).

4.7 Figure

Figure 4.1. Tumor incidence is specifically delayed in the absence of pre-TCR signaling.

A) Kaplan-Meier curves of the time to leukemia for $SCL^{tg}LMO1^{tg}$, $Cd3\epsilon^{+/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}$ and $Cd3\epsilon^{-/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}$ mice. A drop in the line represents the sacrifice or death of an animal diagnosed at necropsy with malignant thymic lymphoma. B) Survival curves of $SCL^{tg}LMO1^{tg}$, $Rag1^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}$ and $Abb^{-/-}B2m^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}$ mice as assessed in Figure 4.1A. C) Survival analysis. The median survival and the percentage survival at 175 days are shown (* $p < 0.001$). Cohorts of n mice were analyzed per genotype.

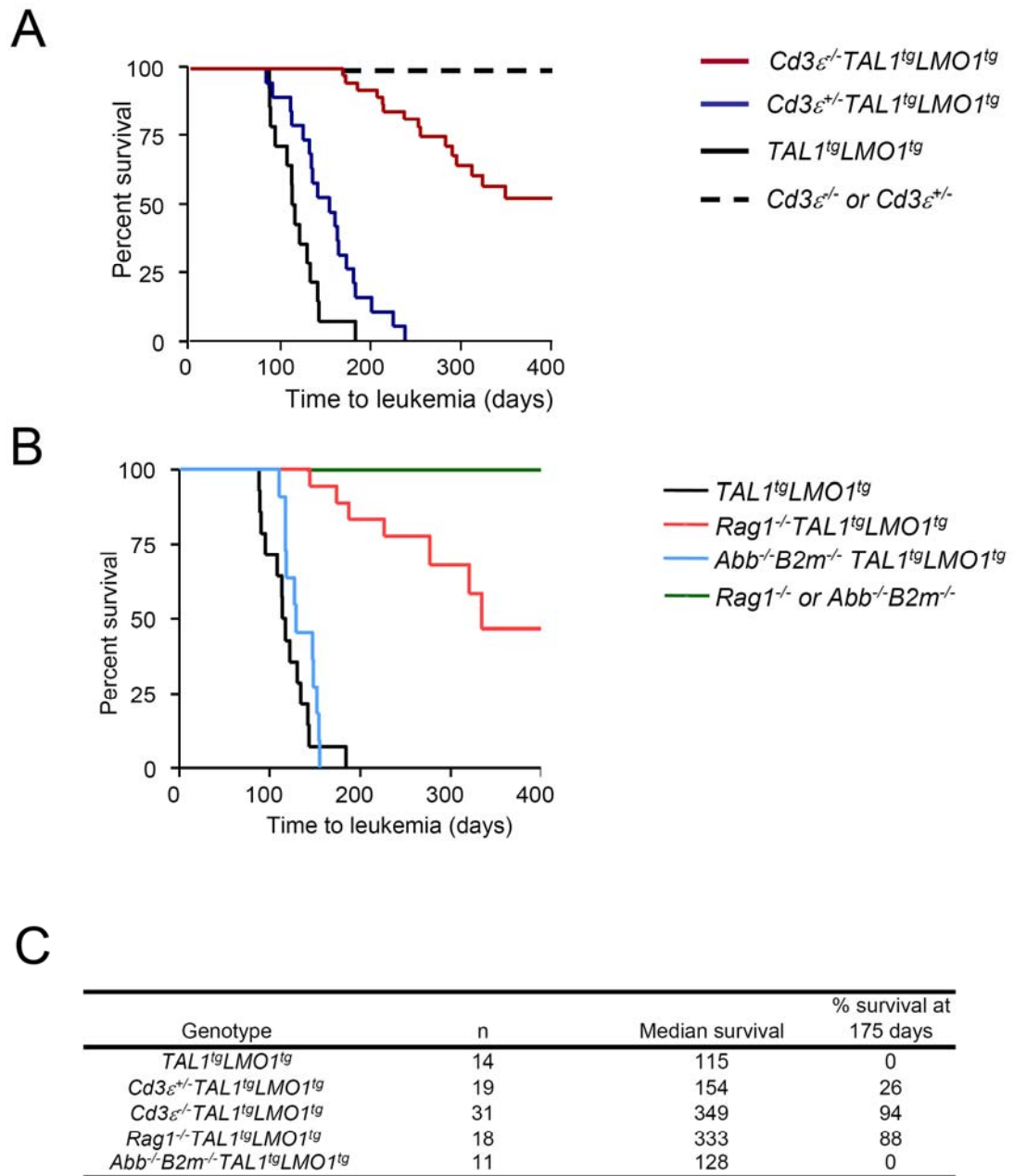


Figure 4.1

Figure 4.2. Oligoclonal origin of *SCL-LMO1* tumors.

A) Representative SKY image of *SCL^{tg}LMO1^{tg}* mouse tumors. B-C) Representative GTG-banding image of *SCL^{tg}LMO1^{tg}* mouse tumors. D) Oligoclonal T cell expansion detected by PCR analysis of *Tcrb* gene rearrangements. Genomic DNA was amplified by PCR with primers for specific variability segments of *Tcrb*. Shown is the V β 5 and V β 8 germline configuration (tail) as well as rearrangements in genomic DNA from wild type thymus, 7 independent *Cd3 ϵ ^{+/+}SCL^{tg}LMO1^{tg}* as well as 3 independent *Cd3 ϵ ^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* tumors.

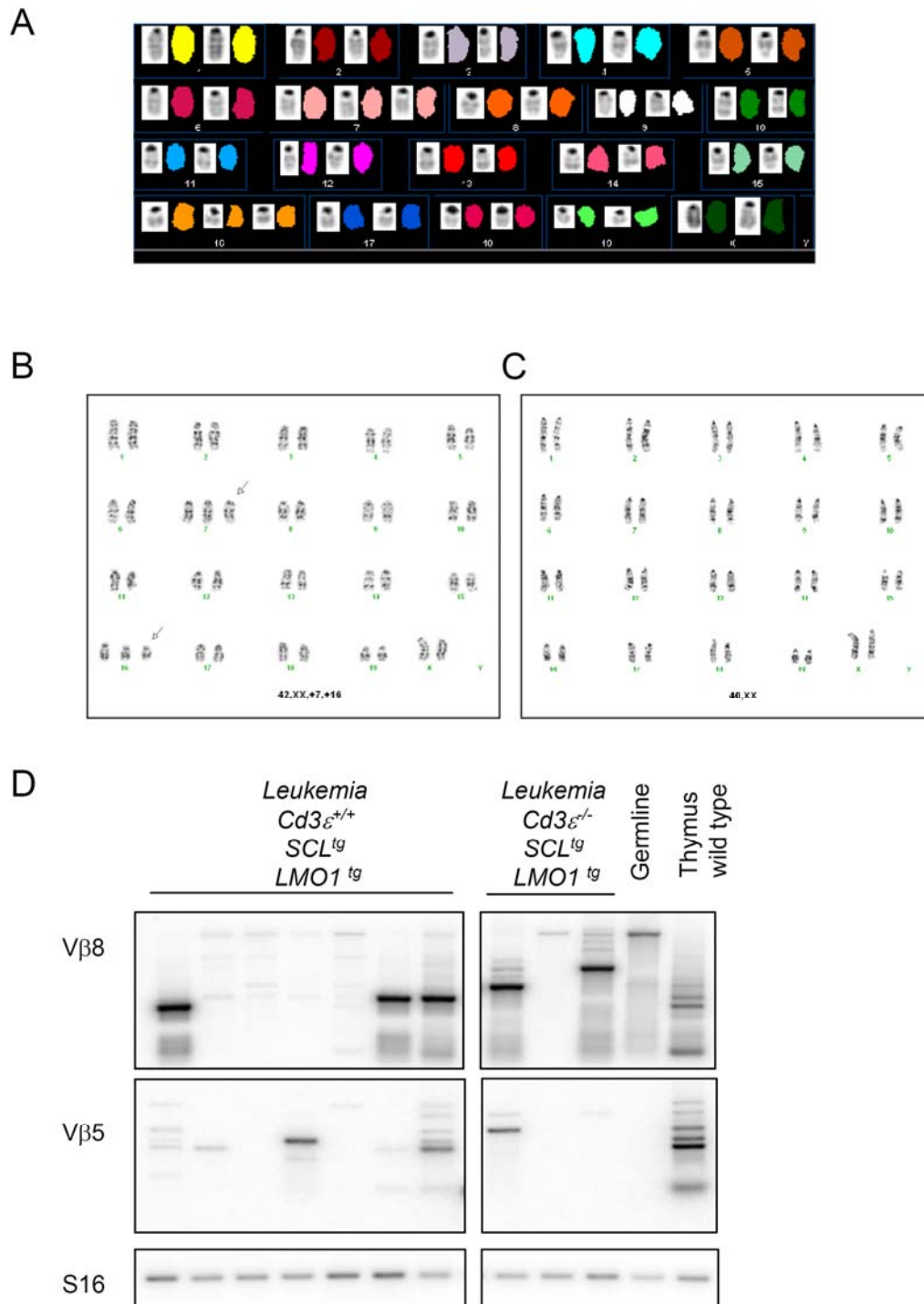


Figure 4.2

Table 4.1. Activating Notch1 mutations in *SCL-LMO1* T-ALL is dependent on *Cd3* gene status.

Sequencing of Notch1 gene in the PEST and the heterodimerisation domains of *SCL^{tg}LMO1^{tg}* and *Cd3 ϵ ^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* tumors.

Sample	DNA ¹	Protein ²	Consequence
<i>Cd3 ε</i> ^{+/+} Tg #3	7051_7052insGTGGT	frameshift starting at AA 2351	premature stop in PEST domain
<i>Cd3 ε</i> ^{+/+} Tg #4	7082delG_insCCTCC	frameshift starting at AA 2361	premature stop in PEST domain
<i>Cd3 ε</i> ^{+/-} Tg #201	7400-7407del_insGGTGAACAA	frameshift starting at AA 2467	premature stop in PEST domain
<i>Cd3 ε</i> ^{+/-} Tg #241	wt	NA	NA
<i>Cd3 ε</i> ^{+/-} Tg #250	7081insG	frameshift starting at AA 2361	premature stop in PEST domain
<i>Cd3 ε</i> ^{-/-} Tg #1	wt	NA	NA
<i>Cd3 ε</i> ^{-/-} Tg #2	wt	NA	NA
<i>Cd3 ε</i> ^{-/-} Tg #13	wt	NA	NA
<i>Cd3 ε</i> ^{-/-} Tg #1383	wt	NA	NA
<i>Cd3 ε</i> ^{-/-} Tg #1951	wt	NA	NA
<i>Cd3 ε</i> ^{-/-} Tg #1481	wt	NA	NA
<i>Cd3 ε</i> ^{-/-} Tg #1151	wt	NA	NA

¹ Nucleic acid position according to Ensembl sequence ENSMUSG00000026923

² Amino acid position in Notch1 at which mutation occurs

Figure 4.3 mRNA expression levels of *Notch1* target genes in *SCL-LMO1* T-ALL

Quantitative RT-PCR were performed for the indicated genes in *Cd3ε^{+/+}SCL^{tg}LMO1^{tg}* (n=8) and *Cd3ε^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* (n=8) tumors and normalised to *Hprt*. Relative mRNA expression levels are presented as boxplots delimited by the lower and upper 25 percentiles of the distribution. The lines inside the boxplots represent the medians and those outside the two extreme values.

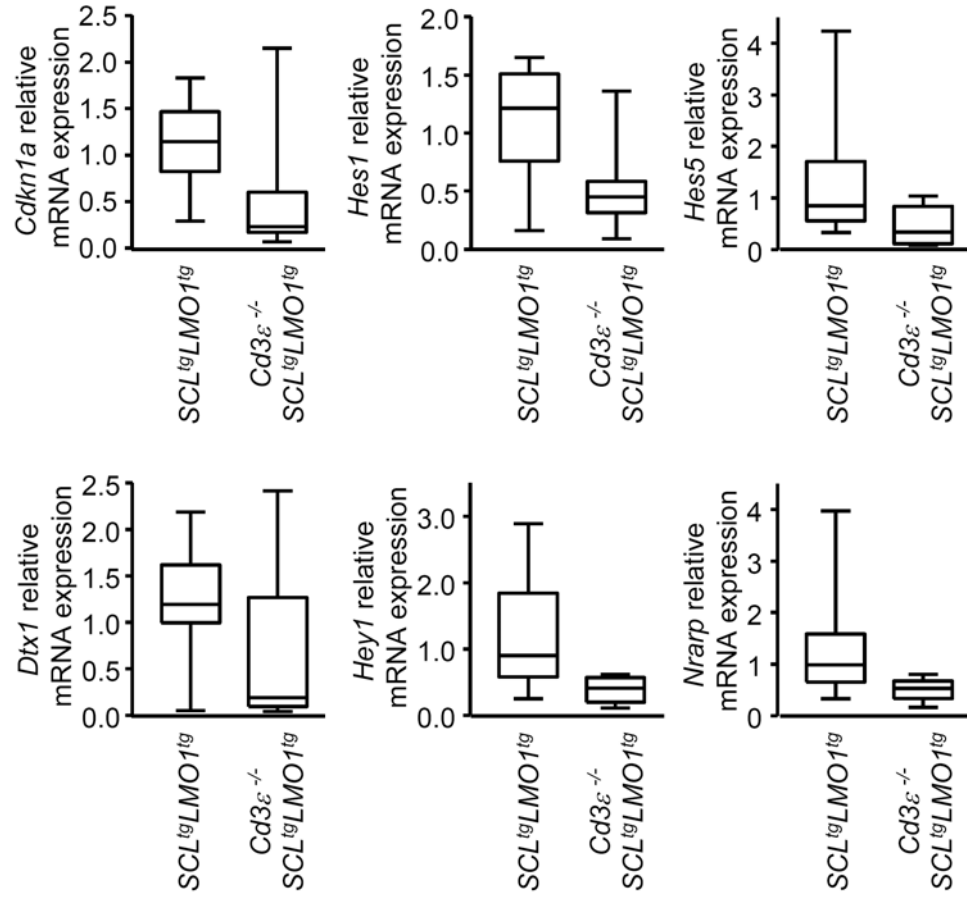
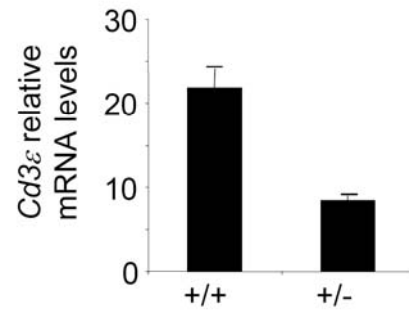


Figure 4.S1. *Cd3ε* gene haploinsufficiency.

A) *Cd3ε* mRNA level was investigated by quantitative RT-PCR. Graphs represent Ct values normalized for cDNA amounts using *S16* Ct value as reference (i.e. Δ Ct values). The averages and standard deviations of duplicate determinations are shown and are representative of three experiments. B) CD3 ϵ protein levels were investigated by Western blot of whole cell extracts prepared from total thymi or DN purified subsets from wild type, *Cd3ε*^{+/-} and *Cd3ε*^{-/-} mice as indicated. After stripping, the blot was hybridized with the anti-PTP1D antibody as loading control and signal quantification was performed using the ImageQuant software.

A



B

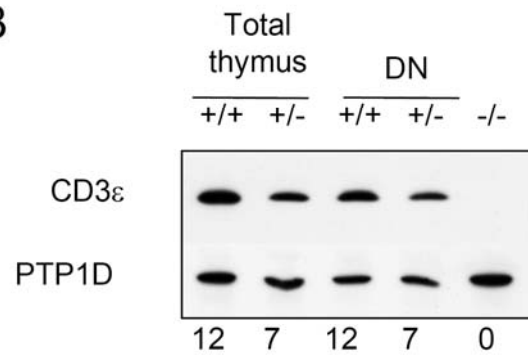


Figure 4.S1

4.8 Acknowledgments

We would like to thank Danièle Gagné (IRIC) for her assistance with cell sorting, Annie Perreault, Veronique Mercille and Veronique Litalien for mice handling. The work was funded by grants from the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and the National Cancer Institute of Canada (NCIC). M. Tremblay was supported by doctoral awards from CIHR and from the Cole Foundation and S. Herblot by a postdoctoral fellowship from the Leukemia Research Fund of Canada.

4.9 References

1. Berns, A. Provirus tagging as an instrument to identify oncogenes and to establish synergism between oncogenes. *Arch Virol* **102**, 1-18 (1988).
2. Hahn, W.C. & Weinberg, R.A. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* **347**, 1593-603 (2002).
3. Land, H., Parada, L.F. & Weinberg, R.A. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* **304**, 596-602 (1983).
4. Jonkers, J. & Berns, A. Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. *Biochim Biophys Acta* **1287**, 29-57 (1996).
5. He, L.Z. et al. Two critical hits for promyelocytic leukemia. *Mol Cell* **6**, 1131-41 (2000).
6. von Boehmer, H., Aifantis, I., Azogui, O., Saint-Ruf, C. & Grassi, F. The impact of pre-T-cell receptor signals on gene expression in developing T cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**, 283-9 (1999).
7. Jacobs, H. et al. Oncogenic potential of a pre-T cell receptor lacking the TCR beta variable domain. *Oncogene* **12**, 2089-99 (1996).
8. Bellavia, D. et al. Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3788-93 (2002).
9. dos Santos, N.R. et al. Pre-TCR expression cooperates with TEL-JAK2 to transform immature thymocytes and induce T-cell leukemia. *Blood* **109**, 3972-81 (2007).
10. Liao, M.J. et al. No requirement for V(D)J recombination in p53-deficient thymic lymphoma. *Mol Cell Biol* **18**, 3495-501 (1998).
11. Engel, I. & Murre, C. Disruption of pre-TCR expression accelerates lymphomagenesis in E2A-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11322-7 (2002).
12. Sambandam, A. et al. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* **6**, 663-70 (2005).
13. Aifantis, I., Raetz, E. & Buonamici, S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol* **8**, 380-90 (2008).
14. Ikawa, T., Kawamoto, H., Goldrath, A.W. & Murre, C. E proteins and Notch signaling cooperate to promote T cell lineage specification and commitment. *J Exp Med* **203**, 1329-42 (2006).
15. Weng, A.P. et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**, 269-71 (2004).
16. O'Neil, J. et al. Activating Notch1 mutations in mouse models of T-ALL. *Blood* **107**, 781-5 (2006).

17. Begley, C.G. & Green, A.R. The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood* **93**, 2760-70 (1999).
18. Ferrando, A.A. et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **1**, 75-87 (2002).
19. Bash, R.O. et al. Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study. *Blood* **86**, 666-76 (1995).
20. Lecuyer, E. et al. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* **100**, 2430-40 (2002).
21. Lecuyer, E. & Hoang, T. SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol* **32**, 11-24 (2004).
22. Mikkola, H.K. et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* **421**, 547-51 (2003).
23. Hall, M.A. et al. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 992-7 (2003).
24. Goardon, N. et al. Ectopic expression of TAL-1 protein in Ly-6E.1-htal-1 transgenic mice induces defects in B- and T-lymphoid differentiation. *Blood* **100**, 491-500 (2002).
25. Herblot, S., Aplan, P.D. & Hoang, T. Gradient of E2A activity in B-cell development. *Mol Cell Biol* **22**, 886-900 (2002).
26. Herblot, S., Steff, A.M., Hugo, P., Aplan, P.D. & Hoang, T. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol* **1**, 138-44 (2000).
27. Rabbitts, T.H. LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. *Genes Dev* **12**, 2651-7 (1998).
28. Wadman, I.A. et al. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J* **16**, 3145-57 (1997).
29. Aplan, P.D. et al. An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J* **16**, 2408-19 (1997).
30. Larson, R.C. et al. Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J* **15**, 1021-7 (1996).
31. Malissen, M. et al. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J* **14**, 4641-53 (1995).
32. Fasseu, M. et al. p16INK4A tumor suppressor gene expression and CD3epsilon deficiency but not pre-TCR deficiency inhibit TAL1-linked T-lineage leukemogenesis. *Blood* **110**, 2610-9 (2007).

33. Matzinger, P. & Bevan, M.J. Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell Immunol* **29**, 1-5 (1977).
34. Marrack, P. & Kappler, J. The T-cell repertoire for antigen and MHC. *Immunol Today* **9**, 308-15 (1988).
35. Gibbons, D. et al. The biological activity of natural and mutant pTalpha alleles. *J Exp Med* **194**, 695-703 (2001).
36. Irving, B.A., Alt, F.W. & Killeen, N. Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science* **280**, 905-8 (1998).
37. Grusby, M.J., Johnson, R.S., Papaioannou, V.E. & Glimcher, L.H. Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science* **253**, 1417-20 (1991).
38. Grusby, M.J. et al. Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3913-7 (1993).
39. Armstrong, S. et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet.* **30**, 41-7. Epub 2001 Dec 3. (2002).
40. Brown, P. et al. FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood* **105**, 812-20 (2005).
41. Brown, P., Levis, M., McIntyre, E., Griesemer, M. & Small, D. Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner. *Leukemia* **20**, 1368-76 (2006).
42. Grabher, C., von Boehmer, H. & Look, A.T. Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* **6**, 347-59 (2006).
43. 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. *J Exp Med* **190**, 1039-48 (1999).
44. Petiniot, L.K. et al. Recombinase-activating gene (RAG) 2-mediated V(D)J recombination is not essential for tumorigenesis in Atm-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6664-9 (2000).
45. Curtis, D.J., Robb, L., Strasser, A. & Begley, C.G. The CD2-scl transgene alters the phenotype and frequency of T-lymphomas in N-ras transgenic or p53 deficient mice. *Oncogene* **15**, 2975-83 (1997).
46. Lin, Y.W., Nichols, R.A., Letterio, J.J. & Aplan, P.D. Notch1 mutations are important for leukemic transformation in murine models of precursor-T leukemia/lymphoma. *Blood* **107**, 2540-3 (2006).
47. Reizis, B. & Leder, P. Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes Dev* **16**, 295-300 (2002).

48. Beverly, L.J., Felsher, D.W. & Capobianco, A.J. Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: implications for initiation and regression. *Cancer Res* **65**, 7159-68 (2005).
49. Look, A.T. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278**, 1059-64 (1997).
50. Weng, A.P. et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev* **20**, 2096-109 (2006).
51. Sharma, V.M. et al. Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc. *Mol Cell Biol* **26**, 8022-31 (2006).
52. Li, X., Gounari, F., Protopopov, A., Khazaie, K. & von Boehmer, H. Oncogenesis of T-ALL and nonmalignant consequences of overexpressing intracellular NOTCH1. *J Exp Med* **205**, 2851-61 (2008).
53. Kool, J. & Berns, A. High-throughput insertional mutagenesis screens in mice to identify oncogenic networks. *Nat Rev Cancer* **9**, 389-99 (2009).
54. Linette, G. et al. Bcl-2 is upregulated at the CD4+ CD8+ stage during positive selection and promotes thymocyte differentiation at several control points. *Immunity* **1**, 197-205. (1994).
55. Michie, A. et al. Constitutive Notch signalling promotes CD4 CD8 thymocyte differentiation in the absence of the pre-TCR complex, by mimicking pre-TCR signals. *Int Immunol* **19**, 1421-30. Epub 2007 Nov 1. (2007).
56. Engel, I., Johns, C., Bain, G., Rivera, R.R. & Murre, C. Early thymocyte development is regulated by modulation of E2A protein activity. *J Exp Med* **194**, 733-45 (2001).
57. Bhandoola, A. & Sambandam, A. From stem cell to T cell: one route or many? *Nat Rev Immunol* **6**, 117-26 (2006).

5 Cellular senescence induced by SCL and LMO1 oncogenes is a barrier to leukemogenesis

Mathieu Tremblay¹, Sabine Herblot¹, Thu Hoang², Margarita Todorova¹, Véronique Lisi¹, François Major¹, Sébastien Lemieux¹, Trang Hoang^{1,3}.

¹Institute of Research in Immunology and Cancer (IRIC) – University of Montreal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

²CNRS UMR 8145, Laboratoire MAP5, and Université Paris Descartes, Paris, France

³Pharmacology, Biochemistry, Medicine and Molecular Biology Departments, Faculty of Medicine, University of Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

5.1 Contribution des co-auteurs

M.T.: Design expérimental, réalisation des expériences et analyse des données et rédaction du manuscrit.

S.H : Design expérimental et contribution aux expériences des Figure 5.S1B et 5.S4.

T.H: Analyse de données.

M.To: Contribution aux expériences de la Figure 5.1E.

V.L.: Analyse de données.

F.M.: Design expérimental.

S.L.: Design expérimental et contribution à l'analyse des données (Figure 5.1B-D).

T.H : Design expérimental et analyse des données.

This chapter is a work in progress and corresponds to a manuscript in preparation.

5.2 Abstract

The *SCL* (Stem cell leukemia) and *LMO1/2* (LIM only protein) oncogenes, which are frequently activated in T cell leukemia (T-ALL), block T cell differentiation. Furthermore, elevated *SCL* gene expression in childhood T-ALL correlates with deletion of *INK4A/ARF*. To investigate pathways involved in *SCL* and *LMO1* dependent leukemogenesis, we analysed gene expression in preleukemic cells from *SCL^{tg}LMO1^{tg}* mice. Unbiased bioinformatic analysis shows decreased cell cycle genes, a gene signature consistent with senescence, activation of RB and P53 pathways as well as inhibition of E2F pathway. Cellular analysis reveals reduced proliferation and cell cycle entry, as well as the presence of several senescence markers in *SCL^{tg}LMO1^{tg}* thymocytes, such as senescence associated β -galactosidase activity, increased number and size of PML bodies and increased reactive oxygen species. Furthermore, our genetic approach shows that loss of senescence effectors, *Trp53*, *Ink4a* or *Arf* collaborates with *SCL* and *LMO1* to induce leukemia. Together, these results demonstrate that *SCL* and *LMO1* oncogenes induce cellular stress leading to senescence, and that leukemogenesis requires collaboration with senescence bypass mechanisms.

5.3 Introduction

Oncogene activation and tumor suppressor inactivation are essential cooperating events for transformation of normal cells. In response to oncogenic activation, normal cells induce genetically encoded programs that prevent deregulated proliferation, and therefore protect multicellular organisms from cancer progression, such as apoptosis and senescence. Oncogene-induced senescence such as the one triggered by overexpression of Ras and Raf is believed to act as a barrier for tumorigenesis both in mouse and human tissues (reviewed in (1)). The mechanism of oncogene-induced senescence involves the p16INK4A-retinoblastoma protein and the ARF-p53 tumor suppressor pathways.

The *SCL* (*SCL*) gene encodes a class II tissue specific basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor and is frequently activated by chromosomal rearrangements in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia (2). In addition, *SCL* gene expression is abnormally high in 40-60% of childhood T-ALL lacking rearrangement at the *SCL* locus (3,4). While *SCL* function is essential to specify hematopoietic precursors during development (reviewed by (2,5,6), to drive terminal erythroid and megakaryocytic differentiation in adult (7,8), *SCL* expression has to be down-regulated for proper lymphoid differentiation (9-11). Similarly to *SCL*, *LMO1/2* proteins are frequently involved in childhood T cell leukemogenesis (12,13). *LMO1* or *LMO2* cooperate with *SCL* to induce T-ALL in transgenic mice (14,15) and are often co-expressed in human T-ALL (16), suggesting that *SCL* and *LMO1/2* belong to independent complementation groups. Nonetheless, the overexpression of *SCL* and *LMO1/2* is not sufficient *per se* to induce leukemia in transgenic mice, as evidenced by a variable latency before the leukemia onset. In human patients, more than 90% of *SCL*-positive T-ALL show mutation in the *Cdkn2a* locus encoding p16INK4A as well as ARF proteins. Whereas these additional mutations

explain the long latency of tumor induction by *SCL* and *LMO1*, their functional role are still not well understood.

In the present study, we report that the *SCL* and *LMO1* oncogenes are inducers of senescence at the preleukemic stage, and that bypass of this regulatory mechanism is necessary for leukemogenesis.

5.4 Experimental procedures

Cell lines, cell culture and mice

We used the previously described A(5)3SCL (*SCL*^{tg}) and *lck-LMO1* (*LMO1*^{tg}) transgenic mouse lines (14,17). Both mouse lines were backcrossed onto a C57BL6/J background for more than 12 generations. *Cd3ε*^{-/-} mice (C57BL6/J) were kindly provided by Dr. B. Malissen (Centre d'Immunologie INSERM-CNRS de Marseille-Luminy, Marseille, France). *Trp53*^{-/-} mice (C57BL6/J) were from Jackson laboratory, *Cdkn1a*^{+/-} mice (C57BL6/J-129S1/SvImJ) from Jackson laboratory were backcrossed for more than eight generations. *E2f1*^{-/-} mice (C57BL/6;129S4/SvJae) from Jackson laboratory were backcrossed onto a C57BL6/J background for more than seven generations. *Ink4a/Arf*^{-/-} (C57BL6/J) and *Arf*^{-/-} (C57BL6/J) were purchased from National Cancer Institute at Frederick. Animals were maintained under pathogen free conditions according to institutional animal care and use guidelines.

FACS analysis

All antibodies used for flow cytometry analysis were from Pharmingen (BD Biosciences, Mississauga, ON), we used anti-CD44 (IM7), anti-CD25 (PC61.5), anti-CD4 (RM4-4), anti-CD8 (53-6.7) and anti-Thy1.2 (30-H12). Single cell suspensions and immunostaining were performed as previously described (11) and dead cells were excluded using propidium iodide. Cell cycle analysis was done by incubating thymocytes for 15 min at 37°C in DMEM supplemented with 2% FCS, 1mM HEPES pH7.4 and 10 µg/mL of Hoechst 33342 (Molecular Probes, Burlington, ON). 1 µg/mL Pyronin Y (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) was then added for an additional 30 min at 37°C with agitation each 15 minutes. Cells were then washed in PBS supplemented with 2% FCS and stained with cell surface markers as described above. For BrdU labelling and staining, thymocytes were isolated two hours after intraperitoneal injection of 1.5 mg of BrdU in mice and stained for cell surface markers. The detection of BrdU incorporation was performed with FITC-BrdU flow kit (BD

Biosciences, Mississauga, ON) and DNA was stained with 1 μ M 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich, Oakville, ON) prior to FACS analysis. For Ki67 intracellular labelling, thymocytes were first labelled with antibodies for cell surface markers followed by fixation and permeabilisation using BD CytoPerm/CytoFix kit solutions (BD Biosciences, Mississauga, ON). Cells were then labelled for 3 hours at room temperature with anti-Ki67 antibody (BD Biosciences, Mississauga, ON) followed by anti-mouse FITC conjugated secondary antibody. For ROS detection, thymocytes were incubated with 2 μ M DCF-DA (Molecular Probes, Burlington, ON) for 15 min at 37°C, then washed with PBS and stained for cell surface markers. As positive control, thymocytes were subjected to 800cG γ -irradiation. Mitochondrial membrane potential was assessed by Rhodamine 123 staining, briefly, thymocytes were labelled with 10 μ g/ml of Rhodamine 123 (Molecular Probes, Burlington, ON) for 20 min at 37°C, then unbound Rhodamine 123 was washed out by incubation in IMDM + 10% FCS for 20 min at 37°C. Thymocytes were then stained for cell surface markers. All FACS analyses were performed on a LSRII cytometer (BD Biosciences). RNA and DNA content was visualised on linear scale.

Microscopy

For PML body labelling, thymocytes were rinsed twice in 1 \times PBS (pH 7.4), fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, washed, blocked, and permeabilized with blocking buffer (10% FBS and 0.1% Tween 20 in 1 \times PBS [pH 7.4]) as described previously (18). Fixed and permeabilized cells were incubated with mouse anti-PML antibody (clone 36.1-104, Upstate Cell signaling solutions) in blocking buffer for two hours at room temperature. After incubation with primary antibodies, the cells were washed three times in 1 \times PBS (pH 7.4) and incubated with FITC-conjugated donkey anti-mouse Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 45 min at room temperature. The coverslips were then washed three times in 1 \times PBS (pH 7.4), mounted in Vectashield with DAPI (Vector Laboratories Inc.) and sealed. Fluorescence was analysed on a confocal

microscope LSM 510 META (Zeiss), with a 100× objective, further magnified by a zoom of 2. No crosstalk was observed between channels.

Cellular senescence associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity was measured as previously described (19). Briefly, frozen thymic sections were washed twice in PBS, fixed for 5 minutes in 4% paraformaldehyde in PBS, washed three times in PBS, and incubated in SA- β -gal staining solution (40 mM citric acid/phosphate [pH 6.0], 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mg/mL of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-X-galactosidase) for 16 hours at 37°C. SA- β -gal staining were visualised under an Axio Imager microscope (Zeiss).

RNA preparation, microarray and real-time RT-PCR analysis

Total RNAs were prepared from thymocytes of 3 week-old mice using RNeasy extraction kit (Qiagen, Mississauga, ON). Global RNA amplification and hybridization to the Affymetrix gene expression array (mouse, MOE430A) was performed by the Ottawa Genome Center (Ottawa, ON) using standard Affymetrix protocols. The hybridized GeneChips were scanned, and the raw image files analyzed using Affymetrix Microarray Suite 5.0's empirical algorithm to generate numeric average difference values and qualitative absent/marginal/present call values. The resulting processed data were further examined using Microsoft Excel and R softwares. Negative and low average difference values produced by the empirical algorithm were arbitrarily reassigned threshold values of 50 for purposes of calculating fold changes. The average fold change value used to compare the *Cd3 ϵ ^{-/-} SCL LMO* data against the *Cd3 ϵ ^{+/-}* data was calculated as ratios of the means of the replicates. Distribution analysis was performed using R software. (p value corrected for the false discovery rate). First strand cDNA synthesis and specific PCR was performed as described (11). Primer sequences used for specific mRNA amplification are available upon request. For real-time quantitative PCR, we used SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems) or the TaqMan PCR master mix (Applied Biosystems, Foster

City, CA). Quantitative gene expression analysis was performed by realtime PCR on MX3000 (Stratagene, La Jolla, CA) or ABI apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Bioinformatic analysis

Differentially expressed genes between $Cd3\epsilon^{-/-}$ and $Cd3\epsilon^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}$ thymocytes samples were determined using a linear model and the empirical Bayes method previously described (20). The Limma software package for the R computing environment was used for both normalization and comparison of probe signals (Limma is part of the Bioconductor project at www.bioconductor.org). Gene Ontology (GO) terms and Kegg pathways associated with differentially expressed genes were then analyzed and classified according to fold enrichment compared to the whole genome. Differential expression of selected genes was confirmed by Q-PCR as described above.

Statistical methods for deriving prognostic groups based on gene expression profiles

39 human T-ALL samples from the public database provided by Ferrando *et al.* were analyzed with Survival forest method (21-23) to predict survival times from both global patterns of gene expression from Affymetrix HU6800 microarray and RT-PCR expression of single genes. Survival forest is an extension of the well known random forest method to survival data; it consists of averaging over an ensemble of bootstrapped trees grown from the gene expression profiles to predict individual survival times as opposed to population survival times. Multidimensional scaling (24) of these data allowed the identification of different prognostic groups.

5.5 Results

To identify the molecular pathways targeted by *SCL-LMO1* oncogenes, we first investigated global gene expression in thymocytes overexpressing or not *SCL* and *LMO1* transgenes at the preleukemic stage, i.e. three weeks after birth. To circumvent cellular heterogeneity within the thymus, these transgenic mice were crossed with *C57Bl6/J-Cd3ε*-deficient mice. Indeed, in the absence of *CD3ε*, thymocytes are arrested at the DN3 stage due to an abrogation of pre-TCR as well as TCR signalling (25) and the thymus is homogeneously composed of more than 95% of DN3 thymocytes (Supplemental Figure 5.S1A). Importantly, even if the TCR and pre-TCR signalling are abrogated, *Cd3ε*^{-/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} mice still develop leukemia (Supplemental Figure 5.S1B). Global gene expression was assessed by the Affymetrix technology using thymocyte RNA obtained from three *Cd3ε*^{-/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} mice or their normal *Cd3ε*^{-/-} counterparts. Genes were considered to be affected by the oncogenes when the p values were lower than 0.01. A large majority of them were down-regulated, whereas only 31% were upregulated (Data not shown). This dataset was analysed to identify new pathways affected by *SCL* and *LMO1* as detailed underneath.

5.5.1 The *SCL* and *LMO1* oncogenes repress a subset of TRP53, RB and E2F regulated genes in thymocytes.

We reasoned that not all pathways relevant to thymocyte differentiation could be identified by this approach. *In silico* screening was therefore used to build lists of genes regulated by transcription factors important for thymocyte differentiation such as TRP53 (P53), RB1, E2F1, MYC, GATA3 as well as NFκB. These genes were identified by several groups in experiments that combined global chromatin immunoprecipitation of crosslinked protein-DNA complex with DNA microarray analyses, as well as gene expression data following specific transcription factors overexpression. To complete these lists, transcription target

genes found in published reviews were included (Table 5.S1). Our microarray data were systematically compared to these compiled lists of target genes to find an over-representation for specific targets genes. The enrichment analysis compares the fraction of genes regulated by a certain transcription factor from the affected dataset to that on the whole chip. The dataset of genes affected by *SCL* and *LMO1* showed an over-representation of 10 fold for E2F1-regulated genes, of 16 fold for RB-regulated genes as well as of 12 fold for p53-regulated genes (Figure 5.1A), suggesting that *SCL* and *LMO1* transgene expression specifically affect these pathways. Genes that have been shown to be upregulated and downregulated by these transcription factors (E2F1, RB1 and P53) were then analysed separately. Contrary to positive target genes that do not show significant enrichment, RB and p53 downregulated target genes are overrepresented in the dataset affected by *SCL* and *LMO1* by 20-fold or 16 fold, respectively (Figure 5.1A). Overexpression of SCL and LMO1 in DN3 thymocytes is therefore associated with altered expression of target genes of P53, E2F1 as well as RB1.

To determine if SCL-LMO1 overexpression is associated with activation or inactivation of E2F, RB and P53 pathways, we looked at the relative expression of their targets in presence of SCL-LMO1. The continuous lines in Figure 5.1B to D represents the distribution of all genes based on their relative expression levels calculated as log₂ fold change between *Cd3ε^{-/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}* thymocytes and their non transgenic counterparts. Superimposed to this is the distribution of the relative expression levels of E2F1, RB1 and P53 targets genes (Figure 5.1B-D, respectively and Figure 5.S2B-D). Any shift in the histogram as compared to the distribution of all genes is indicative of a significant change of gene expression level. If *SCL* and *LMO1* do not preferentially affect these genes, the two distributions should in principle be superimposed. In contrast, if *SCL* and *LMO1* cause an activation of transcription of the genes subset, the distribution of these genes should be shifted to the right, as compared to the distribution of all genes, whereas a left shift would suggest that *SCL* and *LMO1* lead to transcriptional repression of these genes. As shown in Figure 5.1B,

a subset of genes regulated by E2F transcription factors is downregulated in presence of *SCL* and *LMO1*. Consistent with the fact that RB regulates E2F proteins (reviewed in (26)), the distribution of genes downregulated by RB differed from the parental distribution and was shifted to the left (Figure 5.1C). In agreement with our enrichment analysis, the distribution of genes upregulated by RB was unaffected by *SCL* and *LMO1* (Figure 5.S2B). These results therefore point to an inhibition of E2F transcriptional pathway as well as an activation of RB transcriptional pathway. Moreover, the distribution of genes regulated by both E2F and RB was shifted to the left (Figure 5.S2C), consistent with a downregulation of these genes and the possibility that the RB pathway activation could consequently inhibit the E2F pathway. The distribution of genes downregulated by P53 transcription factor (Figure 5.1D) was shifted to the left whereas genes upregulated by P53 seemed unaffected in the presence of *SCL* and *LMO1* (Figure 5.S2D). mRNA expression levels of selected E2F1, RB1 and P53 regulated genes were then confirmed by real-time quantitative PCR (Figure 5.1E). There was an overall concordance between microarray and Q-PCR data for the 17 genes tested (Figure 5.1E). Together, our results showed that subsets of P53-, E2F1- as well as RB1-target genes were significantly downregulated in preleukemic *SCL-LMO1*^{tg} thymocytes and therefore support the view that gene expression pattern of preleukemic *SCL-LMO1*^{tg} thymocytes is characterized by an activation of P53 and RB pathways and an inhibition of E2F pathway.

5.5.2 The gene expression pattern in preleukemic *SCL*^{tg} *LMO1*^{tg} thymocytes correlates with a senescence gene signature.

To gain insights in the cellular pathways affected by *SCL* and *LMO1* overexpression, we took advantage of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways (27) as well as of the Gene Ontology (GO) terms which have been annotated for the Affymetrix MOE430A microarray. The Fisher test was used to measure the overrepresentation of child and parental Gene Ontology (GO) terms associated with genes that are preferentially

expressed in $Cd3\epsilon^{-/-}$ versus $Cd3\epsilon^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}$ thymocytes. The Benjamini-Hochberg correction was applied to correct p-values for multiple testing (28). Genes presenting a significant difference in expression were further classified according to their fold enrichment in the list as compared to the whole genome. Cell cycle, DNA replication as well as regulation of cell cycle progression were in the top ranking GO terms (Figure 5.S3A). The Goeman's global test (29) was also applied to determine whether the global expression pattern of a group of genes or a pathway was significantly affected by *SCL* and *LMO1* expression. The Goeman's global test gives one p-value for a pathway and adjusted p-values in multiple testing of many pathways, as well as z-scores for measuring the impact of individual genes on the test results. The global test results for the top three GO terms with the adjusted p-values (FWER adjusted $p < 0.01$) revealed that cell cycle, DNA replication as well as regulation of cell cycle progression are the most significant group of genes, whereas the top KEGG pathway is cell cycle (Figure 5.S3A). Furthermore, the reduced expression level of these genes was confirmed by Q-PCR with an overall concordance between microarray and Q-PCR data (Figure 5.S3B). Unbiased bioinformatic and statistical analyses therefore revealed a decreased expression of cell cycle and DNA replication-related genes in preleukemic thymocytes overexpressing *SCL* and *LMO1*, suggesting reduced cellular proliferation.

Proliferation arrest is a feature of senescent phenotype induced by oncogenes (review in (30)). Lists of upregulated and downregulated genes upon senescence induction were established by *in silico* screening of DNA microarray datasets (Table 5.S2) and compared to our microarray dataset, using the same distribution analysis as in Figure 5.1. The distribution of genes reported to be associated with senescence were compared to the distribution of all genes, based on their relative expression levels calculated as log₂ fold change between $Cd3\epsilon^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}$ thymocytes and their non transgenic counterparts. The distribution of genes downregulated upon senescence significantly differed from the parental distribution, as it was shifted toward the left (Figure 5.2A). Conversely, the

distribution of genes upregulated upon senescence did not significantly differ from the parental distribution and therefore was not preferentially affected by the presence of *SCL* and *LMO1* (Figure 5.2B). The Table S2 presents the p values of this type of analysis for all the lists of genes associated with senescence taken from different independent studies done in different cellular settings. We found that gene expression distributions of 10 lists out of 17 were significantly affected by the expression of *SCL* and *LMO1*. Together, these results support the view that gene expression pattern in preleukemic *SCL-LMO1*^{tg} thymocytes is reminiscent of a gene signature associated with senescence.

5.5.3 Preleukemic thymocytes overexpressing *SCL* and *LMO1* show reduced proliferation.

Cell cycle and proliferation of *SCL-LMO1*^{tg} thymocytes were then investigated at the cellular level to validate gene expression analysis. First, the proportion of thymocytes entering into the cell cycle was assessed by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay. *Cd3ε*^{-/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} DN3 thymocytes exhibited reduced incorporation of BrdU as compared to *Cd3ε*^{-/-} control thymocytes (Figure 5.3A), consistent with a reduction in expression of DNA replication associated genes (Figure 5.S2A). In addition, co-staining of BrdU and DNA content revealed a significant reduction in the percentage of *Cd3ε*^{-/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} DN3 thymocytes entering the S phase, concomitant with an increase in the percentage of cells in the G0-G1 phase (Figures 5.3B-C). Further delineation of the G0 and G1 phases using Hoechst 33342 DNA staining and Pyronin Y RNA staining showed an increase in the percentage of cells in G0 in *Cd3ε*^{-/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} thymocytes as compared to *Cd3ε*^{-/-} control thymocytes (Figures 5.3D-E). These results were further confirmed by intracellular staining for the proliferation marker Ki67 combined with DAPI DNA staining (Figures 5.3F-G). These results therefore demonstrate that overexpression of *SCL* and *LMO1* oncogenes decreases cell cycle entry of DN3 thymocytes.

5.5.4 Increased expression of cell cycle inhibitors in *SCL-LMO1* expressing preleukemic thymocytes.

Cell cycle is controlled in part by E2F, RB as well as p53 pathways which are affected in preleukemic thymocytes overexpressing *SCL* and *LMO1* (Figure 5.1). We therefore assessed whether *SCL* and *LMO1* affect the expression levels of cell cycle regulators. Using qRT-PCR, we measured the expression levels of CDK inhibitors genes, i.e. *Cdkn1* and *Cdkn2*, *p53*, *E2f* as well as *Rb* transcription factors family members (Figure 5.S3C). In DN3 thymocytes, we observed that *Cdkn1b* (p27), *Cdkn1c* (p57), *Cdkn2b* (p15), *Cdkn2d* (p19), *Trp73* and *E2f3b* mRNA expression levels were significantly increased in the presence of *SCL* and *LMO1* and to a smaller extent, *Trp53* and *Rbl2*. In contrast, *Cdkn1a*, *Trp63* and more modestly *E2f1* were reproducibly decreased respectively to 50%, 20% and 80% of control. Except for *Cdkn1a*, which is a known negative transcriptional target of *SCL* (31), increased mRNA expression of cell cycle checkpoint protein *Trp73* (p73) and cell cycle inhibitors (p27, p57, p15, p19) as well as reduced mRNA expression of *Trp63* (p63) and *E2f1* are consistent with the signature of a reduced cell cycle entry.

5.5.5 *SCL* and *LMO1* induce senescence markers in preleukemic thymocytes.

The detailed analysis of cell cycle progression of preleukemic thymocytes was indicative of cell cycle arrest (Figure 5.3), a possible sign of imminent apoptosis or senescence. To distinguish between these two possibilities and evaluate apoptosis, we first performed *in situ* TUNEL assay on thymus sections. This analysis did not reveal a significant difference in the number of TUNEL+ thymocytes in *Cd3ε^{-/-}* or *Cd3ε^{-/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}* mice (Figure 5.S4A) indicating that *SCL* and *LMO1* expression did not induce apoptosis in DN3 thymocytes. Second, we investigated senescence associated markers as senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) which was one of the first markers found to be associated with a senescent phenotype in fibroblasts (19), and PML, a known inducer of

senescence (32,33) that is induced in RAS mediated senescence (34,35). An increased SA- β -gal activity was specifically detected in *Cd3 ϵ ^{-/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}* thymic sections as compared to *Cd3 ϵ ^{-/-}* controls (Figure 5.4A). Similarly, confocal analysis of PML fluorescent staining revealed that both size and numbers of PML bodies were increased in *Cd3 ϵ ^{-/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}* thymocytes as compared to *Cd3 ϵ ^{-/-}* controls (Figure 5.4B). These results are reminiscent of a senescent phenotype of *Cd3 ϵ ^{-/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}* thymocytes.

The amount of reactive oxygen species (ROS) were then investigated since oxidative stress has been linked to cellular senescence (36-40). The quantification of ROS by flow cytometry analysis using DCF-DA (Dichlorofluorescein-diacetate) revealed an increased ROS level in transgenic thymocytes as compared to *Cd3 ϵ ^{-/-}* thymocytes (Figure 5.4C). Moreover, the mitochondria functionality was assessed through Rhodamine 123 uptake since reactive oxygen species production is dependent on mitochondria function and activity (41). Compared to *Cd3 ϵ ^{-/-}* thymocytes, *Cd3 ϵ ^{-/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}* thymocytes displayed a reduction in Rhodamine 123 staining indicating an alteration in mitochondrial membrane potential (Figure 5.4D). These results therefore reveal that *SCL* and *LMO1* oncogenes cause a cellular stress, which is characteristic of a senescence-like phenotype in thymocytes at the preleukemic stage.

5.5.6 Data mining of gene expression profiles in T-ALL reveals association of *INK4A/ARF* deletion with *SCL*+ patients.

Cellular senescence is controlled by several tumor suppressor genes. The most relevant of these encode the P53 and RB proteins, which are essential for cells to establish and maintain the senescence growth arrest induced by a variety of stimuli (42). Both the RB and P53 pathways were activated by *SCL-LMO1*, promoting a premature senescence-like phenotype in preleukemic thymocytes. The *Cdkn2a* loci encodes three different genes: *Arf*, *Ink4a/p16* and *Ink4b/p15* (43-45) which are known negative regulators of these two

pathways. Analysis of the public database of DNA microarray gene expression of 39 human T-ALL samples (4) using Survival Forest method (21-23) and multidimensional scaling (24) have permitted to identify different prognostic groups of patients. As shown in Figure 5.5, representation of the individual survival curves in a geometric space by multidimensional scaling revealed three major prognostic groups (*HOX11+*, *LYL1+* and *SCL+*). Moreover, 26 of the 39 T-ALL samples exhibit homozygous deletions of the *INK4A/ARF* locus. Strikingly, whereas only 1/3 *MLL-ENL+* and 1/7 *LYL1+* samples present this deletion, 24 clustered with the *SCL+* and *HOX11+* groups (Table 5.S4). The frequency of *INK4A/ARF* deletions distinguishes the upper groups from the lower groups and suggests that the molecular pathways of transformation by *SCL* and *HOX11* interact with *INK4A/ARF* deletion, while those involving *LYL1* and *MLL-ENL* differ and show only infrequent interaction with *INK4A/ARF* deletion.

5.5.7 Bypass of senescence accelerates *SCL-LMO1*-dependent leukemia.

The presence of *INK4A/ARF* deletion in almost all *SCL+* cases lead to the investigation of *Ink4a/Arf* deletion effect on leukemogenesis induced by the *SCL* and *LMO1* oncogenes. The genetic interaction between *Ink4a*, *Arf* or *Trp53(p53)* and the *SCL* and *LMO1* oncogenes were therefore examined by crossing *SCL^{tg}LMO1^{tg}* mice with *Cdkn2a^{-/-}(Arf^{f/-})*, *Cdkn2a^{-/-}(Ink4a^{-/-}/Arf^{f/-})* or *Trp53^{-/-}* mice. Survival curves were established and the median survival was determined (Figures 5.6A-B). Except for *Trp53^{-/-}* mice, which developed leukemia with 100% penetrance and a median survival of 167 days, both *Arf^{f/-}* and *Ink4a^{-/-}/Arf^{f/-}* mice show a low penetrance and a long latency for leukemia appearance. *SCL^{tg}LMO1^{tg}* mouse model developed acute leukemia with a median survival of 138 days and 100% penetrance (Figure 5.5B). In this context, deletion of both alleles of either *Trp53*, *Arf* or *Ink4a/Arf* significantly accelerated leukemia onset induced by the *SCL-LMO1* transgenes. Moreover, loss of only one allele of these genes significantly accelerated the leukemia onset, suggesting that these genes are haploinsufficient for leukemia induction

(Figure 5.6B and Table 5.S3). A similar leukemic phenotype of CD8 ISP and/or immature DP was observed for all genotypes (Figure 5.5C). This genetic approach demonstrates that inactivation of senescence regulators *Trp53(p53)*, *Cdkn2a (Arf)* or *Cdkn2a (Ink4a)* accelerates *SCL-LMO1*-dependent leukemia, but more importantly suggests that bypass of senescence could be important for leukemia induction.

5.6 Discussion

Using cellular, genetic and genomic approaches, we identify *SCL* and *LMO1* oncogenes as inducers of senescence and we reveal that bypassing this senescence stage favours leukemogenesis. Our results illustrate that cellular senescence is a part of the cellular response to misexpression of *SCL* and *LMO1* oncogenes in the thymus. This overexpression was associated with several molecular features of cellular senescence including elevated acidic- β -gal activity, increased expression of the cell cycle inhibitors, increase in PML body formation as well as induction of cellular stress. Importantly, we observed that loss of senescence effectors such as *Trp53* (p53) and *Cdkn2a* (*Ink4a* or *Arf*) collaborate with *SCL* and *LMO1* to induce leukemia in mice.

5.6.1 Senescence response to oncogenic activation

Cellular senescence is controlled by several tumor suppressor genes. The most relevant of these encode the p53 and RB family proteins, which are essential for cells to establish and maintain the senescence growth arrest induced by a variety of stimuli (42). Our results show that senescence phenotype induced by *SCL* and *LMO1* oncogenes is associated with an induction of *Trp73* (p73), a reduction in *Trp63* (p63) as well as in a smaller proportion in *Trp53* (p53) expression mRNA levels. Consistent with this, heterozygous mice for p63 present an accelerated aging associated with senescence induction (46), whereas overexpression of p73 has been shown to cause cell cycle arrest (47). Interestingly, contrary to p73 and p53 which are known tumor suppressor, p63 has oncogenic properties and is found either amplified or overexpressed in cancer (48-53). The transcriptional specificity of these p53 family members is not well established and are thought to act mainly on the same target genes, which could explain the differential expression of P53 downregulated genes in presence of *SCL* and *LMO1*. The RB family of proteins is regulated by phosphorylation by CDK, themselves under the control of cyclin dependent

kinase inhibitors (CDKI) such as CDKN2B (p15) and CDKN2A (p16). We found that *SCL-LMO1* induced senescence is associated with increased expression of CDKI such as *Cdkn2b* (p15), *Cdkn1b* (p27) as well as *Cdkn1c* (p57). Consistent with this, overexpression of either p27, p57 or p15 genes induces senescence in different cellular models (54,55). It also has been suggested that the integrity of the PML NBs is required for the induction of senescence as a result of oncogenic stress. Our results show that *SCL* and *LMO1* cause an increase of PML body numbers and size. PML interact with many nuclear proteins such as P53 (56,57), hypophosphorylated form of RB1 (33,35,58) or HDAC (59). PML bodies have been implicated in chromatin reorganisation during senescence caused by cell cycle genes repression, most of them being targets of E2F1 and RB1 transcription factors (60,61). Moreover, PML protein levels are regulated by the Casein kinase II (CSNK2A) protein which phosphorylates and targets it for proteosomal degradation (62). Interestingly, *SCL* has been shown to collaborate with the overexpression of *CSNK2A* gene in leukemogenesis (63). Therefore, this collaboration could be explained by the necessity of PML to induce senescence and the possibility that overexpression of *CSNK2A* could result in reduced PML expression and bypass of the senescence mechanism.

5.6.2 Necessity of senescence bypass for leukemogenesis

Overcoming the restriction that cellular senescence poses to immortalization may be a primary step during the transformation to malignancy (64). Primary oncogenic events, such as those triggered by chromosomal translocations, are generally insufficient by themselves to cause leukemia and require secondary cooperative mutations to fully transform cells. These collaborating events may be different, depending on the initiating cytogenetic event and targeted cell of transformation. Bypass of the senescence program due to the removal of one or two alleles of *Trp53* or *Cdkn2a* (*Ink4a* and/or *Arf*) would facilitate the immortalisation of leukemic clones and the acceleration of leukemia onset. Hence almost all human leukemic T-ALL tumors associated with an activation of *SCL* show either a

homozygous or heterozygous deletion of *Cdkn2a* (*Ink4a/Arf*) locus and thus represent necessary second hits in T-ALL (4). Moreover, deletion of the *Cdkn2a* gene or retroviral integration activating the expression of *Bmi1* gene have been among the leukemia that developed from X-SCID patients treated with retroviral therapy and possessing an activating integration in the *LMO2* locus (65). These two mutations are mutually exclusive and thus could act in the same pathway i.e. bypass of senescence. Together, these observations indicate that ablation of CDK inhibitors, i.e. $p16^{\text{Ink4a}}/p19^{\text{Arf}}$ may be essential for SCL-initiated leukemogenesis and therefore that senescence control by these inhibitors is an important barrier against cell transformation in the T lineage. Together, these results open new avenues of investigation and in particular, it will be of great interest to determine whether CDK inhibitors would represent new therapeutic targets in T-ALLs.

5.7 Figure legends

Figure 5.1. *SCL* and *LMO1* oncogenes repress of a subset of E2F1, RB1 and TRP53 target genes.

A) Enrichment analysis of target genes of E2F1, RB1 as well as TRP53 overrepresented among the genes significantly affected (p value<0.01) between *Cd3ε^{-/-}* thymocytes expressing or not *SCL* and *LMO1* when compared to the whole chip. Shown are either total regulated (black), upregulated (white) as well as downregulated (grey) genes by the indicated transcription factors. B) Distribution of genes regulated by E2F1 (black bar) superimposed to the distribution of all the genes found on affymetrix chip (black line) based on their log₂ ratio between *Cd3ε^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* thymocytes and *Cd3ε^{-/-}* control thymocytes. pvalue represents the difference in the distribution of specified genes list when compared to total microarray genes distribution. C) Distribution of genes downregulated by RB1 transcription factor in presence of *SCL* and *LMO1* as in B. D) Effect of *SCL* and *LMO1* overexpression on genes regulated by TRP53. Shown is the distribution of genes downregulated by TRP53 as in B. E) Q-PCR were performed on selected genes regulated by E2F1, RB1 and/or TRP53. Microarray data and quantitative RT-PCR are shown as a ratio of *Cd3ε^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* over *Cd3ε^{-/-}* thymocytes normalised on *Hprt* and represent the mean ± standard deviation of three independent RNA samples.

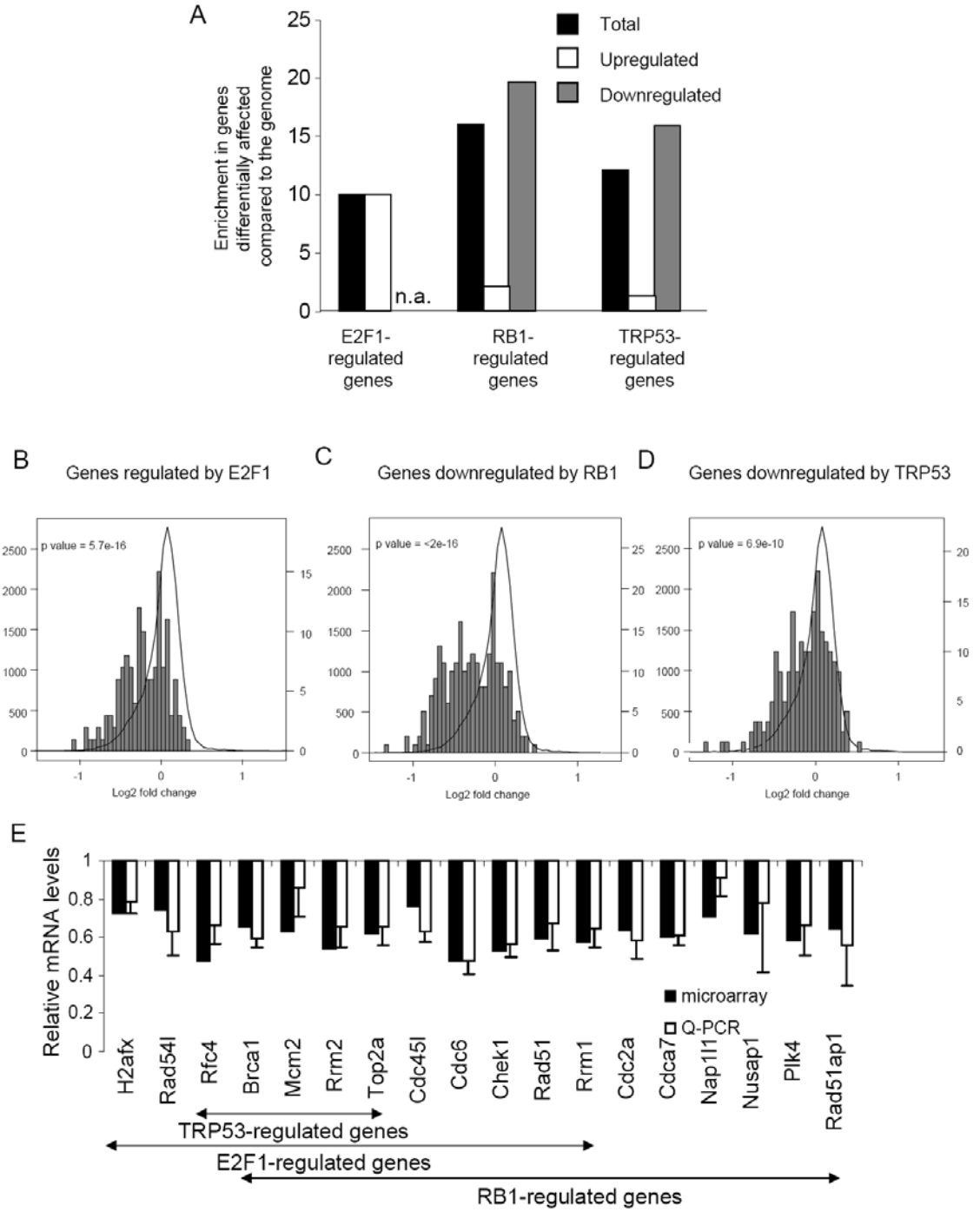


Figure 5.1

Figure 5.2. The overexpression of *SCL* and *LMO1* is associated with a signature of cellular senescence.

A-B) *SCL* and *LMO1* causes a gene expression pattern associated with senescence. Shown is the distribution of compiled genes downregulated (A) or upregulated (B) in cell induced in senescence (black bar) superimposed to the distribution of all the genes found on affymetrix chip (black line) based on their log₂ ratio between *SCL* and *LMO1* expressing thymocyte and control. C-F) Heatmap of differentially expressed genes with a p value < 0.01 from list of genes regulated by E2F1 (C), downregulated by RB1 (D), downregulated by TRP53 (E) or associated with senescence (F).

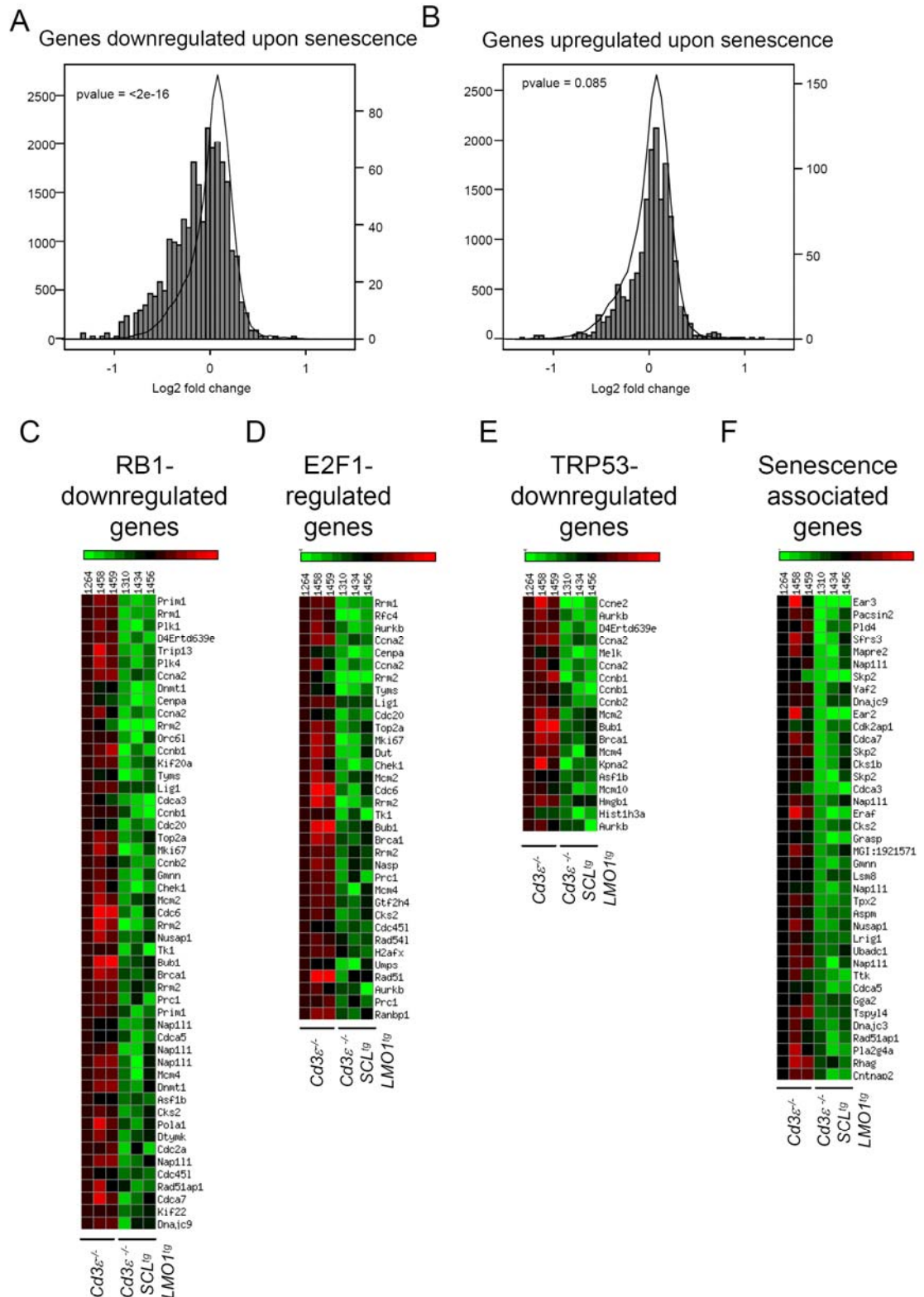


Figure 5.2

Figure 5.3. Decreased DNA replication and cell cycle initiation in the presence of *SCL* and *LMO1* in thymocytes.

A-C) BrdU pulsed DN3 thymocytes were analyzed by flow cytometry for BrdU incorporation in DNA using a FITC-conjugated anti-BrdU antibody alone (A) or in combination with DAPI staining (B-C). Representative histograms are shown for *Cd3ε^{-/-}* and *Cd3ε^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* DN3 thymocytes. The percentages shown are the mean ± SEM of BrdU⁺ thymocytes from three experiments (p value = 0.02). B) The cell cycle status was assessed by *in situ* BrdU incorporation pulse as in A. DNA content was assessed by DAPI. Representative contour plots with mean percentage ± SEM of 3 experiments for cells in G1 and S/G2/M phase are shown (B), together with box plots of distribution in G1 (left panel) and SG2M phase (right panel) with the medians and extreme values of the two distributions (C). D-G) Thymi were collected from *Cd3ε^{-/-}* and *Cd3ε^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* mice and the DN3 thymocytes were analysed for cell cycle using Hoechst 33342 combined with pyroninY (D-E) and KI67 with DAPI (F-G). Representative contour plots with mean ± SEM are shown (D-F), as well as box plots of three independent experiments (E,G).

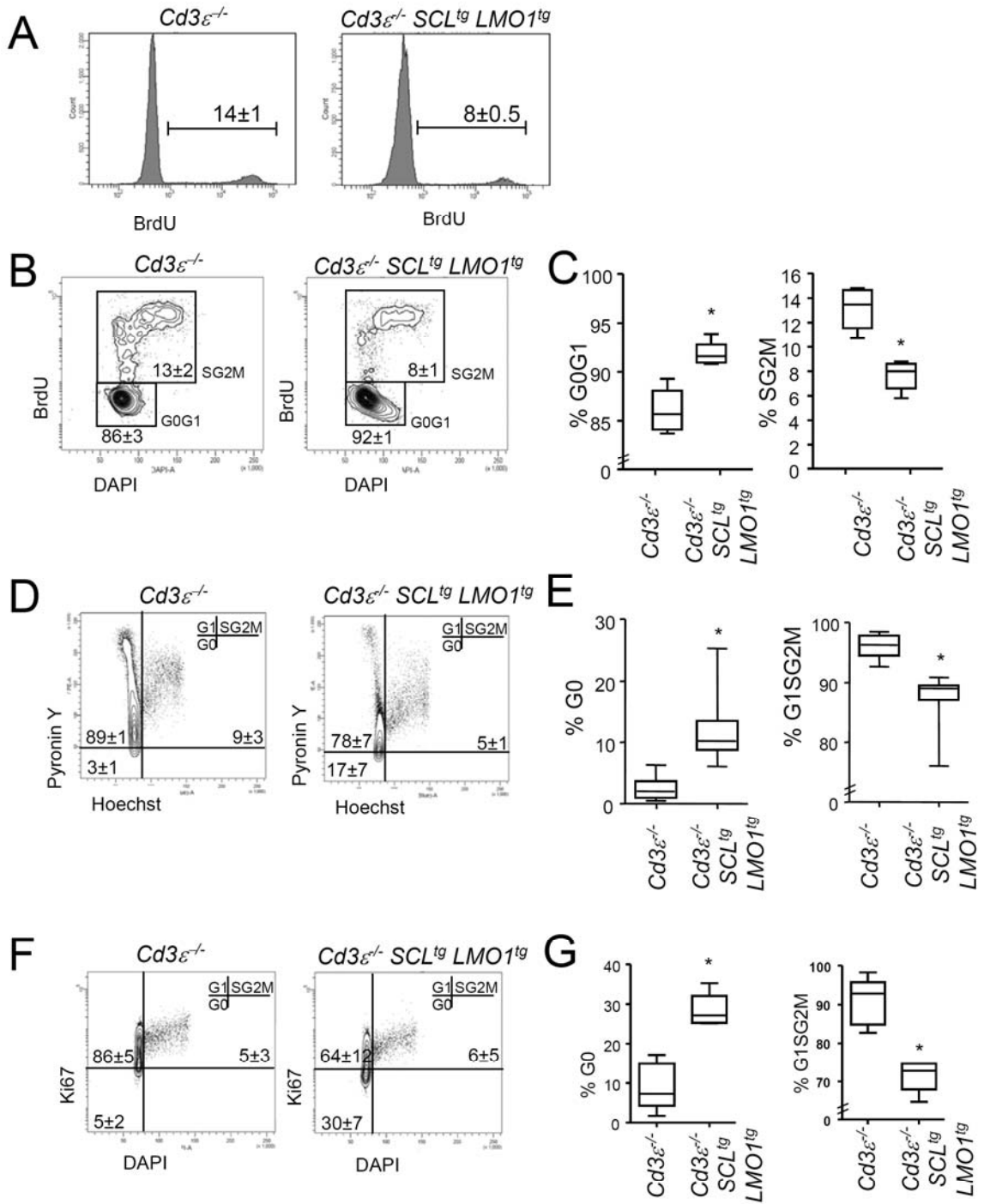


Figure 5.3

Figure 5.4. Senescence markers in *SCL^{tg}LMO1^{tg}* preleukemic thymocytes.

A) Cryostat sections of preleukemic thymi from *Cd3ε^{-/-}* and *Cd3ε^{-/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}* mice were stained for SA-β-gal. Images shown are representative of 3 independent experiments. B) PML localisation in *Cd3ε^{-/-}* and *Cd3ε^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* thymocytes. Cells were stained by immunofluorescence using anti-PML antibody and an FITC-conjugated secondary antibody as well as DAPI to highlight the nucleus. Images were obtained by confocal immunofluorescence microscopy and representative of 5 independent experiments. C) Reactive oxygen species (ROS) were assessed by DCF-DA staining and flow cytometry. D) The mitochondrial membrane potential was measured by Rhodamine 123 staining in *Cd3ε^{-/-}* and *Cd3ε^{-/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}* DN3 thymocytes.

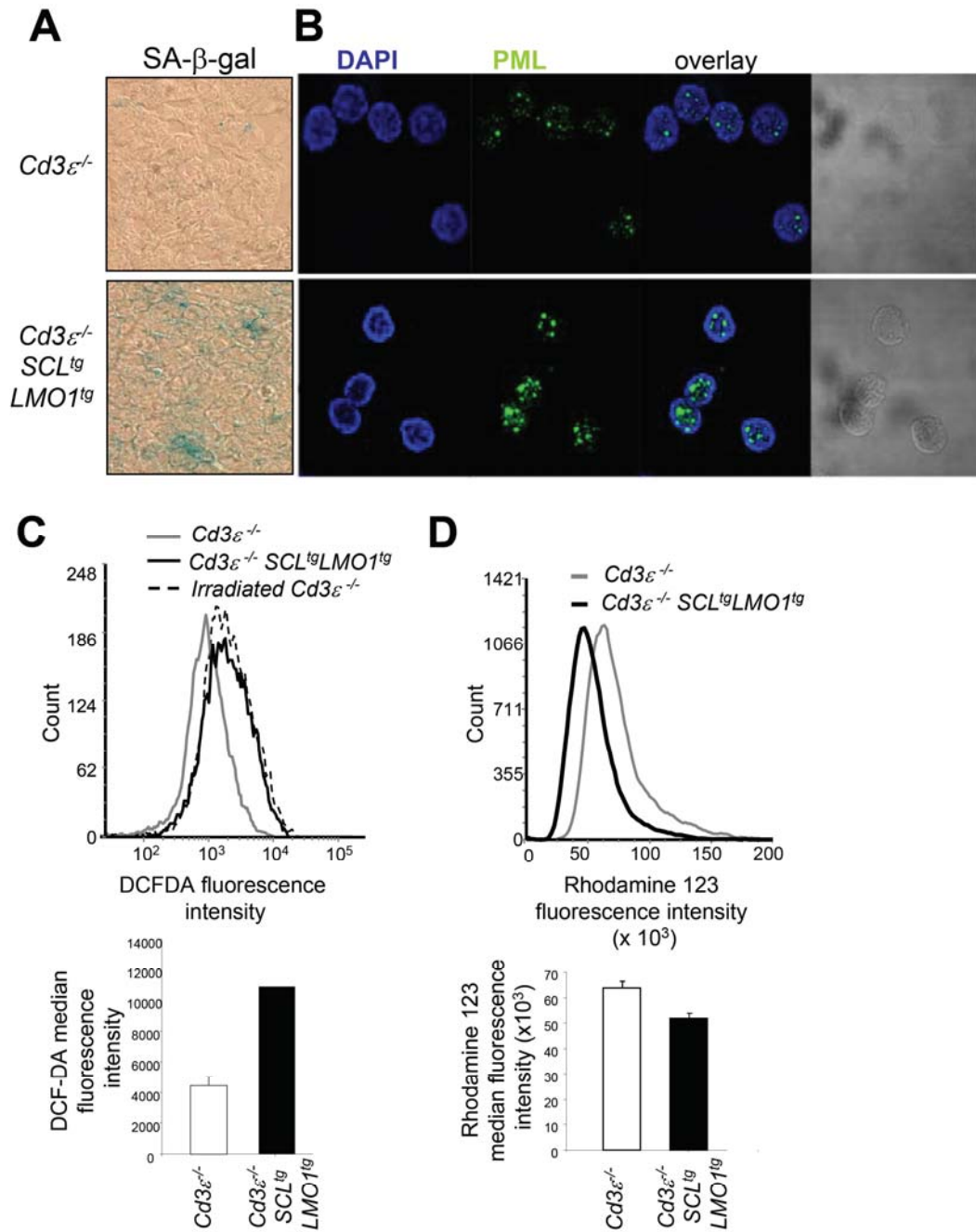


Figure 5.4

Figure 5.5. Correlation between *INK4A/ARF* locus status and prognostic T-ALL patient groups.

Deletion status of *INK4A/ARF* locus by two dimensional dot plot of T-ALL patient samples based on survival and gene expression profile. High similarities between survival curve as predicted by Survival Forest analysis correspond to small distances and clustered points on the plot and conversely. The plot shows three major prognostic groups *SCL+*, *HOX11+* and *LYL1+* and a minor group *MLL-ENL+*. *INK4A/ARF* locus status is shown (D=homozygous deletion, d= heterozygous deletion and W=wild type allele).

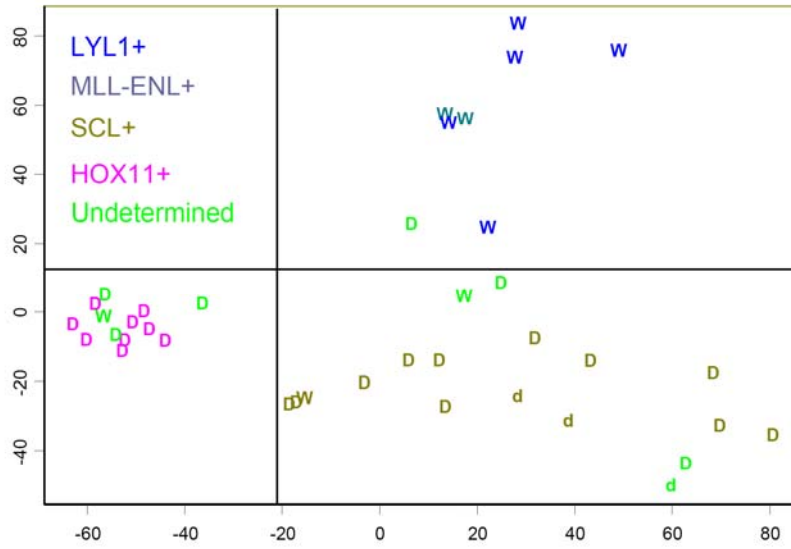


Figure 5.5

Figure 5.6. Genetic interactions between *Trp53*, *Arf* or *Ink4A-Arf* and the *SCL* and *LMO1* oncogenes in leukemogenesis.

Kaplan-Meier curves of the time of onset to leukemia of transgenic mice *SCL-LMO1* in absence of either one or two allele of cell cycle regulators such as *Arf* (A), *Ink4a/Arf* (B) or *Trp53* (C). A drop in the line represents the sacrifice or death of an animal diagnosed at necropsy with malignant thymic lymphoma. D) Immunostaining of representative *SCL^{tg}LMO1^{tg}* induced leukemia.

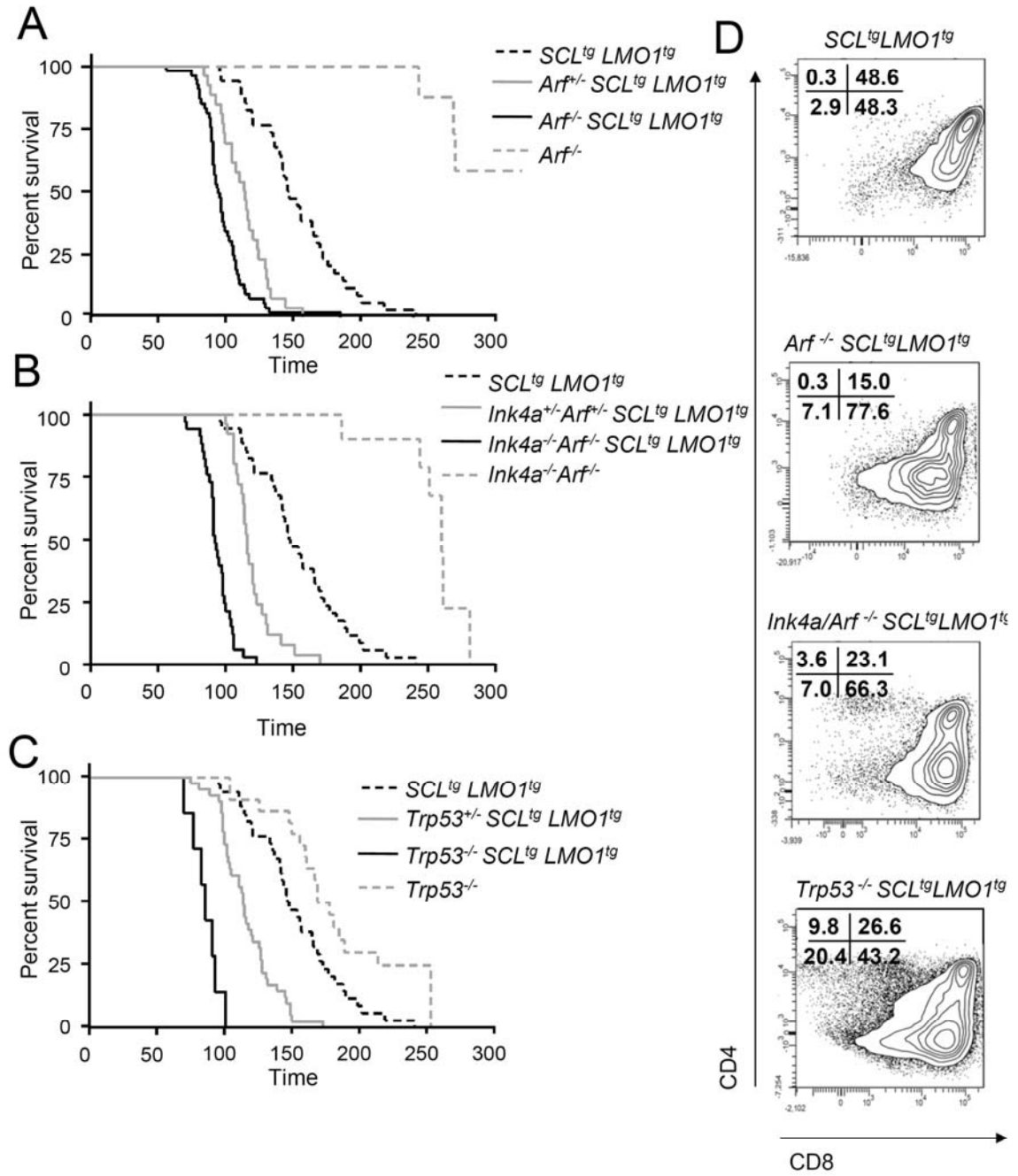


Figure 5.6

Table 5.S1. List of genes regulated by E2F1, RB1, TRP53.

Distribution analysis of compiled lists of genes upregulated or downregulated by specified transcription factors based on their expression levels between *Cd3ε^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* thymocyte and control (*Cd3ε^{-/-}*). P values represent the difference in the distribution of specified genes list when compared to all genes found on affymetrix chip.

List of genes	p value	Nb of genes	References	Model
Genes regulated by E2F	5.7E-16	150		
		130	Bracken et al. 2004	Review
		17	Lavia et al. 1999	Review
		119	Ren et al. 2002	ChIP on chip
Genes downregulated by Rb1	<2e-16	123	Markey et al. 2007	Gene expression of cell line overexpressing Rb1
Genes upregulated by Rb1	0.038	50	Markey et al. 2007	Gene expression of cell line overexpressing Rb1
Genes regulated by p53	0.000034	688		
		50	Ceribelli et al. 2006	ChIP on chip
		57	Krieg et al. 2006	ChIP on chip
		214	Kho et al. 2004	Gene expression of p53-/- cell line
		131	Wei et al. 2006	Gene expression of p53-/- cell line; ChIP
		111	Spurgers et al. 2006	Gene expression of cell line overexpressing p53
		55	Zhao et al. 2000	Gene expression of cell line overexpressing p53
		85	Kannan et al. 2001	Gene expression of cell line overexpressing p53
		49	Harms et al. 2004	Review
Genes downregulated by p53	6.9E-10	360		
		111	Spurgers et al. 2006	Gene expression of cell line overexpressing p53
		176	Kho et al. 2004	Gene expression of p53-/- cell line
		60	Wei et al. 2006	Gene expression of p53-/- cell line; ChIP
		19	Zhao et al. 2000	Gene expression of cell line overexpressing p53
		23	Kannan et al. 2001	Gene expression of cell line overexpressing p53
Genes upregulated by p53	0.19	212		
		38	Kho et al. 2004	Gene expression of p53-/- cell line
		71	Wei et al. 2006	Gene expression of p53-/- cell line; ChIP
		36	Zhao et al. 2000	Gene expression of cell line overexpressing p53
		62	Kannan et al. 2001	Gene expression of cell line overexpressing p53
		49	Harms et al. 2004	Review

Table 5.S1

Table 5.S2 The gene expression pattern in preleukemic $SCL^{tg} LMO1^{tg}$ thymocytes correlates with a senescence gene signature.

Distribution analysis of compiled lists of genes upregulated or downregulated in senescence-induced cells based on their expression levels between $Cd3\epsilon^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}$ thymocyte and control ($Cd3\epsilon^{-/-}$). P values represent the difference in the distribution of specified genes list when compared to all genes found on affymetrix chip.

Reference	Gene expression associated with senescent state	Nb of genes	p value	Model
Scharze et al. 2002	↑	58	0.31	Human prostatic epithelial cells (HPECs)
	↓	37	4.70E-10	
Wells et al. 2003	↑	23	0.75	HeLa cervical cancer cell line
	↓	34	0.032	
Zhang et al. 2003	↑	8	0.00085	HMEC
	↓	21	0.0015	
Zhang et al. 2003	↑	318	0.035	Human primary fibroblast cell lines (WI38, WS1, BJ)
	↓	253	0.000031	
Larsson et al. 2004	↑	153	0.00015	Murine epithelial cell line (Epi-A1)
	↓	118	<2e-16	
Hardy et al. 2005	↑	37	0.026	Primary breast fibroblasts (HMF3)
	↓	45	0.00013	
Hardy et al. 2005	↑	334	0.55	Primary breast fibroblast (HMF3) immortalized by TERT and SV40 large T antigen
	↓	236	<2e-16	
Hardy et al. 2005	↑	30	0.2	Primary breast fibroblast (HMF3) immortalized by TERT and SV40 large T antigen
	↓	88	9.7E-15	
Milyavsky et al. 2005	↓	168	<2e-16	Bypass of serially induced senescence by inactivation of p53
Milyavsky et al. 2005	↑	250	<2e-16	Human primary fibroblast cell line (WI38)
	↓	397	0.048	

Table 5.S2

Figure 5.S1. Phenotype of preleukemic and leukemic *Cd3ε*^{-/-} *SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} thymi.

A) Preleukemic thymocytes from wild type, *Cd3ε*^{-/-} and *Cd3ε*^{-/-}*SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} mice were stained with antibodies against CD25, CD44, CD4, CD8 and Thy1.2 and analyzed by flow cytometry. B) Box plot of the time of onset to leukemia of transgenic mice *SCL-LMO1* in absence or presence of *Cd3ε* based on sacrifice or death of an animal diagnosed at necropsy with malignant thymic lymphoma.

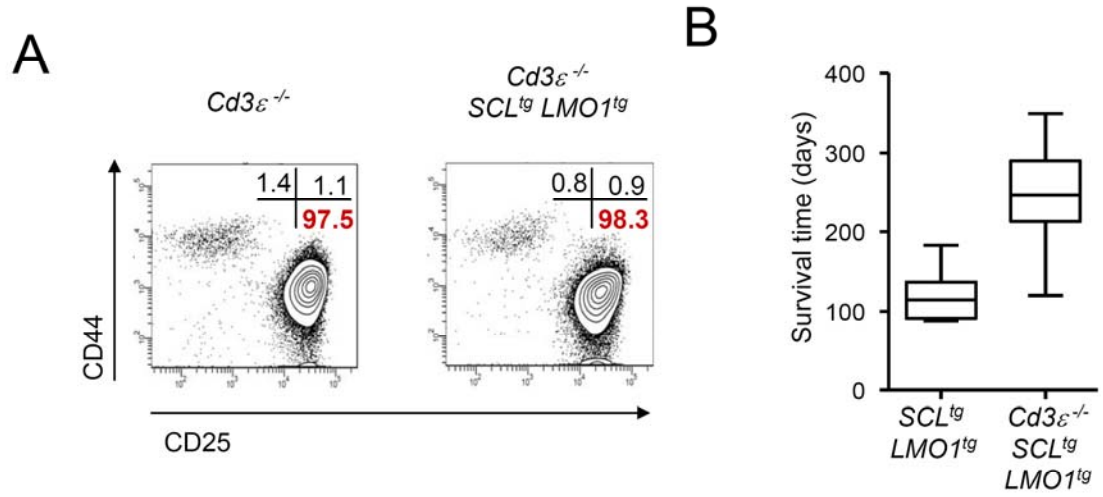


Figure 5.S1

Figure 5.S2. *SCL* and *LMO1* overexpression in thymocytes affects specific pathway.

A) Enrichment analysis of target genes of E2F, RB, TRP53, GATA, NFkB or MYC overrepresented among the genes significantly affected when compared to the whole chip. B-D) Distribution of genes regulated by genes (black bar) upregulated by RB1 (B), downregulated by RB1 and upregulated by E2F1 (C) or upregulated by TRP53 (D) superimposed to the distribution of all the genes found on affymetrix chip (black line) based on their log₂ ratio between *Cd3ε*^{-/-}*SCL*^{tg}*LMO1*^{tg} thymocytes and *Cd3ε*^{-/-} control thymocytes. P value represents the difference in the distribution of specified genes list when compared to total microarray genes distribution.

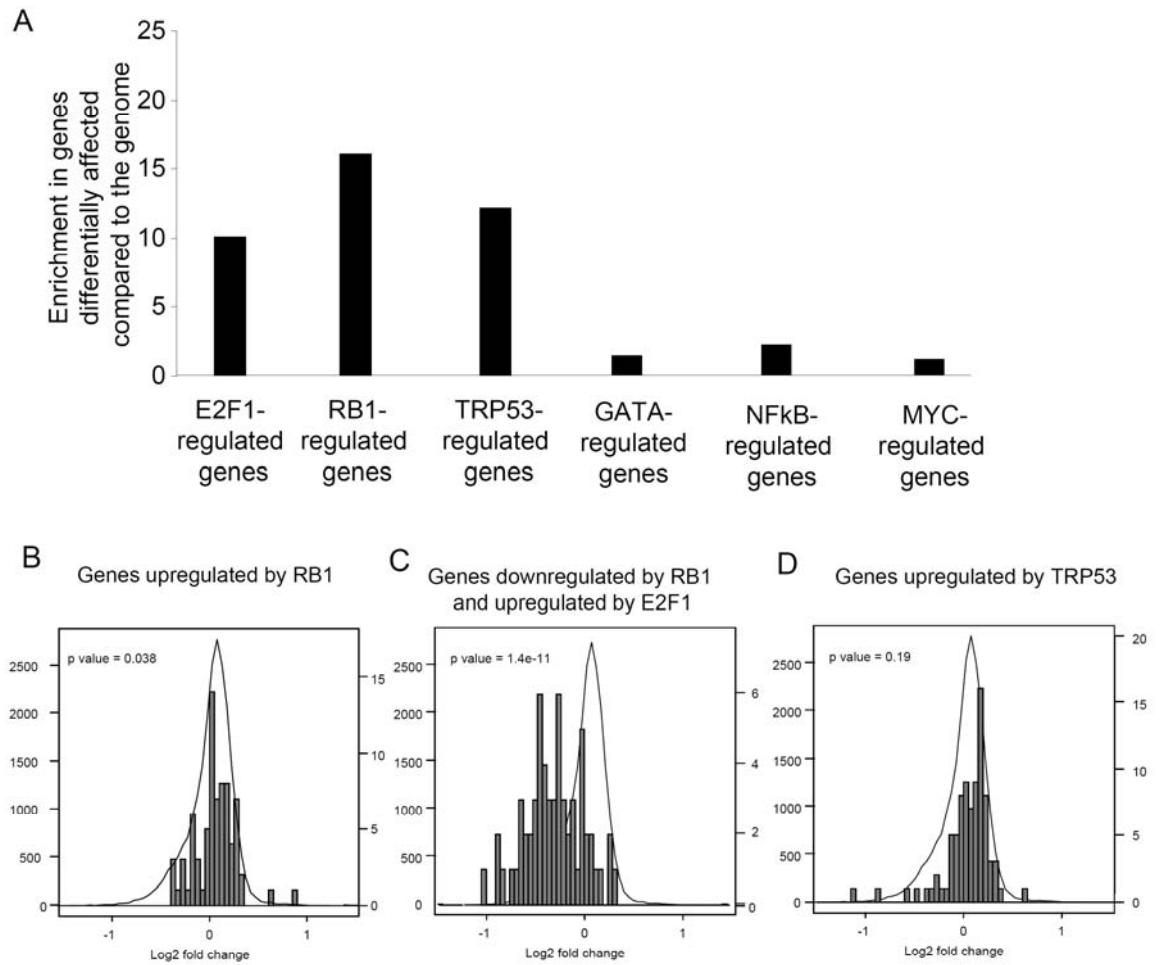


Figure 5.S2

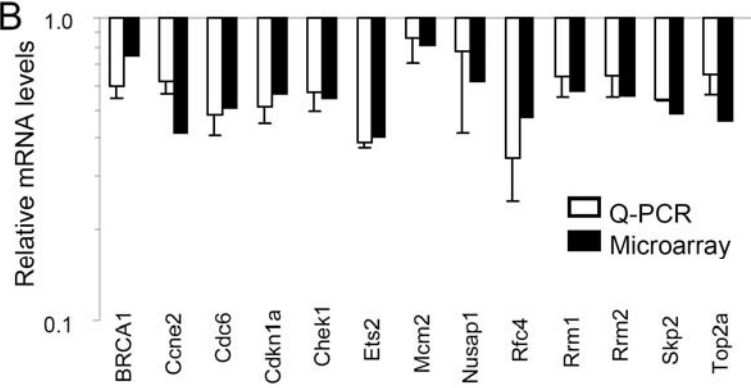
Figure 5.S3. *SCL* and *LMO1* overexpression in thymocytes lead to a repression of genes associated with the cell cycle and increase in cell cycle inhibitors.

A) Gene Ontology (GO) terms and Kegg pathway analysis of differentially expressed genes between *Cd3ε^{-/-}* and *Cd3ε^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* thymocytes. GO terms were ranked by fold enrichments and p-values. Fold enrichment represents the ratio of the frequency of a GO term in the list of differentially expressed genes over its frequency in the whole genome. B) Q-PCR were performed on selected genes associated with DNA replication and cell cycle regulation from Figure 5.S2A to validate cDNA array results. Microarray data and quantitative RT-PCR are shown as a ratio of *Cd3ε^{-/-}* over *Cd3ε^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* thymocytes normalised to *Hprt* and represent the mean ± standard deviation of three independent RNA samples. C) Cell cycle regulatory genes expression was measured by quantitative RT-PCR. mRNA levels of the indicated genes represent ratio of *Cd3ε^{-/-} SCL^{tg} LMO1^{tg}* over *Cd3ε^{-/-}* control thymocytes normalised to *Hprt* as an internal control and represent the mean ± SD of three independent mRNA samples.

A

Term	Nb of genes	p value
<u>Kegg pathways</u>		
Cell Cycle	13	2.8×10^{-8}
<u>GO Biological process terms</u>		
Cell cycle	29	1.9×10^{-12}
DNA replication	15	1.6×10^{-11}
Regulation of progression through cell cycle	21	5.8×10^{-11}

B



C

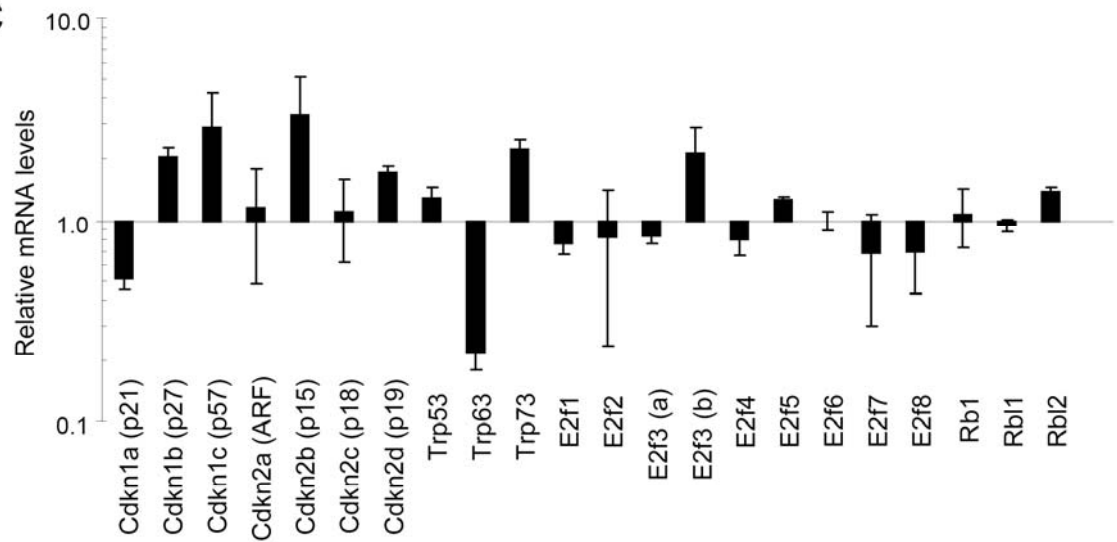


Figure 5.S3

Figure 5.S4. *SCL* and *LMO1* do not affect apoptosis in preleukemic thymus.

TUNEL assay of cryostat of *Cd3ε*^{-/-} and *Cd3ε*^{-/-}*SCL*^{tg}*LMO1*^{tg}. Histological sections of preleukemic thymus were analyzed by the TUNEL reaction and apoptotic cells are shown (arrow head).

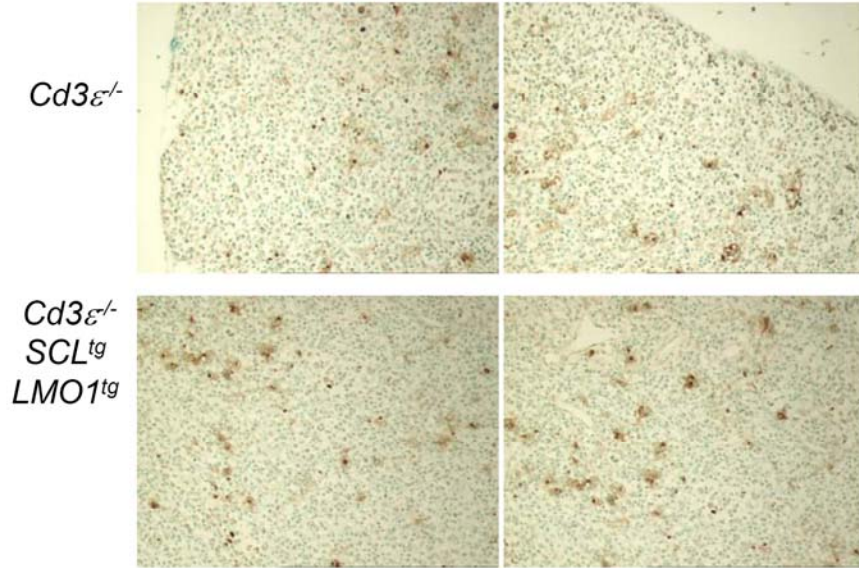


Figure 5.S4

Table 5.S3. Survival analysis of *SCL^{tg}LMO1^{tg}* mice in specified background.

Time of onset to leukemia of transgenic mice *SCL-LMO1* in absence of either one or two allele of cell cycle regulators such as *Trp53*, *Arf* or *Ink4a/Arf*. The number of days corresponding to median and 33% of survival is shown ($p < 0.0001$). Cohorts of n mice were analyzed per genotype.

Genotype	Median (days)	33% survival (days)	n (leukemic mice)
<i>SCL^{tg}LMO1^{tg}</i>	138	155	31
<i>Arf^{+/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}</i>	114,5	119	26
<i>Arf^{-/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}</i>	97	104	60
<i>Arf^{-/-}</i>	-	-	3*/17
<i>Ink4a/Arf^{+/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}</i>	116	119	25
<i>Ink4a/Arf^{-/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}</i>	99	108	33
<i>Ink4a/Arf^{-/-}</i>	260	261	5*/10
<i>Trp53^{+/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}</i>	114	123	41
<i>Trp53^{-/-} SCL^{tg}LMO1^{tg}</i>	87,5	89	12
<i>Trp53^{-/-}</i>	167	180	17*/22

TABLE 5.S3

Table 5.S4 The 39 cases grouped by predicted survival times.

H: HOX11+, n = 11. L: LYL1+ and the like, n = 6. T: SCL+ and the like, n = 16. HL: HOX11L2+, n = 3. M: MLL-ENL, n=3. Obs. surv: observed survival time (months). Progn. group: prognostic group derived by the survival forest method. D=homozygous deletion of INK4A/ARF locus, d= heterozygous deletion of INK4A/ARF locus , W=wild type allele.

Progn Group	RT-PCR group	INK4A deletion	Status	Obs. survival	Cytogenetic abnormalities
T	T8	DD	0	158.40	Normal, TAL1d+
T	N1	DW	1	7.27	t(7;11)(q35;p13)
T	T2	DD	1	5.67	del(6)(q21q23);TAL1d+
T	T5	DD	1	0	add(4)(q31);TAL1d+
T	T11	DD	0	13.53	del(16)(q13);TAL1d+
T	T1	DW	1	10.27	del(9)(p21)
T	T12	DD	1	0	dup(4)(q28-32),del(6)(q13q21);TAL1d+
T	T3	DD	1	14.27	add(9)(p13),?i(9)(p10)
T	N2	DD	1	16.63	Normal
T	N7	DD	0	53.73	Near-tetraploid:del(11)(q22-23)
T	T13	DD	0	39.53	Normal
T	T14	WW	0	40.77	add(14)(q22),TAL1d+
T	T9	DD	0	36	add(19)(p13);TAL1d+
T	T6	DW	1	31.57	Normal
T	T4	DD	0	28	Normal
T	T10	DD	0	13.5	Normal
M	N10	WW	0	97.83	Normal karyotype/MLL-ENL+byRT-PCR
M	N6	DD	0	40	t(11;19)(q23;p13.3)/MLL-ENL+byRT-PCR
M	L2	WW	0	54.17	add(10)(q24),t(11;19)(q23;p13.3)/MLL-ENL+byRT-PCR
L	L5	WW	0	79.87	del(11)(q23),FLT3ITD+
L	L3	WW	1	52	47,t(3;11)(q12;p15),+19
L	L1	WW	1	0	Normal
L	TL1	WW	0	30.1	del(11)(q21q25),del(13)(q22,q34)
L	TL2	WW	0	28.73	add(15)(p11.1),del(5)(q22q33),del(13)(q12q14),del(17)(p11.2),-19
L	L4	WW	1	0	?inv(12)(p11.2q24.1),del(5)(q13q22),del(13)(q12q22)
HL	N3	DD	0	142.13	Normal
HL	N3	DD	1	7.03	-
HL	N8	DD	0	19.17	t(2;16)(q35-37;q13-21),t(9;11)(p21;p14)
H	H4	DD	0	150	t(7;10)(q35;q24)
H	H2	DD	0	147.67	-5,-8,-19,+3mar
H	H3	DD	0	149.77	83/51,+X,+9,+21,+21,+mar
H	H6	DD	0	17.33	47,+8,del(9)(p21),add(9)(p23),del(10)(q24q26),del(12)(p11)
H	H7	DD	0	95.13	t(10;14)(q24;q11);del(14)(q24q32)
H	N5	DD	0	89.67	del(7)(q35),del(9)(p13)
H	T7	DD	0	60.9	del(1)(p22p32),del(6)(q15q21),i(9)(q10),t(10;14)(q24;q11),TAL1d+
H	H1	DD	0	59.27	47,+19
H	N9	WW	0	44.3	t(7;7)(p15;q35)
H	H5	DD	0	27.67	t(5;11)(q33;q13),+8
H	H8	DD	0	12.9	t(10;14)(q24;q11)

Table 5.S4

5.8 Acknowledgments

We would especially like to thank co-author Thu Hoang who participated actively until only a few weeks before her death and made significant contributions to this study. We would like to thank Danièle Gagné (IRIC) for her assistance with cell sorting, Annie Perreault, Veronique Mercille and Veronique Litalien for mice handling, as well as Patrick Gendron for its assistance with bioinformatic analysis. The work was funded by grants from the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and the National Cancer Institute of Canada (NCIC). M. Tremblay was supported by doctoral awards from CIHR and from the Cole Foundation and V. Lisi was supported by doctoral awards from CIHR, M. Todorova by a studentship from CRSNG and S. Herblot by a postdoctoral fellowship from the Leukemia Research Fund of Canada.

5.9 References

1. Prieur, A. & Peeper, D.S. Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 150-5 (2008).
2. Begley, C.G. & Green, A.R. The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood* **93**, 2760-70 (1999).
3. Bash, R.O. et al. Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study. *Blood* **86**, 666-76 (1995).
4. Ferrando, A.A. et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **1**, 75-87 (2002).
5. Lecuyer, E. et al. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* **100**, 2430-40 (2002).
6. Lecuyer, E. & Hoang, T. SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol* **32**, 11-24 (2004).
7. Hall, M.A. et al. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 992-7 (2003).
8. Mikkola, H.K. et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* **421**, 547-51 (2003).
9. Goardon, N. et al. Ectopic expression of TAL-1 protein in Ly-6E.1-htal-1 transgenic mice induces defects in B- and T-lymphoid differentiation. *Blood* **100**, 491-500 (2002).
10. Herblot, S., Aplan, P.D. & Hoang, T. Gradient of E2A activity in B-cell development. *Mol Cell Biol* **22**, 886-900 (2002).
11. Herblot, S., Steff, A.M., Hugo, P., Aplan, P.D. & Hoang, T. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol* **1**, 138-44 (2000).
12. Rabbitts, T.H. LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. *Genes Dev* **12**, 2651-7 (1998).
13. Wadman, I.A. et al. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J* **16**, 3145-57 (1997).
14. Aplan, P.D. et al. An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J* **16**, 2408-19 (1997).
15. Larson, R.C. et al. Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J* **15**, 1021-7 (1996).

16. Armstrong, S.A. & Look, A.T. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* **23**, 6306-15 (2005).
17. McGuire, E.A., Rintoul, C.E., Sclar, G.M. & Korsmeyer, S.J. Thymic overexpression of Ttg-1 in transgenic mice results in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Mol Cell Biol* **12**, 4186-96 (1992).
18. Borden, K.L., Campbelldwyer, E.J., Carlile, G.W., Djavani, M. & Salvato, M.S. Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *J Virol* **72**, 3819-26 (1998).
19. Dimri, G.P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-7 (1995).
20. Smyth, G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**, Article3 (2004).
21. Breiman, L. Random Forests. in *Machine Learning*, Vol. 45 (ed. Schapire, R.E.) 5-32 (Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2001).
22. Hoang, T. & Parsons, V.L. Bagging survival trees for prognosis based on gene profiles. in *Compstat* (ed. Antoch, J.) 1201-1208 (Physica Verlag, Berlin, 2004).
23. Ishwaran, H. & Kogalur, U. Random survival forests. *Rnews* **7**, 25-31 (2007).
24. Hastie, T., Friedman, J. & Tibshirani, R. *Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference and Prediction* (Springer-Verlag, Berlin, Germany, 2001).
25. Malissen, M. et al. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J* **14**, 4641-53 (1995).
26. Sun, A., Bagella, L., Tutton, S., Romano, G. & Giordano, A. From G0 to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. *J Cell Biochem* **102**, 1400-4 (2007).
27. Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y. & Hattori, M. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res* **32**, D277-80 (2004).
28. Benjamini, y. & Hochberg, T. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Stat Soc B* **85**, 289-300 (1995).
29. Goeman, J.J., van de Geer, S.A., de Kort, F. & van Houwelingen, H.C. A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. *Bioinformatics* **20**, 93-9 (2004).
30. Mathon, N.F. & Lloyd, A.C. Cell senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 203-13 (2001).
31. Park, S.T. & Sun, X.H. The Tall oncoprotein inhibits E47-mediated transcription. Mechanism of inhibition. *J Biol Chem* **273**, 7030-7 (1998).
32. Bischof, O. et al. Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO J* **21**, 3358-69 (2002).
33. Mallette, F.A., Goumard, S., Gaumont-Leclerc, M.F., Moiseeva, O. & Ferbeyre, G. Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene* **23**, 91-9 (2004).

34. Pearson, M. et al. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* **406**, 207-10 (2000).
35. Ferbeyre, G. et al. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* **14**, 2015-27 (2000).
36. Fripiat, C. et al. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem* **276**, 2531-7 (2001).
37. Yoon, S.O., Yun, C.H. & Chung, A.S. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev* **123**, 1597-604 (2002).
38. Lee, H.C. et al. Concurrent increase of oxidative DNA damage and lipid peroxidation together with mitochondrial DNA mutation in human lung tissues during aging--smoking enhances oxidative stress on the aged tissues. *Arch Biochem Biophys* **362**, 309-16 (1999).
39. Collado, M. et al. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem* **275**, 21960-8 (2000).
40. Macip, S. et al. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol* **23**, 8576-85 (2003).
41. Sugrue, M.M., Wang, Y., Rideout, H.J., Chalmers-Redman, R.M. & Tatton, W.G. Reduced mitochondrial membrane potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p53-induced senescence. *Biochem Biophys Res Commun* **261**, 123-30 (1999).
42. Campisi, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* **120**, 513-22 (2005).
43. Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A. & Sherr, C.J. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**, 993-1000 (1995).
44. Quelle, D.E. et al. Cloning and characterization of murine p16INK4a and p15INK4b genes. *Oncogene* **11**, 635-45 (1995).
45. Stone, S. et al. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res* **55**, 2988-94 (1995).
46. Keyes, W.M. et al. p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev* **19**, 1986-99 (2005).
47. Kaghad, M. et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**, 809-19 (1997).
48. Finlan, L.E., Nenuil, R., Ibbotson, S.H., Vojtesek, B. & Hupp, T.R. CK2-site phosphorylation of p53 is induced in DeltaNp63 expressing basal stem cells in UVB irradiated human skin. *Cell Cycle* **5**, 2489-94 (2006).
49. Mills, A.A. p63: oncogene or tumor suppressor? *Curr Opin Genet Dev* **16**, 38-44 (2006).
50. Uramoto, H. et al. Expression of the p53 family in lung cancer. *Anticancer Res* **26**, 1785-90 (2006).

51. Lin, Z. et al. DeltaNp63 protein expression in uterine cervical and endometrial cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* **132**, 811-6 (2006).
52. Takeuchi, Y., Tamura, A., Kamiya, M., Fukuda, T. & Ishikawa, O. Immunohistochemical analyses of p63 expression in cutaneous tumours. *Br J Dermatol* **153**, 1230-2 (2005).
53. Quade, B.J. et al. Expression of the p53 homologue p63 in early cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* **80**, 24-9 (2001).
54. Schwarze, S.R., Shi, Y., Fu, V.X., Watson, P.A. & Jarrard, D.F. Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene* **20**, 8184-92 (2001).
55. Tsugu, A. et al. Expression of p57(KIP2) potently blocks the growth of human astrocytomas and induces cell senescence. *Am J Pathol* **157**, 919-32 (2000).
56. Fogal, V. et al. Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J* **19**, 6185-95 (2000).
57. Guo, A. et al. The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* **2**, 730-6 (2000).
58. Alcalay, M. et al. The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* **18**, 1084-93 (1998).
59. Wu, W.S. et al. The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases. *Mol Cell Biol* **21**, 2259-68 (2001).
60. Ye, X. et al. Definition of pRB- and p53-dependent and -independent steps in HIRA/ASF1a-mediated formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* **27**, 2452-65 (2007).
61. Zhang, R. et al. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* **8**, 19-30 (2005).
62. Scaglioni, P.P. et al. A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* **126**, 269-83 (2006).
63. Kelliher, M.A., Seldin, D.C. & Leder, P. Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase IIalpha. *EMBO J* **15**, 5160-6 (1996).
64. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
65. Hacein-Bey-Abina, S. et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* **118**, 3132-42 (2008).

6 DISCUSSION

Les facteurs de transcription sont importants à l'expression spatio-temporelle des gènes. Leur expression aberrante modifie ces programmes génétiques pour permettre le développement de cancer. Le fonctionnement aberrant ou l'expression anormale de facteurs de transcription comme SCL et LMO1 au niveau du système hématopoïétique entraîne le développement de leucémies. L'étude de ces oncogènes permet d'aborder les mécanismes de transformation affectant les propriétés normales d'une cellule, lesquels pourraient s'appliquer à d'autres types de cancer. Mes recherches ont mis en lumière les voies ciblées par ces oncogènes et leur impact sur les propriétés cellulaires normales, ainsi que de nouveaux évènements collaborateurs importants pour la transformation, contribuant à la compréhension des mécanismes normaux de différenciation, de prolifération, de survie et de réponse au stress cellulaire.

6.1 Différenciation thymocytaire

6.1.1 Les protéines E, des régulateurs transcriptionnels majeurs de la différenciation thymocytaire

L'enclenchement de programmes transcriptionnels spécifiques à la différenciation thymocytaire et la répression graduelle de l'expression de gènes spécifiques aux autres lignées est nécessaire à la spécification thymocytaire. Plusieurs facteurs de transcription influencent cette différenciation selon leur dose et leur stade d'expression. De plus, la combinaison spécifique de facteurs limite le choix de lignée par la répression active de voies alternatives et la promotion de l'expression de gènes requis pour la progression thymocytaire.

Au cours de cette différenciation, l'expression des gènes *E2a* et *Heb* augmente à partir du stade de différenciation DN1/ETP jusqu'au stade DN4 pour diminuer au niveau de la progression au stade DP. Ce patron d'expression est en accord avec les niveaux d'expression du *Ptcra* (*pT α*) qui sont maximaux au stade DN3/4 et diminuent suite à la

sélection β au stade DP. Mes résultats indiquent que les facteurs de transcription E2A et HEB dirigent l'expression du *pT α* , mais aussi de plusieurs gènes dans les thymocytes en différenciation. Malgré leurs patrons d'expression similaires, ces gènes sont incapables de se compenser mutuellement pour l'expression du *pT α* , puisque la présence d'un seul allèle de *E2a* ou *Heb* n'est pas suffisant pour l'expression maximale du pT α . De plus, la perte d'un allèle de *E2a* dans le contexte des souris *Heb*^{+/-} entraîne une augmentation du phénotype causée par l'haploinsuffisance de *Heb*, résultant en une augmentation dans les populations DN et ISP8 (84). Ces résultats révèlent l'importance de ces facteurs pour le développement des cellules T. Le dosage combiné de E2A et HEB contrôle les niveaux du pré-TCR, mais aussi de plusieurs autres gènes comme *Rag1* et *Rag2*, nécessaires au réarrangement du locus du TCR et *Il7ra*, permettant la prolifération et la survie des progéniteurs thymiques et conséquemment la destinée cellulaire dans le thymus.

L'importance d'une régulation fine des protéines E est mise en évidence par la présence au cours de la différenciation thymocytaire de différentes protéines capables de réguler leur activité. L'interaction entre NOTCH et DLL-1/4 dans les progéniteurs entraîne une expression soutenue de *Notch1* et l'induction de *Notch3*, causant l'inhibition des voies de différenciation alternatives myéloïde et dendritique (34,435). De plus, le récepteur NOTCH coopère avec le pré-TCR et inhibe l'activité transcriptionnelle du facteur E2A pour permettre la prolifération des cellules DN4 (37-39). La voie de signalisation de NOTCH entraîne la dégradation de la protéine E2A (64), alors que le signal du pré-TCR induit l'expression des protéines ID2 et ID3 qui inhibent leur activité (65,79). Comme les protéines E sont importantes au réarrangement des chaînes du TCR, le signal du pré-TCR ou du TCR dont les chaînes β ou α sont respectivement réarrangées correctement empêche le réarrangement de la deuxième copie du TCR par exclusion allélique (82). En absence de signal du pré-TCR, les cellules DN3 *Rag1*^{-/-}*E2a*^{-/-} sont capables de passer la sélection β et progressent au stade DP (65). La délétion de *E2a* et *Heb* induit une augmentation de la prolifération des cellules au stade DN3, suggérant que les protéines E2A et HEB limitent la

prolifération avant l'expression d'un pré-TCR fonctionnel (83,84). De plus, la délétion simultanée de *E2a* et *Heb* au stade DP favorise le passage au stade SP indépendamment de la sélection positive régulée par le TCR. Comme le signal du TCR inhibe aussi l'activité des protéines E via l'induction des protéines ID, cette rétroaction négative permet à E2A et HEB de maintenir les cellules au stade DP jusqu'à la production d'un TCR $\alpha\beta$ fonctionnel (85). L'activité des protéines E est donc régulée par leurs niveaux d'expression, mais aussi par leurs interactions avec d'autres protéines pouvant être sous le contrôle de voies de signalisation stade-spécifique.

6.1.2 Effet transcriptionnel de *SCL* et *LMO1* : Répression des gènes cibles des protéines E

L'expression aberrante de *SCL* et *LMO1/2* dans le thymus cause un blocage de la différenciation des thymocytes entre les stades DN et DP (88,152). Nos résultats indiquent que celui-ci est dû à une altération de l'activité normale des facteurs de transcription E2A et HEB. De plus, le blocage de la différenciation par *SCL* et *LMO1* n'étant pas exacerbé par la perte d'un allèle de *E2a* ou de *Heb*, ceci suggère que ces protéines agissent dans la même voie génétique au niveau de la différenciation. D'autre part, mes résultats montrent que la surexpression de *SCL* et *LMO1* cause une répression de l'expression de gènes cibles activés normalement par les protéines E, autant qu'une activation de gènes cibles normalement réprimés par celles-ci.

Les facteurs de transcription agissent en combinaison pour activer ou réprimer l'expression de groupes de gènes spécifiques. L'interaction de ces protéines en complexe permet une régulation spatio-temporelle fine des gènes cibles déterminant le choix de lignage. Les protéines E étant exprimées dans les progéniteurs et dans différentes lignées hématopoïétiques, selon la combinaison de cofacteurs exprimés, la différenciation se produira dans une lignée ou une autre. Par exemple, dans la lignée érythroïde, l'expression

de SCL, LMO2, LDB1 et les protéines GATA1 ou 2 avec les protéines E favorise la différenciation érythroïde (Revue par (436)). Des niveaux élevés d'activité E2A permettent la différenciation en cellules B, alors que des hétérodimères E2A et HEB semblent nécessaires à l'établissement de la lignée T. Les progéniteurs entrant dans le thymus possèdent une plasticité permettant la différenciation dans des voies de différenciation alternative. Cette plasticité dépend d'une compétition entre facteurs. Plusieurs facteurs tels que *Gata3*, *Myb*, *Runx1*, *E2a* et *Heb*, sont déjà exprimés dans les progéniteurs DN1/ETP et leur expression augmente avec la différenciation jusqu'au stade DN3 où les cellules deviennent commises à la lignée T, alors que l'expression d'autres facteurs comme *Scl* et *Lmo2* diminue avec la différenciation. SCL fonctionne dans des complexes multifactoriels dont la variation en composition permet une flexibilité et une spécification dans la régulation de programmes d'expression génique lignée-spécifique. La surexpression de *SCL* dans la moelle osseuse favorise la différenciation érythroïde (437), alors que la délétion conditionnelle de *Scl* chez la souris adulte empêche la différenciation érythroïdes et mégacaryocytaires, n'affectant pas la lignée myéloïde et lymphoïde (188,189). Il est donc possible que dans un contexte normal, *Scl* et *Lmo2* possèdent un rôle au niveau de la détermination de lignage en réprimant l'activité de facteurs de transcription important à la spécification T comme les protéines E2A et HEB.

De plus, nos données ont permis d'identifier de nouvelles cibles de E2A et HEB, comme les facteurs de transcription *Hhex* et *Lyl1* dont l'expression aberrante dans le thymus cause un blocage de la différenciation thymocytaire (197,363). Ces gènes possèdent un patron d'expression opposé à celui des protéines E et similaire à celui de *Scl*, étant réprimé normalement au cours de la différenciation (139,362). L'inhibition de l'activité des protéines E par SCL favorise l'expression de ces gènes. *Hhex* est nécessaire à la lignée myéloïde alors que *Lyl1* possède une fonction au niveau des cellules souches hématopoïétiques et de la lignée lymphoïde B (360,438). De plus, LYL1 est capable de réprimer l'activité des protéines E au niveau de l'activité de l'enhancer et du promoteur du

gène *CD4* tout comme SCL (88,197). Ces gènes pourraient donc être impliqués en aval de *Scl* et *Lmo2* dans la détermination de lignage dans le thymus, leur régulation à la baisse étant nécessaire à la différenciation dans la lignée T.

6.1.3 Mécanisme moléculaire d'action de SCL sur l'activité transcriptionnelle de E2A et HEB

La protéine SCL est un facteur de transcription important pour la différenciation des cellules hématopoïétiques. Son expression est restreinte aux cellules souches, aux progéniteurs des différentes lignées, ainsi qu'aux lignées mégacaryocytaire et érythroïde. La fonction d'activation transcriptionnelle de SCL dépend de sa capacité à former de larges complexes multiprotéiques sur l'ADN. Ces complexes sont composés minimalement des protéines E2A et/ou HEB, GATA1/2/3, LDB1 et LMO1/2 (163,167). Selon le contexte, le recrutement de différents cofacteurs permet une activation ou une répression transcriptionnelle. SCL interagit avec les coactivateurs P300 et PCAF ou les corépresseurs SIN3A, HDAC et ETO2 pour réguler la transcription (171-173). Dans la lignée érythroïde, SCL interagit en complexe avec plusieurs protéines. Par exemple, ETO2 qui recrute des modificateurs de la chromatine fait partie du complexe SCL via une interaction avec les protéines E2A et HEB. Des changements dans la stœchiométrie de la protéine ETO2 à l'intérieur du complexe SCL permet l'activation ou la répression transcriptionnelle (59). Des protéines de modification de la chromatine de type histone-acétyl-transférase HAT (TRRAP et BRD1) ou de type histone désacétylase HDAC (HDAC1 et HDAC2) ont été retrouvées associées avec le complexe SCL. Le complexe régule l'expression de gènes érythrocytaires tels que *Gpa* et *P4.2* et sa composition change au cours de la différenciation. Les protéines associées à l'activation transcriptionnelle sont retrouvées abondamment dans les cellules érythroïdes différenciées, tandis que les protéines associées avec une répression transcriptionnelle (HDAC) sont majoritaires dans les cellules non différenciées (59).

Dans la lignée lymphoïde, l'expression aberrante de SCL conjuguée à l'absence de partenaires appropriés inhibe l'activité des protéines E2A et HEB causant un arrêt de la différenciation thymocytaire. De plus, *SCL* interagit génétiquement avec *LMO1* pour réprimer l'activité des facteurs de transcription E2A et/ou HEB dans les souris transgéniques, causant un arrêt de différenciation associée avec une inhibition des gènes *Cd4* et *pT α* dans les thymocytes (mes données) (88). Alors que le mécanisme d'action de SCL en tant qu'activateur transcriptionnel dans la lignée érythroïde est bien caractérisé, le mécanisme par lequel SCL réprime la transcription dans la lignée lymphoïde est encore mal défini. Les protéines E, dont E2A, sont généralement considérées comme des activateurs de la transcription, bien qu'elles possèdent aussi des cibles de répression dans le thymus. Cette fonction dépend de l'interaction de leur domaine de transactivation (AD1) avec les complexes SAGA (55) et P300/PCAF, des acétylateurs d'histones associés à l'activation génique (56,57). Bien que SCL puisse séquestrer E2A ou HEB en dehors de l'ADN cible par un mode d'action similaire aux protéines ID, j'ai montré que SCL s'associe avec E2A et/ou HEB sur l'ADN, suggérant que SCL agit via un mécanisme actif d'inhibition. SCL pourrait donc agir en empêchant la formation de complexes transcriptionnels requis pour l'activité de l'enhancer du *pT α* , ou alternativement en recrutant des cofacteurs qui répriment directement la transcription. Le fait que SCL entraîne aussi une activation transcriptionnelle de certaines cibles normalement réprimés de E2A indique que la fonction de SCL n'est pas seulement de recruter des corépresseurs. Dans ce cas, il pourrait recruter des coactivateurs ou plus probablement empêcher le recrutement de corépresseurs par E2A et HEB.

Pour étudier la répression transcriptionnelle au niveau moléculaire, nous avons généré des chimères de la protéine SCL. La fusion de la protéine SCL avec le domaine d'activation de VP16 permet de transformer SCL en superactivateur comme montré sur un gène rapporteur UAS-GAL4 et sur le promoteur d'un gène érythroïde (*Gpa*) (Figure A.1C-D). Par contre,

ce domaine est incapable de contrer l'activité répressive de SCL dans le contexte de l'enhancer du *pTα* dans les cellules T (Figure A.1B). Tout comme le domaine d'activation de E2A, le domaine superactivateur de VP16 interagit avec le complexe multiprotéique SAGA impliqué dans l'acétylation des histones et le recrutement de complexe de remodelage de la chromatine (ex : SWI/SNF) (439). Ainsi, la perturbation de la fonction de E2A observée en présence de SCL ne semble pas venir d'une incapacité à interagir avec les composantes du complexe SAGA, puisque le recrutement de coactivateurs par VP16 ne permet pas de contrer cette répression.

Nous avons aussi généré des chimères entre SCL et HEB afin de cartographier le domaine de répression de SCL. L'échange du domaine bHLH ou du HLH de SCL par celui de HEB neutralise l'activité répresseur de SCL sur l'activité de l'enhancer du *pTα* (Figure A.1B). La délétion du domaine basique de SCL ou son remplacement par celui de HEB n'affecte pas son activité répressive. Ensemble, ces résultats indiquent que la fonction de répression de la transcription provient du domaine HLH de SCL. Comme SCL et les protéines E occupent l'enhancer du *pTα* et plusieurs autres cibles des protéines E *in situ*, nos résultats indiquent que le domaine HLH de SCL représente un motif d'interaction protéique qui interfère avec la capacité de recrutement des protéines E liées à leur ADN cible. Cette capacité répressive du domaine HLH de SCL est indépendante des coactivateurs recrutés par VP16 ou de corépresseurs recrutés par le domaine de transactivation de E2A ou HEB. L'étude des complexes protéiques interagissant avec SCL sur les séquences régulatrices des gènes cibles dans la lignée lymphoïde pourrait permettre de comprendre un peu mieux le mécanisme d'action de SCL.

Bien que la régulation du *pTα* soit un bon modèle pour l'action de SCL sur les gènes cibles activés par E2A, la régulation transcriptionnelle des gènes cibles normalement réprimés par E2A reste être à explorer. Le modèle d'action de SCL identifié sur le *pTα* devra aussi être testé dans ce contexte.

6.2 Collaboration génétique dans les leucémies de type T-ALL

Le cancer est une maladie multigénique impliquant des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs ainsi que des voies de signalisation. L'étude de la leucémie a permis de comprendre une partie des événements amenant à la transformation. Ainsi 70% des translocations chromosomiques récurrentes dans les leucémies T-ALL impliquent des facteurs de transcription oncogéniques, suggérant que la transformation cellulaire modifie les programmes d'expression génique normaux au niveau moléculaire

6.2.1 Les protéines E, des suppresseurs de tumeurs

La transformation nécessite une inactivation de la fonction de gènes suppresseurs de tumeurs qui agissent en tant que gardiens de l'intégrité du matériel génétique (« *caretaker* ») ou de la progression dans le cycle cellulaire (« *gatekeeper* »). L'inactivation de ces gènes se produit généralement suite à des mutations, des délétions chromosomiques ou des changements épigénétiques. Par contre, leur fonction peut être modifiée par l'expression aberrante de protéines régulatrices.

La perte de fonction de *E2a* ou *Heb* chez la souris entraîne le développement de leucémie des cellules T suggérant un rôle en tant que gène suppresseur de tumeur pour ces 2 protéines (70,77). De plus, plusieurs oncogènes semblent cibler la fonction antitumorale des protéines E dans le thymus. Tout comme SCL, la surexpression des protéines ID1 induit le développement de leucémies chez la souris (235). Alors que SCL réprime l'activité des protéines E via un mécanisme dépendant d'une association à l'ADN, tel que montré par ChIP, les protéines ID inhibent la fonction des protéines E via un mécanisme de titration en dehors de l'ADN dû à leur incapacité de s'associer à l'ADN. De plus, d'autres protéines de la famille bHLH capables d'interagir avec les protéines E ont été retrouvées activées dans les leucémies humaines T-ALL (127). Les protéines TAL2, LYL1 et

BHLHB1 pourraient aussi agir via la répression de l'activité transcriptionnelle des protéines E. Bien que l'expression ectopique des protéines SCL et LMO1 dans le thymus semble suffisante à la répression de l'activité des protéines E2A et HEB sur la différenciation au stade préleucémique, au stade leucémique, la perte d'un allèle des gènes *E2a* ou *Heb* collabore avec la surexpression des oncogènes *SCL* et *LMO1*. Cette haploinsuffisance de *E2a* ou *Heb* dans l'induction des leucémies dépendantes de *SCL* et *LMO1* suggère un gradient d'activité des protéines E, un niveau plus élevé est nécessaire dans l'activité de suppression tumorale, alors qu'un seuil plus faible est suffisant pour la différenciation thymocytaire.

Un autre proto-oncogène associé avec les leucémies T-ALL est la protéine NOTCH1. Ainsi des mutations activatrices de *NOTCH1* ont été retrouvées dans la majorité des leucémies humaines de type T-ALL (247) et la surexpression de *NOTCH1* ou *NOTCH3* dans le thymus induit des leucémies chez la souris (244,246). NOTCH inhibe l'activité de E2A, probablement en déstabilisant la protéine (38,39,64,440). Celle-ci est dépendante de l'interaction de E2A avec les protéines ubiquitine ligase CHIP et SKP2 causant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. La présence de mutations activatrices de *NOTCH1* dans des leucémies associées avec des translocations impliquant les facteurs bHLH tels que *SCL*, *BHLHB1*, *TAL2* et *LYL1* renforce l'idée que l'inhibition de l'activité antitumorale des protéines E doit dépasser un certain seuil et pourrait nécessiter l'action de plus d'un évènement oncogénique.

Tout comme la voie de signalisation de NOTCH1, la voie du pré-TCR est importante à la transformation lymphoïde. Or, cette voie de signalisation cause aussi une inhibition de l'activité des protéines E. L'activation du signal du pré-TCR induit une cascade de phosphorylation de la voie RAS/MAPK causant l'induction de la protéine ID3 (79). L'association de la protéine ID3 avec les protéines E empêche leur liaison à leur gène cible sur l'ADN par un mécanisme de titration. Il est donc possible que l'effet collaborateur

oncogénique de cette voie de signalisation passe en partie par une inhibition de l'activité suppresseur de tumeurs des protéines E.

De plus, bien que *E2A* ne soit pas muté dans les leucémies T-ALL, le gène *E2A* est impliqué dans des translocations chromosomiques à l'origine de leucémies lymphoblastiques aigües des cellules B (B-ALL) (441-443). Ces translocations entraînent la fusion du domaine de transactivation de *E2A* avec le domaine de liaison à l'ADN et de dimérisation des protéines HLF (« hepatic leukemia factor »), PBX1 (« preB cell leukemic homeobox1 ») ou FBI (444) produisant de nouveaux facteurs de transcription (441,445-449). Leur rôle oncogénique a été montré par des modèles de souris transgéniques (450-456) qui développent des leucémies des cellules T (450,451,454,457). De plus, la protéine HEB a été retrouvée dans une translocation récurrente dans des chondrosarcomes myxoïdes extrasquelettiques, menant à la fusion du domaine de transactivation en N-terminal de HEB à la protéine entière TEC (458). Bien que les domaines de HLF, PBX1, FBI ou TEC soient importants dans la fonction oncogénique des protéines de fusion, ceci suggère que la perte d'un allèle de *E2a* contribuerait également à la leucémie. Finalement, l'inactivation fonctionnelle ou génétique de *E2A* et *HEB* suggère que ces gènes ont une activité suppresseur de tumeur.

Dans les leucémies T-ALL, les protéines E pourraient être inhibées par leur hétérodimérisation avec des oncoprotéines de la famille bHLH comme SCL, LYL1, TAL2 et BHLHB1 et/ou par des voies de signalisation spécifiques aux cellules T comme la voie du pré-TCR et de NOTCH1. Dans les leucémies de type B-ALL, le locus de *E2A* est une cible récurrente de translocations chromosomiques possiblement causant une haploinsuffisance de son activité. Cette convergence d'inactivation des protéines E dans les leucémies lymphoïdes suggère que les protéines E possèdent une fonction de suppresseur de tumeurs spécifiquement dans ce compartiment.

6.2.2 Interaction protéique entre SCL et LMO1/2

Les protéines SCL et LMO1/2 sont impliquées dans le développement de la leucémie lymphoblastique aiguë (T-ALL). Tout comme *SCL* qui est surexprimé dans 60% des cas chez l'enfant et 45% chez l'adulte, les gènes *LMO1* ou *LMO2* sont surexprimés dans 45% des cas. *LYL1* et *BHLHB1* sont aussi retrouvés constitutivement surexprimés dans un sous-groupe de leucémie T-ALL (127,195). *LYL1*, *BHLHB1* et *SCL* possède 90% d'identité de séquences dans leur motif bHLH. Or, la majorité de ces patients leucémiques possèdent à la fois une activation de *SCL*, *LYL1* ou *BHLHB1* et *LMO1* ou *LMO2* (401). Alors que la surexpression de *SCL* ou *LMO1/2* dans le thymus est, respectivement, incapable d'entraîner le développement de leucémies (141-144) ou suite à une longue latence (124,209-212), le développement de la leucémie est significativement accéléré par la surexpression de *SCL* avec *LMO1/2* (88,147,149-152). Cette accélération du développement de la leucémie montre la présence de collaboration entre les oncogènes *SCL* et *LMO1/2*. Une collaboration entre *BHLHB1* et *LMO1* existe aussi dans l'induction de la leucémie chez la souris (459).

SCL interagit directement avec les protéines *LMO1/2*. De plus, ces deux protéines font partie d'un complexe transcriptionnel dans la lignée érythroïde. Cette interaction est essentielle à l'activité transcriptionnelle activatrice de ce complexe. En effet, en absence d'un des membres du complexe, celui-ci est inactif ce qui permet une régulation fine de l'expression de leurs gènes cibles. De plus, les protéines *LMO1/2* sont hautement instables et dégradées par le protéasome (358). Leur interaction avec la protéine *SCL* les protège d'une dégradation et augmente leur stabilité. Autant une augmentation de la stabilité que de l'activité transcriptionnelle des protéines *LMO1/2* par l'interaction avec *SCL* pourrait expliquer la nécessité d'une activation concomitante des oncogènes *LMO1/2* avec les protéines bHLH comme *SCL*, *LYL1* et *BHLHB1* dans la leucémogénèse.

La cartographie de la surface d'interaction entre les protéines *SCL* et *LMO1/2* a permis d'identifier les résidus du HLH de *SCL* nécessaires à l'interaction avec *LMO1/2* et de

créer un mutant d'interaction (M13) qui s'hétérodimérise toujours avec E2A, mais est incapable d'interagir avec les protéines LMO1/2 et donc de les stabiliser ((358) et Figure A.2D). J'ai surexprimé ce mutant d'interaction ou la protéine SCL sauvage dans le thymus sous le contrôle du promoteur du gène CD2. Le croisement de ces souris transgéniques (*M13^{tg}* ou *SCL^{tg}*) avec des souris *LMO1^{tg}* m'a permis de montrer que l'interaction entre SCL et LMO1 est nécessaire à l'induction de leucémie. Alors que les souris *SCL^{tg}LMO1^{tg}* développent des leucémies avec une incidence moyenne de 170 jours, les souris *M13^{tg}LMO1^{tg}* présentent une augmentation importante de la latence à 329 jours (Figure A.2A). Cette différence n'est pas due à une différence dans le niveau d'expression de SCL ou du mutant M13 (Figure A.2B). L'interaction directe entre les protéines SCL et LMO1 est donc importante pour le développement de leucémies T-ALL.

Ce mutant est toujours capable d'inhiber l'activité de E2A dans le contexte de l'enhancer du pT α (Figure A.2E) suggérant que l'inhibition de l'activité des protéines E par SCL seul est insuffisante à la leucémogénèse. De plus, ceci indique que les propriétés oncogéniques de SCL et LMO1 reposent soit sur le fait qu'ils agissent ensemble sur les mêmes gènes cibles ou encore que leur interaction est nécessaire pour permettre l'expression de niveaux suffisants de LMO1/2. La coexpression de SCL avec la protéine LMO1 permettrait sa stabilisation et donc son expression soutenue expliquant l'effet collaborateur de SCL et LMO1 au niveau biochimique. L'identification de molécules capables d'inhiber cette interaction ou ciblant l'instabilité de LMO1/2 pourrait représenter une voie intéressante pour le traitement des leucémies T-ALL surexprimant *SCL* mais aussi possiblement *LYL1* et *BHLHB1* puisque l'interaction entre SCL et LMO1 se fait via le domaine bHLH.

6.2.3 La signalisation du pré-TCR

Plusieurs événements oncogéniques sont nécessaires à la transformation et au développement du cancer dont l'incidence augmente avec l'âge. Bien que la leucémie T-ALL puisse se produire à n'importe quel âge, celle-ci est le plus souvent retrouvée chez les

enfants de 2 à 6 ans (460). Or, cette étape du développement de l'enfant correspond à une période d'expansion du thymus durant laquelle le pré-TCR est particulièrement actif.

La signalisation du pré-TCR est impliquée dans la transformation de certains modèles de leucémies T-ALL chez la souris (244,246,372). En absence du pré-TCR, il y a une réduction dramatique de l'incidence et de la pénétrance de la leucémie induite par *NOTCH3* (461). Ces observations suggèrent deux possibilités, soit que le pré-TCR représente un évènement collaborateur ou que le pré-TCR est en aval de Notch3.

Nos résultats indiquent une collaboration spécifique du pré-TCR et non du TCR avec les oncogènes *SCL* et *LMO1* dans la leucémogénèse. Ces deux récepteurs utilisent une chaîne β réarrangée du TCR. Cependant, le complexe du pré-TCR contient la chaîne invariable pT α , alors que le complexe du TCR comprend la chaîne TCR α réarrangée. L'étude de leur spécificité au cours de la différenciation thymocytaire a permis de montrer que le pT α possède un avantage par rapport au TCR α pour la sélection β . Celle-ci vient d'un motif riche en proline dans la queue cytoplasmique du pT α qui est nécessaire à la fonction du pré-TCR (462). De plus, contrairement au TCR, le domaine extracellulaire du pT α possède la capacité de former des oligomères spontanément en absence de ligand (463). Cette capacité d'autoengagement produit un signal de survie et de prolifération de manière autonome, ce qui peut être considéré comme dangereux pour la cellule.

6.2.4 Notch1

Des mutations somatiques activatrices de *NOTCH1* ont été retrouvées dans plus de 50% des patients leucémiques de type T-ALL (240,241) et dans 80% des leucémies *SCL-LMO1/2* chez la souris (390). Ces mutations causent un décalage dans le cadre de lecture ou détruisent un domaine PEST entraînant la stabilisation de la protéine NOTCH1 et une augmentation de son activité. Nos résultats ont permis de révéler la présence de mutation

dans le domaine PEST de NOTCH1 dans les leucémies induites par *SCL* et *LMO1* où le pré-TCR est actif et leur absence dans les leucémies déficientes en pré-TCR. Ceci est consistant avec l'effet d'une absence du pré-TCR sur les leucémies induites par *NOTCH3* causant un délai de 6 mois dans leur induction et une diminution de la pénétrance de 100% à 30-45% (372). Cette collaboration entre le pré-TCR et *SCL-LMO1* accélère le moment d'apparition de la maladie et augmente la pénétrance. En absence d'un pré-TCR fonctionnel, les mutations de *Notch1* ne sont pas sélectionnées ou ces cellules ne sont pas permissives aux mutations.

La voie de NOTCH est nécessaire à la différenciation thymocytaire (Revue par (464)). Celle-ci est initiée au stade ETP et augmente avec la maturation jusqu'au stade DN3. À ce stade, les cellules qui reçoivent des signaux provenant du pré-TCR et de NOTCH1 prolifèrent rapidement, alors que les cellules ne recevant qu'un des deux signaux meurent. Suite à la β -sélection, l'expression de *Notch1* diminue alors que les cellules arrêtent de proliférer pour réarranger les gènes du TCR α (465). L'absence de développement de leucémies par *NOTCH3* dans les souris déficientes en pré-TCR (244,372) suggère que le pré-TCR est important pour le maintien de la croissance cellulaire dans les leucémies. De plus, l'activation même transitoire du pré-TCR permet à *NOTCH3* d'induire une leucémie dans les souris déficientes pour le pré-TCR (461). L'expression continue de NOTCH1 dans les cellules leucémiques pourrait servir à bloquer la différenciation et à permettre la survie des cellules qui devraient généralement être éliminées. Une hyperactivation de NOTCH1 pourrait contourner l'activité inhibitrice des oncogènes *SCL-LMO1* sur E2A et HEB pour rétablir l'expression de déterminants importants de la destinée des cellules T, par exemple l'expression du pT α . L'enhancer du pT α qui contient un site pour la protéine CSL, un effecteur positif de la voie de NOTCH, est régulé par la voie de NOTCH1 (391). L'expression d'un pré-TCR fonctionnel collabore ensuite avec *SCL-LMO1* pour la leucémogénèse. NOTCH1 serait donc en amont du pré-TCR en régulant son expression.

Des mutations de *Notch1* ont été retrouvées dans la majorité des fonds génétiques susceptible de développer des leucémies T-ALL (Revue par (466)). La capacité de NOTCH1 à collaborer avec plusieurs autres perturbations génétiques impliquées dans les T-ALL suggèrent que NOTCH possède des effets sur les progéniteurs des cellules T qui ne sont pas reproduits par l'activation des autres gènes ou voies. La voie de Notch semble donc avoir un rôle complémentaire ou secondaire aux différents oncogènes dans le développement de la leucémie. Les translocations chromosomiques à l'origine des leucémies chez l'homme proviennent généralement d'un réarrangement anormal des Ig ou du TCR par les enzymes recombinaise RAG1 et RAG2 (129,130). Malgré leur expression dans les compartiments lymphoïdes B et T, les translocations impliquant *SCL* et/ou *LMO1/2* ne sont associées qu'avec des leucémies T. De plus, les mutations de *NOTCH1* sont absentes des leucémies B-ALL et peu fréquentes dans les leucémies AML (467). Comme la majorité des cancers et plus spécifiquement les leucémies aigües sont spécifiques à une lignée, certaines mutations doivent renforcer les mécanismes de lignage qui sont détruit par l'activation des oncogènes. L'activation de la voie Notch pourrait donc être nécessaire à cette spécification.

Au cours de l'hématopoïèse, la signalisation par NOTCH exerce un rôle majeur dans la survie, la prolifération et la différenciation. Au niveau de la cellule souche hématopoïétique, NOTCH favorise l'autorenouvellement aux dépens de la différenciation, tandis qu'il oriente la différenciation du précurseur lymphoïde vers la lignée T aux dépens de la lignée B. Une cible importante de NOTCH est le gène *Cdkn1a/p21*, un régulateur négatif de la prolifération, qui semble avoir un rôle au niveau de l'autorenouvellement des cellules souches leucémiques (468). L'expression des oncogènes *PML-RARA* ou *AML1-ETO* entraîne l'induction de dommages à l'ADN et l'activation d'une réponse cellulaire dépendante de *Cdkn1a* associée avec un arrêt de la prolifération. Ainsi les cellules souches leucémiques déficientes en *Cdkn1a* montrent une diminution de leur capacité d'autorenouvellement. Il est donc possible que l'effet collaborateur de *NOTCH1* vienne

d'une augmentation de la capacité d'autorenouvellement des cellules leucémiques via l'induction de *Cdkn1a*.

Contrairement à la majorité des tumeurs solides, les leucémies de type T-ALL présentent une absence de mutation dans le gène TRP53 (469). Cette absence pourrait être expliquée par le fait que la majorité des leucémies de type T-ALL possèdent une mutation activatrice de *Notch1*. Or, NOTCH agit en amont de TRP53 en supprimant son activité (392,470). Une autre explication peut venir du fait que le signal du pré-TCR qui est important à l'induction de la leucémie inhibe l'activité de TRP53, rendant son inactivation non-nécessaire. Ceci pourrait aussi impliquer que le signal du pré-TCR possède une activité anti-sénescence. Des résultats préliminaires de croisements génétiques indiquent que la perte d'un ou deux allèles de *Arf* ou d'un allèle *Ink4a/Arf* accélère la leucémie induite par *SCL* et *LMO1* en absence de *Cd3ε* (Figure A.3). Alors qu'aucune souris *Cd3ε^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* âgées de 115 jours n'ont succombé au développement de leucémie, trois des 6 souris *Arf^{-/-}Cd3ε^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}*, une des trois souris *Arf^{+/-}Cd3ε^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* et une des trois souris *Ink4a/Arf^{+/-}Cd3ε^{-/-}SCL^{tg}LMO1^{tg}* développent la maladie. Cette accélération de la leucémogénèse suggère que la perte d'expression de gènes régulateurs de la sénescence comme *Ink4a* et/ou *Arf* puisse remplacer un pré-TCR fonctionnel pour l'induction de la leucémie en collaboration avec *SCL* et *LMO1*. Il est donc possible que le signal du pré-TCR empêche l'induction de la sénescence par les oncogènes *SCL* et *LMO1*, expliquant son effet collaborateur.

6.3 Réponse cellulaire des cellules préleucémiques à l'activation oncogénique

6.3.1 La sénescence, un mécanisme de protection contre les tumeurs

Le développement de cancer nécessite un nombre élevé de génération et un potentiel répliatif infini pour son maintien. Une barrière à son développement vient donc de la limite du nombre de division cellulaire causant l'entrée en apoptose ou la sénescence. Le contournement de la restriction que pose la sénescence à l'immortalisation pourrait donc correspondre à une étape précoce durant le processus de transformation (434). Les évènements oncogéniques primaires, comme ceux causés par des translocations chromosomiques sont généralement insuffisants en eux-mêmes pour causer l'apparition de leucémie et requièrent des mutations secondaires coopératives pour totalement transformer la cellule. Ces évènements collaborateurs peuvent être différents selon l'évènement cytogénétique initiateur et la cellule de transformation. Dans le cas des leucémies T-ALL induite par SCL et LMO1, le contournement des programmes de sénescence dû à la perte d'un ou deux allèles de *Trp53* ou *Ink4a/Arf* pourrait faciliter l'immortalisation des clones leucémiques et accélérer le développement de la leucémie. La majorité des tumeurs leucémiques humaines de type T-ALL associées avec une activation de *SCL* présente une délétion homozygote ou hétérozygote du locus *CDKN2A* codant pour les protéines INK4A/P16 et ARF. Cette délétion pourrait donc représenter un deuxième évènement nécessaire aux leucémies T-ALL (127). De plus, les leucémies qui se sont développées dans les patients X-SCID traités par thérapie rétrovirale et possédant une intégration dans le locus *LMO2* ont soit une délétion du gène *CDKN2A* ou une intégration activant l'expression du gène *BMI1* (206). Comme BMI1 régule l'expression de *Cdkn2a* et que ces deux mutations sont mutuellement exclusives, elles pourraient agir dans la même voie en permettant un contournement de la sénescence. La perte des inhibiteurs des CDK comme INK4A et ARF correspond à une étape essentielle pour la leucémogénèse induite par les protéines SCL et LMO1. Le contrôle de la sénescence par ces inhibiteurs pourrait représenter une barrière contre la transformation cellulaire dans la lignée T.

Les espèces oxygénées réactives (ROS) qui sont générées par la chaîne respiratoire mitochondriale ont été associées avec l'induction de cancer en induisant des dommages à l'ADN ou en altérant des voies de signalisation intracellulaire (471). La protéine NFKB1

est activée par une augmentation des niveaux de ROS (472-474). Or, la protéine NFκB1 est activée dans le thymus en présence de *SCL-LMO1* (475). Cette augmentation de l'activité de la voie NFκB pourrait provenir d'un effet de *SCL* et *LMO1* sur l'augmentation des niveaux de ROS.

Les ROS peuvent être induits suite à une stimulation mitogénique et sont capables d'induire un phénotype de sénescence (476). Or, les cellules sénescents présentent des niveaux plus élevés de ROS que les cellules normales (477). De plus, les protéines INK4A/P16 et RB1 sont capables d'induire un stress oxydatif. Il serait intéressant de vérifier l'effet d'une inhibition de ce stress oxydatif sur la sénescence induite par *SCL* et *LMO1*. La N-acétyl-cystéine (NAC) est un antioxydant capable d'abolir la sénescence induite par l'oncogène RAS en réduisant les niveaux de ROS (478). Le traitement des souris *SCL^{tg}LMO1^{tg}* avec cet inhibiteur permettra possiblement de contourner les mécanismes de sénescence et accélérer le développement de la leucémie. Les antioxydants qui sont utilisés dans la prévention du vieillissement pourraient entraîner de sérieux effets secondaires en facilitant le développement de cancer.

6.3.2 Effets transcriptionnels de *SCL* et *LMO1*

En plus d'affecter l'activité des protéines E, l'expression des oncogènes *SCL* et *LMO1* dans le thymus affecte différentes voies transcriptionnelles dont celles régulées par TRP53 (P53), E2F1 et RB1. Nos données d'expression génique indiquent que la surexpression de *SCL* et *LMO1* entraîne une diminution de l'expression des gènes réprimés par RB1 et activés par E2F1. La voie de E2F/RB est régulée via une phosphorylation des protéines RB par les complexes CDK4/6-cyclines D. Seule la forme hypophosphorylée des protéines RB interagit avec les protéines E2F causant la répression des cibles transcriptionnelles de E2F (275,276). L'inhibition des protéines CDK4 ou CDK6 par les protéines de la famille INK4 telles que INK4A/P15 ou INK4B/P16 bloque la phosphorylation des protéines RB par les CDK4/6-cycline D causant la répression des facteurs de transcription E2F (271-274). Nos

résultats indiquent que les thymocytes surexprimant *SCL* et *LMO1* au stade préleucémique présentent une induction des niveaux d'ARNm de *Cdkn2b/p15*, expliquant possiblement l'effet sur les cibles de RB1 et E2F1. Il serait intéressant de vérifier l'état de phosphorylation des protéines de la famille RB et l'effet d'une absence du gène *Cdkn2b* dans ce contexte.

Une autre possibilité vient d'une interaction directe entre les protéines SCL et RB1. Un modèle de lignée cellulaire érythroïde a permis de montrer une interaction entre SCL et RB1 dans un complexe transcriptionnel composé de RB1, E2A, LMO2 et LDB1 sur la séquence de type boîte E du promoteur du gène *Kit in vitro* (359). De plus, LMO2 interagit avec la protéine RBP2 (« RB binding protein 2 ») *in vitro* dans un autre modèle de lignée cellulaire érythroïde (229). Tout comme *Scl* et *Lmo2*, *Rb1* possède un rôle important au niveau de la différenciation érythroïde, puisque les souris *Rb1*^{-/-} meurent *in utero* d'une absence d'érythropoïèse. Il est donc possible que ces protéines agissent ensemble pendant la différenciation érythroïde, suggérant la possibilité que l'effet de SCL et LMO1 sur la voie de RB1 passe par une interaction directe entre ces facteurs. En plus, d'un effet sur les gènes cibles de RB1, SCL et LMO1 affectent aussi l'expression des gènes cibles de E2F1. RB1 interagit directement avec les protéines E2F, il est donc possible que l'interaction entre SCL et RB1 interfère avec l'activité transcriptionnelle de E2F1. Des expériences d'interactions protéiques dans les cellules thymocytaires seront nécessaires afin de déterminer si une interaction directe entre les protéines SCL, LMO1 et RB1 pourraient expliquer l'effet transcriptionnel sur les cibles de E2F1 et RB1.

Notre approche globale d'expression génique a aussi permis d'identifier une inhibition des gènes normalement réprimés par TRP53, ceci est consistant avec une activation de cette voie. De plus, la perte de fonction de *Trp53* entraîne une accélération de la leucémie induite par *SCL* et *LMO1*. Or, le niveau d'expression de *Trp53* n'est pas significativement augmenté en présence de SCL et LMO1. Par contre, nous observons une augmentation des

niveaux d'ARNm de *Trp73* (*p73*) et une diminution de ceux de *Trp63* (*p63*), les deux autres membres de la famille TRP53. Comme ces trois gènes reconnaissent en partie les mêmes séquences d'ADN, il est possible que l'effet sur les gènes cibles de TRP53 passe par un effet de TRP73 et TRP63 (283). La majorité des gènes cibles de TRP53 réprimés en présence de SCL et LMO1 étant des gènes associés avec la prolifération, la réduction de leur expression corrèle avec la réduction du pourcentage de thymocytes en cycle. Or, la délétion spécifique de *Trp63* dans les kératinocytes cause un arrêt de la prolifération, l'expression de la SA- β Gal et des changements morphologiques associés avec un phénotype de sénescence (425). La surexpression de TRP73, quant à lui, induit une réponse apoptotique et un arrêt du cycle cellulaire dépendant de CDKN1A/P21 (426). Ces données suggèrent que TRP63 et TRP73 sont impliqués de manière opposée dans la régulation du cycle cellulaire, et possiblement dans l'activation d'un programme de sénescence. L'absence de sites de liaison de type boîte E dans les promoteurs de *Trp63* et *Trp73* suggère une activation indépendante de l'activité transcriptionnelle des protéines E (479). Par contre, nous ne pouvons exclure la possibilité d'une régulation directe par les protéines SCL et LMO1.

6.3.3 PML et la sénescence

La protéine PML (« promyelocytic leukemia protein ») est une molécule clé pour la modulation des voies de suppression des tumeurs. PML est une composante essentielle des corps nucléaires (corps PML). L'accumulation de PML et de corps nucléaires se produit en réponse au stress, aux dommages à l'ADN ou encore à une signalisation oncogénique (116). PML régule l'apoptose, la suppression de la croissance et la sénescence et ce par le recrutement de partenaires dans les corps nucléaires. Le gène *Pml* code pour plus de 12 isoformes différents (480-482). La surexpression de l'isoforme PML IV induit une sénescence répllicative (118,413). Ceci est associé avec la répression des cibles des protéines E2F et RB, ainsi que l'induction de cibles de TRP53 (117,483). Cet isoforme

interagit spécifiquement avec les protéines TRP53 (429,430), la forme hypophosphorylée de RB1 (431) et les protéines HDAC (432). De plus, suite aux dommages à l'ADN, PML séquestre MDM2 et promouvoit l'activation de TRP53 (484). Le gène *Pml* est aussi une cible de TRP53 suggérant l'existence d'un feedback positif causant un arrêt réplcatif permanent (485). Nos données indiquent que la sénescence induite par *SCL* et *LMO1* au stade préleucémique est associée avec une activation de la voie de TRP53 et une induction des corps PML. Il est donc possible que cette augmentation de *Pml* vienne d'une augmentation de l'activité de TRP53 et/ou que son recrutement au corps PML cause son activation.

L'augmentation de l'activité de RB1 et la répression de l'expression des cibles de E2F1 observée lors de la sénescence induite par *SCL* et *LMO1* pourrait aussi être associée avec les corps PML. Ceux-ci ont été impliqués dans la réorganisation de la chromatine au cours de la sénescence (114,115) induisant des foci d'hétérochromatine associés avec la sénescence (SAHF). Cette hétérochromatinisation est associée avec une répression de l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (113). Plusieurs cibles de E2F1 acquièrent des propriétés hétérochromatiques pendant la sénescence et la protéine RB1 activée lie ces promoteurs. Comme RB1 colocalise aux corps PML dans les cellules sénescents (117,118), il sera intéressant de regarder la localisation subcellulaire de PML et RB1 dans les thymocytes préleucémiques exprimant *SCL* et *LMO1*.

La protéine PML est régulée par différents facteurs. La phosphorylation de PML par la caséine kinase II (CSKII) cause son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (433). La dégradation de PML par une activité excessive de CSKII dans les cellules cancéreuses empêche sa fonction homéostatique et augmente les dommages cellulaires (433). De façon intéressante, la surexpression de la *CSKII* collabore avec *SCL* dans l'induction de leucémies T-ALL chez la souris (147). Il est possible que cette activité soit liée à l'induction d'un phénotype de sénescence par PML. La surexpression de *CSKII*

pourrait contourner l'induction de sénescence par SCL en induisant la dégradation de PML. Il serait intéressant de vérifier la nécessité de PML dans l'induction de ce phénotype. Le croisement de souris *SCL^{tg}LMO1^{tg}* avec des souris *Pml^{-/-}* devrait accélérer le développement de leucémie.

6.3.4 La collaboration oncogénique et les groupes de complémentation.

Les voies contrôlant la transformation cellulaire nécessitent au minimum une augmentation de la capacité d'autorenouvellement, une augmentation de la croissance cellulaire autonome et ultimement un échappement de la différenciation terminale (368). En principe, deux gènes ayant un effet biologique similaire qui ne collaborent pas entre eux mais qui collaborent avec une troisième font partie d'un même groupe de complémentation. Des études d'insertions rétrovirales ont permis de révéler que certaines mutations sont mutuellement exclusives comme *C-myc* et *N-myc*, indiquant que ces mutations ne sont pas sélectionnées lorsque l'autre est activée. Berns et al ont proposé la présence de 5 groupes de complémentation pour la leucémie : *Myc*, *Bmi1*, *Pim1/2*, *Wnt* et *Fgf* (368).

SCL semble représenter un oncogène prototypique de facteurs de transcription de la sous-famille bHLH impliqués dans les leucémies T-ALL comme les gènes *BHLHB1*, *TAL2*, *LYL1* et *ID*. Ces gènes inhibent les gènes suppresseurs de tumeurs correspondant aux protéines E. De plus, ces oncogènes de la famille bHLH tout comme *Myc* pourraient constituer un groupe de complémentation majeur dans la leucémie. La voie Notch1-pré-TCR est cruciale à la destinée de la lignée des cellules T (486,487) et à la transformation des cellules T dépendante de *SCL-LMO1* (390). De plus, les leucémies se développant en absence de signalisation du pré-TCR sont aussi indépendante de *Notch1*. Par contre, des mutations de *Notch1* ont été retrouvées dans la majorité des fonds génétiques susceptible de développer des leucémies T-ALL. Ceci est consistant avec le fait que cette voie génétique correspond à un autre groupe de complémentation. *BMI1* a été retrouvé activé dans des leucémies humaines et murines possédant aussi une insertion rétrovirale dans le locus de

LMO2 (206). De plus, une des leucémies développées à partir des patients SCID et possédant une intégration dans les gènes *LMO2* et *BMII* ne présentent pas de délétion de *CDKN2A*, allant dans le sens que ces deux types de mutations sont mutuellement exclusives et agissent sur la même voie possiblement celle de la sénescence. Les oncogènes *LMO1/2* coopèrent avec les oncogènes *SCL* et *BHLHB1* chez la souris (88,142,152,357,459). De plus, les oncogènes *LMO1/2* ont été retrouvés activés chez l'homme dans des leucémies positives pour *SCL*, *LYL1*, *TAL2* et *BHLHB1*. Ces données sont consistantes avec le fait que *LMO1/2* ferait partie d'un groupe de complémentation différent de *SCL*, *BMII* ou la perte de fonction de *CDKN2A* et *NOTCH1/préTCR*.

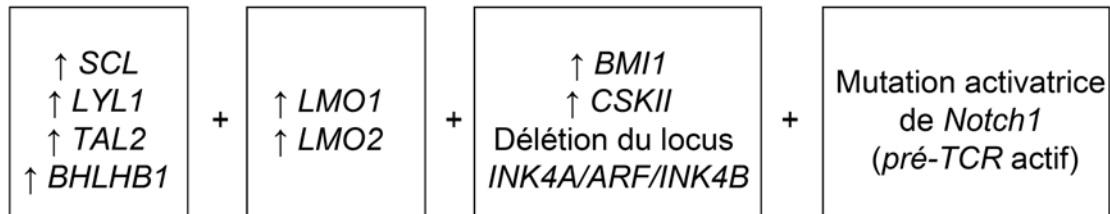


Figure 6.1 Groupes de complémentation dans les leucémies T-ALL.

Différents événements oncogéniques ont été retrouvés dans les leucémies de type T-ALL. Ceux-ci peuvent être classés selon leurs différentes propriétés sur la cellule et le fait qu'ils ne sont jamais retrouvés ensemble dans les tumeurs chez l'humain.

7 Conclusion

En résumé, les études présentées dans cette thèse ont permis d'identifier que les oncogènes SCL et LMO1 perturbent la différenciation des lymphocytes T en inhibant l'activité de facteurs de transcription importants pour la différenciation lymphoïde, révélant la fonction de suppresseur de tumeur des protéines E2A et HEB. De plus, nos résultats ont montré que ces oncogènes induisent un stress cellulaire associé avec l'induction d'une réponse cellulaire de sénescence et que celle-ci représente un mécanisme devant possiblement être contournée pour permettre le développement de leucémie et de manière plus générale la transformation. Finalement, nous avons mis en évidence la présence de collaboration entre ces oncogènes et des voies de signalisation physiologique expliquant la spécificité cellulaire de transformation. Mes résultats suggèrent que le cancer découle de plusieurs événements affectant des propriétés différentes de la cellule. Un défi important sera de comprendre l'interaction entre ces différentes voies afin de développer une thérapie ciblée contre les différentes propriétés affectées par ces oncogènes.

Bibliographie

1. Cheung, A.M., Kwong, Y.L., Liang, R. & Leung, A.Y. Stem cell model of hematopoiesis. *Curr Stem Cell Res Ther* 1, 305-15 (2006).
2. Krueger, A., Garbe, A.I. & von Boehmer, H. Phenotypic plasticity of T cell progenitors upon exposure to Notch ligands. *J Exp Med* 203, 1977-84 (2006).
3. Balciunaite, G., Ceredig, R. & Rolink, A.G. The earliest subpopulation of mouse thymocytes contains potent T, significant macrophage, and natural killer cell but no B-lymphocyte potential. *Blood* 105, 1930-6 (2005).
4. Porritt, H.E. et al. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity* 20, 735-45 (2004).
5. Aifantis, I., Raetz, E. & Buonamici, S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol* 8, 380-90 (2008).
6. Dudley, E.C., Petrie, H.T., Shah, L.M., Owen, M.J. & Hayday, A.C. T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* 1, 83-93 (1994).
7. Surh, C.D. & Sprent, J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372, 100-3 (1994).
8. Taghon, T. & Rothenberg, E.V. Molecular mechanisms that control mouse and human TCR-alpha-beta and TCR-gammadelta T cell development. *Semin Immunopathol* 30, 383-98 (2008).
9. Donskoy, E., Foss, D. & Goldschneider, I. Gated importation of prothymocytes by adult mouse thymus is coordinated with their periodic mobilization from bone marrow. *J Immunol* 171, 3568-75 (2003).
10. Foss, D.L., Donskoy, E. & Goldschneider, I. The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice. *J Exp Med* 193, 365-74 (2001).
11. Aifantis, I., Mandal, M., Sawai, K., Ferrando, A. & Vilimas, T. Regulation of T-cell progenitor survival and cell-cycle entry by the pre-T-cell receptor. *Immunol Rev* 209, 159-69 (2006).
12. Abbey, J.L. & O'Neill, H.C. Expression of T-cell receptor genes during early T-cell development. *Immunol Cell Biol* 86, 166-74 (2008).
13. Michie, A.M. & Zuniga-Pflucker, J.C. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. *Semin Immunol* 14, 311-23 (2002).
14. Huseby, E.S., Kappler, J.W. & Marrack, P. Thymic selection stifles TCR reactivity with the main chain structure of MHC and forces interactions with the peptide side chains. *Mol Immunol* 45, 599-606 (2008).
15. Baron, M. An overview of the Notch signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 14, 113-9 (2003).
16. Bray, S.J. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 678-89 (2006).
17. Maillard, I., Fang, T. & Pear, W.S. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol* 23, 945-74 (2005).

18. Ehebauer, M., Hayward, P. & Martinez-Arias, A. Notch signaling pathway. *Sci STKE* 2006, cm7 (2006).
19. Foltz, D.R. & Nye, J.S. Hyperphosphorylation and association with RBP of the intracellular domain of Notch1. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 484-92 (2001).
20. Radtke, F., Wilson, A. & MacDonald, H.R. Notch signaling in hematopoiesis and lymphopoiesis: lessons from *Drosophila*. *Bioessays* 27, 1117-28 (2005).
21. Mumm, J.S. & Kopan, R. Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* 228, 151-65 (2000).
22. Tanigaki, K. et al. Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* 20, 611-22 (2004).
23. Wolfer, A., Wilson, A., Nemir, M., MacDonald, H.R. & Radtke, F. Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. *Immunity* 16, 869-79 (2002).
24. Han, H. et al. Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol* 14, 637-45 (2002).
25. Radtke, F. et al. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10, 547-58 (1999).
26. Wilson, A., MacDonald, H.R. & Radtke, F. Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med* 194, 1003-12 (2001).
27. Pui, J.C. et al. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11, 299-308 (1999).
28. Harman, B.C., Jenkinson, E.J. & Anderson, G. Entry into the thymic microenvironment triggers Notch activation in the earliest migrant T cell progenitors. *J Immunol* 170, 1299-303 (2003).
29. Harman, B.C. et al. T/B lineage choice occurs prior to intrathymic Notch signaling. *Blood* 106, 886-92 (2005).
30. Jaleco, A.C. et al. Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J Exp Med* 194, 991-1002 (2001).
31. Schmitt, T.M. & Zuniga-Pflucker, J.C. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17, 749-56 (2002).
32. Hozumi, K. et al. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J Exp Med* 205, 2507-13 (2008).
33. Koch, U. et al. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J Exp Med* 205, 2515-23 (2008).
34. Feyerabend, T.B. et al. Deletion of Notch1 converts pro-T cells to dendritic cells and promotes thymic B cells by cell-extrinsic and cell-intrinsic mechanisms. *Immunity* 30, 67-79 (2009).
35. Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J. & MacDonald, H.R. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5, 247-53 (2004).

36. Schmitt, T.M., Ciofani, M., Petrie, H.T. & Zuniga-Pflucker, J.C. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med* 200, 469-79 (2004).
37. Engel, I. & Murre, C. Disruption of pre-TCR expression accelerates lymphomagenesis in E2A-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11322-7 (2002).
38. Nie, L., Xu, M., Vladimirova, A. & Sun, X.H. Notch-induced E2A ubiquitination and degradation are controlled by MAP kinase activities. *EMBO J* 22, 5780-92 (2003).
39. Talora, C. et al. Pre-TCR-triggered ERK signalling-dependent downregulation of E2A activity in Notch3-induced T-cell lymphoma. *EMBO Rep* 4, 1067-72 (2003).
40. Rothenberg, E.V., Moore, J.E. & Yui, M.A. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* 8, 9-21 (2008).
41. Massari, M.E. & Murre, C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20, 429-40 (2000).
42. Henthorn, P.S., Stewart, C.C., Kadesch, T. & Puck, J.M. The gene encoding human TFE3, a transcription factor that binds the immunoglobulin heavy-chain enhancer, maps to Xp11.22. *Genomics* 11, 374-8 (1991).
43. Zhao, G.Q., Zhao, Q., Zhou, X., Mattei, M.G. & de Crombrughe, B. TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Mol Cell Biol* 13, 4505-12 (1993).
44. Blackwood, E.M. & Eisenman, R.N. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-7 (1991).
45. Ayer, D.E., Kretzner, L. & Eisenman, R.N. Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211-22 (1993).
46. Zervos, A.S., Gyuris, J. & Brent, R. Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 79, following 388 (1994).
47. Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L. & Weintraub, H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61, 49-59 (1990).
48. Jen, Y., Weintraub, H. & Benezra, R. Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with E2A proteins. *Genes Dev* 6, 1466-79 (1992).
49. Kreider, B.L., Benezra, R., Rovera, G. & Kadesch, T. Inhibition of myeloid differentiation by the helix-loop-helix protein Id. *Science* 255, 1700-2 (1992).
50. Kee, B.L. E and ID proteins branch out. *Nat Rev Immunol* 9, 175-84 (2009).
51. Murre, C., McCaw, P.S. & Baltimore, D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-83 (1989).

52. Sun, J., Inouye, M. & Inouye, S. Association of a retroelement with a P4-like cryptic prophage (retronphage phi R73) integrated into the selenocystyl tRNA gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 173, 4171-81 (1991).
53. Aronheim, A., Shiran, R., Rosen, A. & Walker, M.D. The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8063-7 (1993).
54. Quong, M.W., Massari, M.E., Zwart, R. & Murre, C. A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells. *Mol Cell Biol* 13, 792-800 (1993).
55. Massari, M.E. et al. A conserved motif present in a class of helix-loop-helix proteins activates transcription by direct recruitment of the SAGA complex. *Mol Cell* 4, 63-73 (1999).
56. Nagy, Z. & Tora, L. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* 26, 5341-57 (2007).
57. Bradney, C. et al. Regulation of E2A activities by histone acetyltransferases in B lymphocyte development. *J Biol Chem* 278, 2370-6 (2003).
58. Markus, M., Du, Z. & Benezra, R. Enhancer-specific modulation of E protein activity. *J Biol Chem* 277, 6469-77 (2002).
59. Goardon, N. et al. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J* 25, 357-66 (2006).
60. Zhang, J., Kalkum, M., Yamamura, S., Chait, B.T. & Roeder, R.G. E protein silencing by the leukemogenic AML1-ETO fusion protein. *Science* 305, 1286-9 (2004).
61. Schuh, A.H. et al. ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Mol Cell Biol* 25, 10235-50 (2005).
62. Hata, K. & Mizuguchi, J. Genomic organization and characterization of the promoter for the E2A gene. *Gene* 325, 53-61 (2004).
63. Huggins, G.S. et al. Characterization of the mUBC9-binding sites required for E2A protein degradation. *J Biol Chem* 274, 28690-6 (1999).
64. Huang, Z., Nie, L., Xu, M. & Sun, X.H. Notch-induced E2A degradation requires CHIP and Hsc70 as novel facilitators of ubiquitination. *Mol Cell Biol* 24, 8951-62 (2004).
65. Engel, I., Johns, C., Bain, G., Rivera, R.R. & Murre, C. Early thymocyte development is regulated by modulation of E2A protein activity. *J Exp Med* 194, 733-45 (2001).
66. Bain, G. et al. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79, 885-92 (1994).
67. Barndt, R., Dai, M.F. & Zhuang, Y. A novel role for HEB downstream or parallel to the pre-TCR signaling pathway during alpha beta thymopoiesis. *J Immunol* 163, 3331-43 (1999).

68. Zhuang, Y., Cheng, P. & Weintraub, H. B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol Cell Biol* 16, 2898-905 (1996).
69. Dias, S., Mansson, R., Gurbuxani, S., Sigvardsson, M. & Kee, B.L. E2A proteins promote development of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Immunity* 29, 217-27 (2008).
70. Bain, G. et al. E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol* 17, 4782-91 (1997).
71. Zhuang, Y., Soriano, P. & Weintraub, H. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 79, 875-84 (1994).
72. Ikawa, T., Kawamoto, H., Wright, L.Y. & Murre, C. Long-term cultured E2A-deficient hematopoietic progenitor cells are pluripotent. *Immunity* 20, 349-60 (2004).
73. Schlissel, M., Voronova, A. & Baltimore, D. Helix-loop-helix transcription factor E47 activates germ-line immunoglobulin heavy-chain gene transcription and rearrangement in a pre-T-cell line. *Genes Dev* 5, 1367-76 (1991).
74. Romanow, W.J. et al. E2A and EBF act in synergy with the V(D)J recombinase to generate a diverse immunoglobulin repertoire in nonlymphoid cells. *Mol Cell* 5, 343-53 (2000).
75. Zhuang, Y., Barndt, R.J., Pan, L., Kelley, R. & Dai, M. Functional replacement of the mouse E2A gene with a human HEB cDNA. *Mol Cell Biol* 18, 3340-9 (1998).
76. Sawada, S. & Littman, D.R. A heterodimer of HEB and an E12-related protein interacts with the CD4 enhancer and regulates its activity in T-cell lines. *Mol Cell Biol* 13, 5620-8 (1993).
77. Barndt, R.J., Dai, M. & Zhuang, Y. Functions of E2A-HEB heterodimers in T-cell development revealed by a dominant negative mutation of HEB. *Mol Cell Biol* 20, 6677-85 (2000).
78. Bain, G., Romanow, W.J., Albers, K., Havran, W.L. & Murre, C. Positive and negative regulation of V(D)J recombination by the E2A proteins. *J Exp Med* 189, 289-300 (1999).
79. Bain, G. et al. Regulation of the helix-loop-helix proteins, E2A and Id3, by the Ras-ERK MAPK cascade. *Nat Immunol* 2, 165-71 (2001).
80. Langerak, A.W., Wolvers-Tettero, I.L., van Gestel-Mol, E.J., Oud, M.E. & van Dongen, J.J. Basic helix-loop-helix proteins E2A and HEB induce immature T-cell receptor rearrangements in nonlymphoid cells. *Blood* 98, 2456-65 (2001).
81. Ghosh, J.K., Romanow, W.J. & Murre, C. Induction of a diverse T cell receptor gamma/delta repertoire by the helix-loop-helix proteins E2A and HEB in nonlymphoid cells. *J Exp Med* 193, 769-76 (2001).
82. Agata, Y. et al. Regulation of T cell receptor beta gene rearrangements and allelic exclusion by the helix-loop-helix protein, E47. *Immunity* 27, 871-84 (2007).

83. Engel, I. & Murre, C. E2A proteins enforce a proliferation checkpoint in developing thymocytes. *EMBO J* 23, 202-11 (2004).
84. Wojciechowski, J., Lai, A., Kondo, M. & Zhuang, Y. E2A and HEB are required to block thymocyte proliferation prior to pre-TCR expression. *J Immunol* 178, 5717-26 (2007).
85. Jones, M.E. & Zhuang, Y. Acquisition of a functional T cell receptor during T lymphocyte development is enforced by HEB and E2A transcription factors. *Immunity* 27, 860-70 (2007).
86. Bain, G., Quong, M.W., Soloff, R.S., Hedrick, S.M. & Murre, C. Thymocyte maturation is regulated by the activity of the helix-loop-helix protein, E47. *J Exp Med* 190, 1605-16 (1999).
87. Zhang, Y., Doyle, K. & Bina, M. Interactions of HTF4 with E-box motifs in the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 66, 5631-4 (1992).
88. Herblot, S., Steff, A.M., Hugo, P., Aplan, P.D. & Hoang, T. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol* 1, 138-44 (2000).
89. Zhang, Y. et al. Localization of the human HTF4 transcription factors 4 gene (TCF12) to chromosome 15q21. *Cytogenet Cell Genet* 68, 235-8 (1995).
90. Kumar, R. et al. CBFA2T3-ZNF652 corepressor complex regulates transcription of the E-box gene HEB. *J Biol Chem* 283, 19026-38 (2008).
91. Wang, D. et al. The basic helix-loop-helix transcription factor HEBAlt is expressed in pro-T cells and enhances the generation of T cell precursors. *J Immunol* 177, 109-19 (2006).
92. Corneliusen, B., Thornell, A., Hallberg, B. & Grundstrom, T. Helix-loop-helix transcriptional activators bind to a sequence in glucocorticoid response elements of retrovirus enhancers. *J Virol* 65, 6084-93 (1991).
93. Bergqvist, I. et al. The basic helix-loop-helix transcription factor E2-2 is involved in T lymphocyte development. *Eur J Immunol* 30, 2857-63 (2000).
94. Wikstrom, I., Forssell, J., Penha-Goncalves, M.N., Bergqvist, I. & Holmberg, D. A role for E2-2 at the DN3 stage of early thymopoiesis. *Mol Immunol* 45, 3302-11 (2008).
95. Foulds, L. The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 14, 327-39 (1954).
96. Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-8 (1976).
97. Darzynkiewicz, Z. et al. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27, 1-20 (1997).
98. Khosravi-Far, R. & Esposti, M.D. Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther* 3, 1051-7 (2004).
99. Hayflick, L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62, 1180-90 (1997).

100. Hayflick, L. & Moorhead, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621 (1961).
101. Chen, Z. et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725-30 (2005).
102. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. & Lowe, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602 (1997).
103. Zhu, J., Woods, D., McMahon, M. & Bishop, J.M. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* 12, 2997-3007 (1998).
104. Chen, Q., Olashaw, N. & Wu, J. Participation of reactive oxygen species in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase kinase activation pathway. *J Biol Chem* 270, 28499-502 (1995).
105. Di Micco, R. et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-42 (2006).
106. Mallette, F.A., Gaumont-Leclerc, M.F. & Ferbeyre, G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* 21, 43-8 (2007).
107. Bartkova, J. et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633-7 (2006).
108. Collado, M. & Serrano, M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 6, 472-6 (2006).
109. Dimri, G.P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-7 (1995).
110. Lee, B.Y. et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5, 187-95 (2006).
111. Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 729-40 (2007).
112. Zhang, R. et al. HP1 proteins are essential for a dynamic nuclear response that rescues the function of perturbed heterochromatin in primary human cells. *Mol Cell Biol* 27, 949-62 (2007).
113. Narita, M. et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-16 (2003).
114. Ye, X. et al. Definition of pRB- and p53-dependent and -independent steps in HIRA/ASF1a-mediated formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* 27, 2452-65 (2007).
115. Zhang, R. et al. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8, 19-30 (2005).
116. Pearson, M. & Pelicci, P.G. PML interaction with p53 and its role in apoptosis and replicative senescence. *Oncogene* 20, 7250-6 (2001).
117. Ferbeyre, G. et al. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 14, 2015-27 (2000).

118. Mallette, F.A., Goumard, S., Gaumont-Leclerc, M.F., Moiseeva, O. & Ferbeyre, G. Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene* 23, 91-9 (2004).
119. Khan, M.M. et al. PML-RARalpha alleviates the transcriptional repression mediated by tumor suppressor Rb. *J Biol Chem* 276, 43491-4 (2001).
120. Lin, R.J. et al. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 391, 811-4 (1998).
121. Uckun, F.M. et al. Clinical features and treatment outcome of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia according to the apparent maturational stage of T-lineage leukemic blasts: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 15, 2214-21 (1997).
122. Cleary, M.L. Oncogenic conversion of transcription factors by chromosomal translocations. *Cell* 66, 619-22 (1991).
123. Look, A.T. E2A-HLF chimeric transcription factors in pro-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol* 220, 45-53 (1997).
124. Larson, R.C. et al. T cell tumours of disparate phenotype in mice transgenic for Rbtn-2. *Oncogene* 9, 3675-81 (1994).
125. Wiemels, J.L. et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 354, 1499-503 (1999).
126. Crist, W.M. et al. Clinical features and outcome in childhood T-cell leukemia-lymphoma according to stage of thymocyte differentiation: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 72, 1891-7 (1988).
127. Ferrando, A.A. et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 1, 75-87 (2002).
128. Ferrando, A.A. & Look, A.T. Clinical implications of recurring chromosomal and associated molecular abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* 37, 381-95 (2000).
129. Lewis, S.M., Agard, E., Suh, S. & Czyzyk, L. Cryptic signals and the fidelity of V(D)J joining. *Mol Cell Biol* 17, 3125-36 (1997).
130. Raghavan, S.C., Kirsch, I.R. & Lieber, M.R. Analysis of the V(D)J recombination efficiency at lymphoid chromosomal translocation breakpoints. *J Biol Chem* 276, 29126-33 (2001).
131. Aguilera, A. The connection between transcription and genomic instability. *EMBO J* 21, 195-201 (2002).
132. Cauwelier, B. et al. Molecular cytogenetic study of 126 unselected T-ALL cases reveals high incidence of TCRbeta locus rearrangements and putative new T-cell oncogenes. *Leukemia* 20, 1238-44 (2006).
133. De Keersmaecker, K., Marynen, P. & Cools, J. Genetic insights in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 90, 1116-27 (2005).
134. Aplan, P.D. et al. Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity. *Science* 250, 1426-9 (1990).

135. Begley, C.G. et al. Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2031-5 (1989).
136. Brown, L. et al. Site-specific recombination of the tal-1 gene is a common occurrence in human T cell leukemia. *EMBO J* 9, 3343-51 (1990).
137. Fitzgerald, T.J., Neale, G.A., Raimondi, S.C. & Goorha, R.M. c-tal, a helix-loop-helix protein, is juxtaposed to the T-cell receptor-beta chain gene by a reciprocal chromosomal translocation: t(1;7)(p32;q35). *Blood* 78, 2686-95 (1991).
138. Izraeli, S. et al. Expression of the SIL gene is correlated with growth induction and cellular proliferation. *Cell Growth Differ* 8, 1171-9 (1997).
139. Ferrando, A.A. et al. Biallelic transcriptional activation of oncogenic transcription factors in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 103, 1909-11 (2004).
140. Bash, R.O. et al. Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study. *Blood* 86, 666-76 (1995).
141. Curtis, D.J., Robb, L., Strasser, A. & Begley, C.G. The CD2-scl transgene alters the phenotype and frequency of T-lymphomas in N-ras transgenic or p53 deficient mice. *Oncogene* 15, 2975-83 (1997).
142. Aplan, P.D. et al. An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J* 16, 2408-19 (1997).
143. Goardon, N. et al. Ectopic expression of TAL-1 protein in Ly-6E.1-htal-1 transgenic mice induces defects in B- and T-lymphoid differentiation. *Blood* 100, 491-500 (2002).
144. Robb, L. et al. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7075-9 (1995).
145. Elwood, N.J. & Begley, C.G. Reconstitution of mice with bone marrow cells expressing the SCL gene is insufficient to cause leukemia. *Cell Growth Differ* 6, 19-25 (1995).
146. Condorelli, G.L. et al. T-cell-directed TAL-1 expression induces T-cell malignancies in transgenic mice. *Cancer Res* 56, 5113-9 (1996).
147. Kelliher, M.A., Seldin, D.C. & Leder, P. Tal-1 induces T cell acute lymphoblastic leukemia accelerated by casein kinase IIalpha. *EMBO J* 15, 5160-6 (1996).
148. O'Neil, J., Billa, M., Oikemus, S. & Kelliher, M. The DNA binding activity of TAL-1 is not required to induce leukemia/lymphoma in mice. *Oncogene* 20, 3897-905 (2001).
149. Fasseu, M. et al. p16INK4A tumor suppressor gene expression and CD3epsilon deficiency but not pre-TCR deficiency inhibit TAL1-linked T-lineage leukemogenesis. *Blood* 110, 2610-9 (2007).

150. Shank-Calvo, J.A., Draheim, K., Bhasin, M. & Kelliher, M.A. p16Ink4a or p19Arf loss contributes to Tal1-induced leukemogenesis in mice. *Oncogene* 25, 3023-31 (2006).
151. Ono, Y., Fukuhara, N. & Yoshie, O. Transcriptional activity of TAL1 in T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) requires RBTN1 or -2 and induces TALLA1, a highly specific tumor marker of T-ALL. *J Biol Chem* 272, 4576-81 (1997).
152. Chervinsky, D.S. et al. Disordered T-cell development and T-cell malignancies in SCL LMO1 double-transgenic mice: parallels with E2A-deficient mice. *Mol Cell Biol* 19, 5025-35 (1999).
153. Hsu, H.L. et al. Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* 14, 1256-65 (1994).
154. Cheng, J.T., Hsu, H.L., Hwang, L.Y. & Baer, R. Products of the TAL1 oncogene: basic helix-loop-helix proteins phosphorylated at serine residues. *Oncogene* 8, 677-83 (1993).
155. Pulford, K. et al. Expression of TAL-1 proteins in human tissues. *Blood* 85, 675-84 (1995).
156. Calkhoven, C.F. et al. Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice. *Genes Dev* 17, 959-64 (2003).
157. Bernard, M., Smit, L., Macintyre, E., Matthieu-Mahul, D. & Pulford, K. Nuclear localization of the SCL/TAL1 basic helix-loop-helix protein is not dependent on the presence of the basic domain. *Blood* 85, 3356-7 (1995).
158. Hsu, S.F. & Cheng, J.T. The differential transforming activities of Tal1 oncoproteins. *Biochem Mol Biol Int* 43, 1157-61 (1997).
159. Hsu, H.L., Wadman, I., Tsan, J.T. & Baer, R. Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop-helix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5947-51 (1994).
160. Wadman, I.A., Hsu, H.L., Cobb, M.H. & Baer, R. The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain. *Oncogene* 9, 3713-6 (1994).
161. Sanchez-Garcia, I. & Rabbitts, T.H. Transcriptional activation by TAL1 and FUS-CHOP proteins expressed in acute malignancies as a result of chromosomal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7869-73 (1994).
162. Porcher, C., Liao, E.C., Fujiwara, Y., Zon, L.I. & Orkin, S.H. Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. *Development* 126, 4603-15 (1999).
163. Lecuyer, E. et al. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* 100, 2430-40 (2002).
164. Wadman, I.A. et al. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J* 16, 3145-57 (1997).

165. Valge-Archer, V.E. et al. The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8617-21 (1994).
166. Grutz, G., Forster, A. & Rabbitts, T.H. Identification of the LMO4 gene encoding an interaction partner of the LIM-binding protein LDB1/NLI1: a candidate for displacement by LMO proteins in T cell acute leukaemia. *Oncogene* 17, 2799-803 (1998).
167. Lahlil, R., Lecuyer, E., Herblot, S. & Hoang, T. SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A expression. *Mol Cell Biol* 24, 1439-52 (2004).
168. Tripic, T. et al. SCL and associated proteins distinguish active from repressive GATA transcription factor complexes. *Blood* 113, 2191-201 (2009).
169. Ryan, D.P., Duncan, J.L., Lee, C., Kuchel, P.W. & Matthews, J.M. Assembly of the oncogenic DNA-binding complex LMO2-Ldb1-TAL1-E12. *Proteins* 70, 1461-74 (2008).
170. Osada, H., Grutz, G.G., Axelson, H., Forster, A. & Rabbitts, T.H. LIM-only protein Lmo2 forms a protein complex with erythroid transcription factor GATA-1. *Leukemia* 11 Suppl 3, 307-12 (1997).
171. Huang, S., Qiu, Y., Stein, R.W. & Brandt, S.J. p300 functions as a transcriptional coactivator for the TAL1/SCL oncoprotein. *Oncogene* 18, 4958-67 (1999).
172. Huang, S. & Brandt, S.J. mSin3A regulates murine erythroleukemia cell differentiation through association with the TAL1 (or SCL) transcription factor. *Mol Cell Biol* 20, 2248-59 (2000).
173. Huang, S., Qiu, Y., Shi, Y., Xu, Z. & Brandt, S.J. P/CAF-mediated acetylation regulates the function of the basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL. *EMBO J* 19, 6792-803 (2000).
174. Kallianpur, A.R., Jordan, J.E. & Brandt, S.J. The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood* 83, 1200-8 (1994).
175. Elefanty, A.G., Begley, C.G., Hartley, L., Papaevangeliou, B. & Robb, L. SCL expression in the mouse embryo detected with a targeted lacZ reporter gene demonstrates its localization to hematopoietic, vascular, and neural tissues. *Blood* 94, 3754-63 (1999).
176. Green, A.R., Lints, T., Visvader, J., Harvey, R. & Begley, C.G. SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain. *Oncogene* 7, 653-60 (1992).
177. Drake, C.J., Brandt, S.J., Trusk, T.C. & Little, C.D. TAL1/SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Dev Biol* 192, 17-30 (1997).
178. Drake, C.J. & Fleming, P.A. Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood* 95, 1671-9 (2000).

179. Brady, G. et al. Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr Biol* 5, 909-22 (1995).
180. Hoang, T. et al. Opposing effects of the basic helix-loop-helix transcription factor SCL on erythroid and monocytic differentiation. *Blood* 87, 102-11 (1996).
181. Mouthon, M.A. et al. Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* 81, 647-55 (1993).
182. Aplan, P.D. et al. Involvement of the putative hematopoietic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79, 1327-33 (1992).
183. Visvader, J., Begley, C.G. & Adams, J.M. Differential expression of the LYL, SCL and E2A helix-loop-helix genes within the hemopoietic system. *Oncogene* 6, 187-94 (1991).
184. Elwood, N.J., Zogos, H., Pereira, D.S., Dick, J.E. & Begley, C.G. Enhanced megakaryocyte and erythroid development from normal human CD34(+) cells: consequence of enforced expression of SCL. *Blood* 91, 3756-65 (1998).
185. Rabbitts, T.H. et al. Chromosomal translocations and leukaemia: a role for LMO2 in T cell acute leukaemia, in transcription and in erythropoiesis. *Leukemia* 11 Suppl 3, 271-2 (1997).
186. Xu, Z., Huang, S., Chang, L.S., Agulnick, A.D. & Brandt, S.J. Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol Cell Biol* 23, 7585-99 (2003).
187. Porcher, C. et al. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* 86, 47-57 (1996).
188. Hall, M.A. et al. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 992-7 (2003).
189. Mikkola, H.K. et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature* 421, 547-51 (2003).
190. Visvader, J.E., Fujiwara, Y. & Orkin, S.H. Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev* 12, 473-9 (1998).
191. Liao, E.C. et al. SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes Dev* 12, 621-6 (1998).
192. Ema, M. et al. Combinatorial effects of Flk1 and Tal1 on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev* 17, 380-93 (2003).
193. Xia, Y. et al. TAL2, a helix-loop-helix gene activated by the (7;9)(q34;q32) translocation in human T-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11416-20 (1991).
194. Wang, J. et al. The t(14;21)(q11.2;q22) chromosomal translocation associated with T-cell acute lymphoblastic leukemia activates the BHLHB1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3497-502 (2000).

195. Mellentin, J.D., Smith, S.D. & Cleary, M.L. *lyl-1*, a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif. *Cell* 58, 77-83 (1989).
196. Giroux, S. et al. *lyl-1* and *tal-1/scl*, two genes encoding closely related bHLH transcription factors, display highly overlapping expression patterns during cardiovascular and hematopoietic ontogeny. *Gene Expr Patterns* 7, 215-26 (2007).
197. Zhong, Y., Jiang, L., Hiai, H., Toyokuni, S. & Yamada, Y. Overexpression of a transcription factor *LYL1* induces T- and B-cell lymphoma in mice. *Oncogene* 26, 6937-47 (2007).
198. Schmeichel, K.L. & Beckerle, M.C. The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* 79, 211-9 (1994).
199. Boehm, T. et al. The mechanism of chromosomal translocation t(11;14) involving the T-cell receptor C delta locus on human chromosome 14q11 and a transcribed region of chromosome 11p15. *EMBO J* 7, 385-94 (1988).
200. McGuire, E.A. et al. The t(11;14)(p15;q11) in a T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line activates multiple transcripts, including *Ttg-1*, a gene encoding a potential zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 9, 2124-32 (1989).
201. Boehm, T., Foroni, L., Kaneko, Y., Perutz, M.F. & Rabbitts, T.H. The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4367-71 (1991).
202. Royer-Pokora, B., Loos, U. & Ludwig, W.D. *TTG-2*, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11;14)(p13;q11). *Oncogene* 6, 1887-93 (1991).
203. Van Vlierberghe, P. et al. The cryptic chromosomal deletion del(11)(p12p13) as a new activation mechanism of *LMO2* in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 108, 3520-9 (2006).
204. Hacein-Bey-Abina, S. et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348, 255-6 (2003).
205. Hacein-Bey-Abina, S. et al. *LMO2*-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-9 (2003).
206. Hacein-Bey-Abina, S. et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118, 3132-42 (2008).
207. Kee, B.L., Bain, G. & Murre, C. IL-7Ralpha and E47: independent pathways required for development of multipotent lymphoid progenitors. *EMBO J* 21, 103-13 (2002).
208. Dave, U.P., Jenkins, N.A. & Copeland, N.G. Gene therapy insertional mutagenesis insights. *Science* 303, 333 (2004).
209. McGuire, E.A., Rintoul, C.E., Selar, G.M. & Korsmeyer, S.J. Thymic overexpression of *Ttg-1* in transgenic mice results in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Mol Cell Biol* 12, 4186-96 (1992).

210. McCormack, M.P., Forster, A., Drynan, L., Pannell, R. & Rabbitts, T.H. The LMO2 T-cell oncogene is activated via chromosomal translocations or retroviral insertion during gene therapy but has no mandatory role in normal T-cell development. *Mol Cell Biol* 23, 9003-13 (2003).
211. Larson, R.C., Osada, H., Larson, T.A., Lavenir, I. & Rabbitts, T.H. The oncogenic LIM protein Rbtn2 causes thymic developmental aberrations that precede malignancy in transgenic mice. *Oncogene* 11, 853-62 (1995).
212. Neale, G.A., Rehg, J.E. & Goorha, R.M. Ectopic expression of rhombotin-2 causes selective expansion of CD4-CD8- lymphocytes in the thymus and T-cell tumors in transgenic mice. *Blood* 86, 3060-71 (1995).
213. Warren, A.J. et al. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* 78, 45-57 (1994).
214. Gering, M., Yamada, Y., Rabbitts, T.H. & Patient, R.K. Lmo2 and Scl/Tal1 convert non-axial mesoderm into haemangioblasts which differentiate into endothelial cells in the absence of Gata1. *Development* 130, 6187-99 (2003).
215. Mead, P.E., Deconinck, A.E., Huber, T.L., Orkin, S.H. & Zon, L.I. Primitive erythropoiesis in the Xenopus embryo: the synergistic role of LMO-2, SCL and GATA-binding proteins. *Development* 128, 2301-8 (2001).
216. Yamada, Y. et al. The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3890-5 (1998).
217. Osada, H., Grutz, G., Axelson, H., Forster, A. & Rabbitts, T.H. Association of erythroid transcription factors: complexes involving the LIM protein RBTN2 and the zinc-finger protein GATA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9585-9 (1995).
218. Yamada, Y., Pannell, R., Forster, A. & Rabbitts, T.H. The oncogenic LIM-only transcription factor Lmo2 regulates angiogenesis but not vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 320-4 (2000).
219. Visvader, J.E., Mao, X., Fujiwara, Y., Hahm, K. & Orkin, S.H. The LIM-domain binding protein Ldb1 and its partner LMO2 act as negative regulators of erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13707-12 (1997).
220. Feroni, L. et al. The rhombotin gene family encode related LIM-domain proteins whose differing expression suggests multiple roles in mouse development. *J Mol Biol* 226, 747-61 (1992).
221. Dong, W.F., Billia, F., Atkins, H.L., Iscove, N.N. & Minden, M.D. Expression of rhombotin 2 in normal and leukaemic haemopoietic cells. *Br J Haematol* 93, 280-6 (1996).
222. Silver, L. & Palis, J. Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis. *Blood* 89, 1154-64 (1997).
223. Delassus, S., Titley, I. & Enver, T. Functional and molecular analysis of hematopoietic progenitors derived from the aorta-gonad-mesonephros region of the mouse embryo. *Blood* 94, 1495-503 (1999).
224. Manaia, A. et al. Lmo2 and GATA-3 associated expression in intraembryonic hemogenic sites. *Development* 127, 643-53 (2000).

225. Greenberg, J.M. et al. Segmental and developmental regulation of a presumptive T-cell oncogene in the central nervous system. *Nature* 344, 158-60 (1990).
226. Landry, J.R. et al. Expression of the leukaemia oncogene Lmo2 is controlled by an array of tissue specific elements dispersed over 100kb and bound by Tal1/Lmo2, Ets and Gata factors. *Blood* (2009).
227. Crable, S.C. & Anderson, K.P. A PAR domain transcription factor is involved in the expression from a hematopoietic-specific promoter for the human LMO2 gene. *Blood* 101, 4757-64 (2003).
228. Begay-Muller, V., Ansieau, S. & Leutz, A. The LIM domain protein Lmo2 binds to AF6, a translocation partner of the MLL oncogene. *FEBS Lett* 521, 36-8 (2002).
229. Mao, S., Neale, G.A. & Goorha, R.M. T-cell oncogene rhombotin-2 interacts with retinoblastoma-binding protein 2. *Oncogene* 14, 1531-9 (1997).
230. Riechmann, V., van Cruchten, I. & Sablitzky, F. The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3. *Nucleic Acids Res* 22, 749-55 (1994).
231. Atherton, G.T., Travers, H., Deed, R. & Norton, J.D. Regulation of cell differentiation in C2C12 myoblasts by the Id3 helix-loop-helix protein. *Cell Growth Differ* 7, 1059-66 (1996).
232. Desprez, P.Y., Hara, E., Bissell, M.J. & Campisi, J. Suppression of mammary epithelial cell differentiation by the helix-loop-helix protein Id-1. *Mol Cell Biol* 15, 3398-404 (1995).
233. Melnikova, I.N. & Christy, B.A. Muscle cell differentiation is inhibited by the helix-loop-helix protein Id3. *Cell Growth Differ* 7, 1067-79 (1996).
234. Shoji, W., Yamamoto, T. & Obinata, M. The helix-loop-helix protein Id inhibits differentiation of murine erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 269, 5078-84 (1994).
235. Kim, D., Peng, X.C. & Sun, X.H. Massive apoptosis of thymocytes in T-cell-deficient Id1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* 19, 8240-53 (1999).
236. Morrow, M.A., Mayer, E.W., Perez, C.A., Adlam, M. & Siu, G. Overexpression of the Helix-Loop-Helix protein Id2 blocks T cell development at multiple stages. *Mol Immunol* 36, 491-503 (1999).
237. O'Neil, J., Shank, J., Cusson, N., Murre, C. & Kelliher, M. TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB. *Cancer Cell* 5, 587-96 (2004).
238. Sun, X.H. Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development. *Cell* 79, 893-900 (1994).
239. Ellisen, L.W. et al. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66, 649-61 (1991).
240. Grabher, C., von Boehmer, H. & Look, A.T. Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 6, 347-59 (2006).

241. Weng, A.P. & Aster, J.C. Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. *Curr Opin Genet Dev* 14, 48-54 (2004).
242. Malecki, M.J. et al. Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes. *Mol Cell Biol* 26, 4642-51 (2006).
243. Thompson, B.J. et al. Control of hematopoietic stem cell quiescence by the E3 ubiquitin ligase Fbw7. *J Exp Med* 205, 1395-408 (2008).
244. Allman, D. et al. Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. *J Exp Med* 194, 99-106 (2001).
245. Vilimas, T. et al. Targeting the NF-kappaB signaling pathway in Notch1-induced T-cell leukemia. *Nat Med* 13, 70-7 (2007).
246. Bellavia, D. et al. Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *EMBO J* 19, 3337-48 (2000).
247. Weng, A.P. et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306, 269-71 (2004).
248. O'Neil, J. et al. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med* 204, 1813-24 (2007).
249. Matsuoka, S. et al. Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev* 22, 986-91 (2008).
250. Thompson, B.J. et al. The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J Exp Med* 204, 1825-35 (2007).
251. Onoyama, I. et al. Conditional inactivation of Fbxw7 impairs cell-cycle exit during T cell differentiation and results in lymphomatogenesis. *J Exp Med* 204, 2875-88 (2007).
252. Zipfel, P.A., Zhang, W., Quiroz, M. & Pendergast, A.M. Requirement for Abl kinases in T cell receptor signaling. *Curr Biol* 14, 1222-31 (2004).
253. Wange, R.L. TCR signaling: another Abl-bodied kinase joins the cascade. *Curr Biol* 14, R562-4 (2004).
254. Quentmeier, H. et al. e6-a2 BCR-ABL1 fusion in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 19, 295-6 (2005).
255. Graux, C. et al. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 36, 1084-9 (2004).
256. Tycko, B., Smith, S.D. & Sklar, J. Chromosomal translocations joining LCK and TCRB loci in human T cell leukemia. *J Exp Med* 174, 867-73 (1991).
257. Burnett, R.C., Thirman, M.J., Rowley, J.D. & Diaz, M.O. Molecular analysis of the T-cell acute lymphoblastic leukemia-associated t(1;7)(p34;q34) that fuses LCK and TCRB. *Blood* 84, 1232-6 (1994).
258. Yokota, S. et al. Mutational analysis of the N-ras gene in acute lymphoblastic leukemia: a study of 125 Japanese pediatric cases. *Int J Hematol* 67, 379-87 (1998).
259. Knudson, A.G., Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-3 (1971).

260. Schwartz, G.K. & Shah, M.A. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* 23, 9408-21 (2005).
261. DeGregori, J., Kowalik, T. & Nevins, J.R. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* 15, 4215-24 (1995).
262. Schulze, A. et al. Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11264-8 (1995).
263. Ma, T. et al. Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. *Genes Dev* 14, 2298-313 (2000).
264. Chen, J., Jackson, P.K., Kirschner, M.W. & Dutta, A. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 374, 386-8 (1995).
265. Luo, Y., Hurwitz, J. & Massague, J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 375, 159-61 (1995).
266. Lee, M.H., Reynisdottir, I. & Massague, J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9, 639-49 (1995).
267. Xiong, Y. et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-4 (1993).
268. el-Deiry, W.S. et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54, 1169-74 (1994).
269. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-16 (1993).
270. Polyak, K. et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8, 9-22 (1994).
271. Guan, K.L. et al. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 8, 2939-52 (1994).
272. Hannon, G.J. & Beach, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-61 (1994).
273. Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.Y., Ashmun, R.A. & Sherr, C.J. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 15, 2672-81 (1995).
274. Serrano, M., Hannon, G.J. & Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-7 (1993).
275. Hsieh, J.K. et al. Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 22, 78-93 (2002).
276. Jackson, J.G. & Pereira-Smith, O.M. Primary and compensatory roles for RB family members at cell cycle gene promoters that are deacetylated and downregulated in doxorubicin-induced senescence of breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 26, 2501-10 (2006).

277. Knudsen, E.S., Sexton, C.R. & Mayhew, C.N. Role of the retinoblastoma tumor suppressor in the maintenance of genome integrity. *Curr Mol Med* 6, 749-57 (2006).
278. Brehm, A. et al. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597-601 (1998).
279. Bourdon, J.C. et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 19, 2122-37 (2005).
280. Mills, A.A. p63: oncogene or tumor suppressor? *Curr Opin Genet Dev* 16, 38-44 (2006).
281. Prives, C. & Manfredi, J.J. The continuing saga of p53--more sleepless nights ahead. *Mol Cell* 19, 719-21 (2005).
282. Rohaly, G. et al. A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell* 122, 21-32 (2005).
283. Yang, A. et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 2, 305-16 (1998).
284. Dohn, M., Zhang, S. & Chen, X. p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene* 20, 3193-205 (2001).
285. Wu, G. et al. DeltaNp63alpha and TAp63alpha regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development. *Cancer Res* 63, 2351-7 (2003).
286. Rovinski, B. & Benchimol, S. immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene. *Oncogene* 2, 445-52 (1988).
287. Lavigne, A. et al. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol* 9, 3982-91 (1989).
288. Osada, M. et al. Differential recognition of response elements determines target gene specificity for p53 and p63. *Mol Cell Biol* 25, 6077-89 (2005).
289. Pietsch, E.C., Sykes, S.M., McMahon, S.B. & Murphy, M.E. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 27, 6507-21 (2008).
290. Das, S., Boswell, S.A., Aaronson, S.A. & Lee, S.W. P53 promoter selection: choosing between life and death. *Cell Cycle* 7, 154-7 (2008).
291. Toledo, F. & Wahl, G.M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6, 909-23 (2006).
292. Roninson, I.B. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett* 179, 1-14 (2002).
293. Bain, B.J. Cytogenetic and molecular genetic aspects of eosinophilic leukaemias. *Br J Haematol* 122, 173-9 (2003).
294. Fero, M.L., Randel, E., Gurley, K.E., Roberts, J.M. & Kemp, C.J. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 396, 177-80 (1998).

295. Ponce-Castaneda, M.V. et al. p27Kip1: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res* 55, 1211-4 (1995).
296. Slingerland, J. & Pagano, M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 183, 10-7 (2000).
297. Higashimoto, K., Soejima, H., Saito, T., Okumura, K. & Mukai, T. Imprinting disruption of the CDKN1C/KCNQ1OT1 domain: the molecular mechanisms causing Beckwith-Wiedemann syndrome and cancer. *Cytogenet Genome Res* 113, 306-12 (2006).
298. Kikuchi, T. et al. Inactivation of p57KIP2 by regional promoter hypermethylation and histone deacetylation in human tumors. *Oncogene* 21, 2741-9 (2002).
299. Kobatake, T. et al. Aberrant methylation of p57KIP2 gene in lung and breast cancers and malignant mesotheliomas. *Oncol Rep* 12, 1087-92 (2004).
300. Kondo, M. et al. Selective maternal-allele loss in human lung cancers of the maternally expressed p57KIP2 gene at 11p15.5. *Oncogene* 12, 1365-8 (1996).
301. Lai, S., Goepfert, H., Gillenwater, A.M., Luna, M.A. & El-Naggar, A.K. Loss of imprinting and genetic alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 6, 3172-6 (2000).
302. Galardi, S. et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* 282, 23716-24 (2007).
303. Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. & Leder, P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-84 (1995).
304. Balomenos, D. et al. The cell cycle inhibitor p21 controls T-cell proliferation and sex-linked lupus development. *Nat Med* 6, 171-6 (2000).
305. Fero, M.L. et al. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85, 733-44 (1996).
306. Rachdi, L. et al. Differential effects of p27 in regulation of beta-cell mass during development, neonatal period, and adult life. *Diabetes* 55, 3520-8 (2006).
307. Nakayama, K. et al. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85, 707-20 (1996).
308. Kiyokawa, H. et al. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85, 721-32 (1996).
309. Yan, W. et al. High incidence of T-cell tumors in E2A-null mice and E2A/Id1 double-knockout mice. *Mol Cell Biol* 17, 7317-27 (1997).
310. Hawley, R.G. et al. Transforming function of the HOX11/TCL3 homeobox gene. *Cancer Res* 57, 337-45 (1997).
311. Borg, A. et al. Novel germline p16 mutation in familial malignant melanoma in southern Sweden. *Cancer Res* 56, 2497-500 (1996).
312. Francke, U. & Kung, F. Sporadic bilateral retinoblastoma and 13q- chromosomal deletion. *Med Pediatr Oncol* 2, 379-85 (1976).

313. Friend, S.H. et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, 643-6 (1986).
314. Godbout, R., Dryja, T.P., Squire, J., Gallie, B.L. & Phillips, R.A. Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma. *Nature* 304, 451-3 (1983).
315. Hatta, Y. et al. Homozygous deletions of the p15 (MTS2) and p16 (CDKN2/MTS1) genes in adult T-cell leukemia. *Blood* 85, 2699-704 (1995).
316. He, J. et al. CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res* 54, 5804-7 (1994).
317. Kovar, H. et al. Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* 15, 2225-32 (1997).
318. Hebert, J., Cayuela, J.M., Berkeley, J. & Sigaux, F. Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16INK4A) and MTS2 (p15INK4B) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 84, 4038-44 (1994).
319. Sherr, C.J. & Weber, J.D. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10, 94-9 (2000).
320. Sharpless, N.E. et al. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413, 86-91 (2001).
321. Sharpless, N.E., Ramsey, M.R., Balasubramanian, P., Castrillon, D.H. & DePinho, R.A. The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* 23, 379-85 (2004).
322. Kamijo, T. et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649-59 (1997).
323. Krimpenfort, P. et al. p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. *Nature* 448, 943-6 (2007).
324. Matheu, A. et al. Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev* 18, 2736-46 (2004).
325. Momand, J., Jung, D., Wilczynski, S. & Niland, J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 26, 3453-9 (1998).
326. Finlan, L.E., Nenutil, R., Ibbotson, S.H., Vojtesek, B. & Hupp, T.R. CK2-site phosphorylation of p53 is induced in DeltaNp63 expressing basal stem cells in UVB irradiated human skin. *Cell Cycle* 5, 2489-94 (2006).
327. Uramoto, H. et al. Expression of the p53 family in lung cancer. *Anticancer Res* 26, 1785-90 (2006).
328. Lin, Z. et al. DeltaNp63 protein expression in uterine cervical and endometrial cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 132, 811-6 (2006).
329. Takeuchi, Y., Tamura, A., Kamiya, M., Fukuda, T. & Ishikawa, O. Immunohistochemical analyses of p63 expression in cutaneous tumours. *Br J Dermatol* 153, 1230-2 (2005).

330. Quade, B.J. et al. Expression of the p53 homologue p63 in early cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 80, 24-9 (2001).
331. Yamaguchi, K. et al. Frequent gain of the p40/p51/p63 gene locus in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 86, 684-9 (2000).
332. Park, B.J. et al. Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. *Cancer Res* 60, 3370-4 (2000).
333. Ghioni, P. et al. Complex transcriptional effects of p63 isoforms: identification of novel activation and repression domains. *Mol Cell Biol* 22, 8659-68 (2002).
334. Flores, E.R. et al. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* 7, 363-73 (2005).
335. Petitjean, A., Hainaut, P. & Caron de Fromentel, C. TP63 gene in stress response and carcinogenesis: a broader role than expected. *Bull Cancer* 93, E126-35 (2006).
336. Sjoblom, T. et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314, 268-74 (2006).
337. Greenman, C. et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153-8 (2007).
338. Look, A.T. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278, 1059-64 (1997).
339. Begley, C.G. & Green, A.R. The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood* 93, 2760-70 (1999).
340. Aplan, P.D., Raimondi, S.C. & Kirsch, I.R. Disruption of the SCL gene by a t(1;3) translocation in a patient with T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 176, 1303-10 (1992).
341. Kohn, D.B., Sadelain, M. & Glorioso, J.C. Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nat Rev Cancer* 3, 477-88 (2003).
342. Rabbits, T.H. LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. *Genes Dev* 12, 2651-7 (1998).
343. Larson, R.C. et al. Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J* 15, 1021-7 (1996).
344. Shivdasani, R.A., Mayer, E.L. & Orkin, S.H. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* 373, 432-4 (1995).
345. Herblot, S., Aplan, P.D. & Hoang, T. Gradient of E2A activity in B-cell development. *Mol Cell Biol* 22, 886-900 (2002).
346. Ono, Y., Fukuhara, N. & Yoshie, O. TAL1 and LIM-only proteins synergistically induce retinaldehyde dehydrogenase 2 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by acting as cofactors for GATA3. *Mol Cell Biol* 18, 6939-50 (1998).
347. Tremblay, M., Herblot, S., Lecuyer, E. & Hoang, T. Regulation of pT alpha gene expression by a dosage of E2A, HEB, and SCL. *J Biol Chem* 278, 12680-7 (2003).

348. Quong, M.W., Romanow, W.J. & Murre, C. E protein function in lymphocyte development. *Annu Rev Immunol* 20, 301-22 (2002).
349. Schwartz, R., Engel, I., Fallahi-Sichani, M., Petrie, H.T. & Murre, C. Gene expression patterns define novel roles for E47 in cell cycle progression, cytokine-mediated signaling, and T lineage development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9976-81 (2006).
350. Ikawa, T., Kawamoto, H., Goldrath, A.W. & Murre, C. E proteins and Notch signaling cooperate to promote T cell lineage specification and commitment. *J Exp Med* 203, 1329-42 (2006).
351. Xu, W. & Kee, B.L. Growth factor independent 1B (Gfi1b) is an E2A target gene that modulates Gata3 in T-cell lymphomas. *Blood* 109, 4406-14 (2007).
352. Yang, Y. et al. The E47 transcription factor negatively regulates CD5 expression during thymocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3898-902 (2004).
353. Xu, Y., Davidson, L., Alt, F.W. & Baltimore, D. Function of the pre-T-cell receptor alpha chain in T-cell development and allelic exclusion at the T-cell receptor beta locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2169-73 (1996).
354. Haks, M.C., Krimpenfort, P., Borst, J. & Kruisbeek, A.M. The CD3gamma chain is essential for development of both the TCRalpha and TCRgamma lineages. *EMBO J* 17, 1871-82 (1998).
355. Wang, B. et al. T lymphocyte development in the absence of CD3 epsilon or CD3 gamma delta epsilon zeta. *J Immunol* 162, 88-94 (1999).
356. Smyth, G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3 (2004).
357. Chervinsky, D.S., Lam, D.H., Melman, M.P., Gross, K.W. & Aplan, P.D. scid Thymocytes with TCRbeta gene rearrangements are targets for the oncogenic effect of SCL and LMO1 transgenes. *Cancer Res* 61, 6382-7 (2001).
358. Lecuyer, E. et al. Protein stability and transcription factor complex assembly determined by the SCL-LMO2 interaction. *J Biol Chem* 282, 33649-58 (2007).
359. Vitelli, L. et al. A pentamer transcriptional complex including tal-1 and retinoblastoma protein downmodulates c-kit expression in normal erythroblasts. *Mol Cell Biol* 20, 5330-42 (2000).
360. Capron, C. et al. The SCL relative LYL-1 is required for fetal and adult hematopoietic stem cell function and B-cell differentiation. *Blood* 107, 4678-86 (2006).
361. Guo, Y. et al. The homeoprotein Hex is required for hemangioblast differentiation. *Blood* 102, 2428-35 (2003).
362. Bedford, F.K., Ashworth, A., Enver, T. & Wiedemann, L.M. HEX: a novel homeobox gene expressed during haematopoiesis and conserved between mouse and human. *Nucleic Acids Res* 21, 1245-9 (1993).
363. Mack, D.L. et al. Down-regulation of the myeloid homeobox protein Hex is essential for normal T-cell development. *Immunology* 107, 444-51 (2002).

364. George, A., Morse, H.C., 3rd & Justice, M.J. The homeobox gene Hex induces T-cell-derived lymphomas when overexpressed in hematopoietic precursor cells. *Oncogene* 22, 6764-73 (2003).
365. Berns, A. Provirus tagging as an instrument to identify oncogenes and to establish synergism between oncogenes. *Arch Virol* 102, 1-18 (1988).
366. Hahn, W.C. & Weinberg, R.A. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 347, 1593-603 (2002).
367. Land, H., Parada, L.F. & Weinberg, R.A. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602 (1983).
368. Jonkers, J. & Berns, A. Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. *Biochim Biophys Acta* 1287, 29-57 (1996).
369. He, L.Z. et al. Two critical hits for promyelocytic leukemia. *Mol Cell* 6, 1131-41 (2000).
370. von Boehmer, H., Aifantis, I., Azogui, O., Saint-Ruf, C. & Grassi, F. The impact of pre-T-cell receptor signals on gene expression in developing T cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64, 283-9 (1999).
371. Jacobs, H. et al. Oncogenic potential of a pre-T cell receptor lacking the TCR beta variable domain. *Oncogene* 12, 2089-99 (1996).
372. Bellavia, D. et al. Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3788-93 (2002).
373. dos Santos, N.R. et al. Pre-TCR expression cooperates with TEL-JAK2 to transform immature thymocytes and induce T-cell leukemia. *Blood* 109, 3972-81 (2007).
374. Liao, M.J. et al. No requirement for V(D)J recombination in p53-deficient thymic lymphoma. *Mol Cell Biol* 18, 3495-501 (1998).
375. Sambandam, A. et al. Notch signaling controls the generation and differentiation of early T lineage progenitors. *Nat Immunol* 6, 663-70 (2005).
376. O'Neil, J. et al. Activating Notch1 mutations in mouse models of T-ALL. *Blood* 107, 781-5 (2006).
377. Lecuyer, E. & Hoang, T. SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol* 32, 11-24 (2004).
378. Malissen, M. et al. Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J* 14, 4641-53 (1995).
379. Matzinger, P. & Bevan, M.J. Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? *Cell Immunol* 29, 1-5 (1977).
380. Marrack, P. & Kappler, J. The T-cell repertoire for antigen and MHC. *Immunol Today* 9, 308-15 (1988).
381. Gibbons, D. et al. The biological activity of natural and mutant pTalpha alleles. *J Exp Med* 194, 695-703 (2001).

382. Irving, B.A., Alt, F.W. & Killeen, N. Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science* 280, 905-8 (1998).
383. Grusby, M.J., Johnson, R.S., Papaioannou, V.E. & Glimcher, L.H. Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science* 253, 1417-20 (1991).
384. Grusby, M.J. et al. Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3913-7 (1993).
385. Armstrong, S. et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet.* 30, 41-7. Epub 2001 Dec 3. (2002).
386. Brown, P. et al. FLT3 inhibition selectively kills childhood acute lymphoblastic leukemia cells with high levels of FLT3 expression. *Blood* 105, 812-20 (2005).
387. Brown, P., Levis, M., McIntyre, E., Griesemer, M. & Small, D. Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner. *Leukemia* 20, 1368-76 (2006).
388. 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. *J Exp Med* 190, 1039-48 (1999).
389. Petiniot, L.K. et al. Recombinase-activating gene (RAG) 2-mediated V(D)J recombination is not essential for tumorigenesis in Atm-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6664-9 (2000).
390. Lin, Y.W., Nichols, R.A., Letterio, J.J. & Aplan, P.D. Notch1 mutations are important for leukemic transformation in murine models of precursor-T leukemia/lymphoma. *Blood* 107, 2540-3 (2006).
391. Reizis, B. & Leder, P. Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes Dev* 16, 295-300 (2002).
392. Beverly, L.J., Felsher, D.W. & Capobianco, A.J. Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: implications for initiation and regression. *Cancer Res* 65, 7159-68 (2005).
393. Weng, A.P. et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev* 20, 2096-109 (2006).
394. Sharma, V.M. et al. Notch1 contributes to mouse T-cell leukemia by directly inducing the expression of c-myc. *Mol Cell Biol* 26, 8022-31 (2006).
395. Li, X., Gounari, F., Protopopov, A., Khazaie, K. & von Boehmer, H. Oncogenesis of T-ALL and nonmalignant consequences of overexpressing intracellular NOTCH1. *J Exp Med* 205, 2851-61 (2008).
396. Kool, J. & Berns, A. High-throughput insertional mutagenesis screens in mice to identify oncogenic networks. *Nat Rev Cancer* 9, 389-99 (2009).

397. Linette, G. et al. Bcl-2 is upregulated at the CD4⁺ CD8⁺ stage during positive selection and promotes thymocyte differentiation at several control points. *Immunity* 1, 197-205. (1994).
398. Michie, A. et al. Constitutive Notch signalling promotes CD4 CD8 thymocyte differentiation in the absence of the pre-TCR complex, by mimicking pre-TCR signals. *Int Immunol* 19, 1421-30. Epub 2007 Nov 1. (2007).
399. Bhandoola, A. & Sambandam, A. From stem cell to T cell: one route or many? *Nat Rev Immunol* 6, 117-26 (2006).
400. Prieur, A. & Peeper, D.S. Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Curr Opin Cell Biol* 20, 150-5 (2008).
401. Armstrong, S.A. & Look, A.T. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 23, 6306-15 (2005).
402. Borden, K.L., Campbelldwyer, E.J., Carlile, G.W., Djavani, M. & Salvato, M.S. Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *J Virol* 72, 3819-26 (1998).
403. Breiman, L. Random Forests. in *Machine Learning*, Vol. 45 (ed. Schapire, R.E.) 5-32 (Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2001).
404. Hoang, T. & Parsons, V.L. Bagging survival trees for prognosis based on gene profiles. in *Compstat* (ed. Antoch, J.) 1201-1208 (Physica Verlag, Berlin, 2004).
405. Ishwaran, H. & Kogalur, U. Random survival forests. *Rnews* 7, 25-31 (2007).
406. Hastie, T., Friedman, J. & Tibshirani, R. *Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference and Prediction* (Springer-Verlag, Berlin, Germany, 2001).
407. Sun, A., Bagella, L., Tutton, S., Romano, G. & Giordano, A. From G0 to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. *J Cell Biochem* 102, 1400-4 (2007).
408. Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y. & Hattori, M. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res* 32, D277-80 (2004).
409. Benjamini, y. & Hochberg, T. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Stat Soc B* 85, 289-300 (1995).
410. Goeman, J.J., van de Geer, S.A., de Kort, F. & van Houwelingen, H.C. A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. *Bioinformatics* 20, 93-9 (2004).
411. Mathon, N.F. & Lloyd, A.C. Cell senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 203-13 (2001).
412. Park, S.T. & Sun, X.H. The Tal1 oncoprotein inhibits E47-mediated transcription. Mechanism of inhibition. *J Biol Chem* 273, 7030-7 (1998).
413. Bischof, O. et al. Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO J* 21, 3358-69 (2002).
414. Pearson, M. et al. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207-10 (2000).

415. Frippiat, C. et al. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 2531-7 (2001).
416. Yoon, S.O., Yun, C.H. & Chung, A.S. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev* 123, 1597-604 (2002).
417. Lee, H.C. et al. Concurrent increase of oxidative DNA damage and lipid peroxidation together with mitochondrial DNA mutation in human lung tissues during aging--smoking enhances oxidative stress on the aged tissues. *Arch Biochem Biophys* 362, 309-16 (1999).
418. Collado, M. et al. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J Biol Chem* 275, 21960-8 (2000).
419. Macip, S. et al. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol* 23, 8576-85 (2003).
420. Sugrue, M.M., Wang, Y., Rideout, H.J., Chalmers-Redman, R.M. & Tatton, W.G. Reduced mitochondrial membrane potential and altered responsiveness of a mitochondrial membrane megachannel in p53-induced senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 123-30 (1999).
421. Campisi, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513-22 (2005).
422. Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A. & Sherr, C.J. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000 (1995).
423. Quelle, D.E. et al. Cloning and characterization of murine p16INK4a and p15INK4b genes. *Oncogene* 11, 635-45 (1995).
424. Stone, S. et al. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res* 55, 2988-94 (1995).
425. Keyes, W.M. et al. p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev* 19, 1986-99 (2005).
426. Kaghad, M. et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90, 809-19 (1997).
427. Schwarze, S.R., Shi, Y., Fu, V.X., Watson, P.A. & Jarrard, D.F. Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene* 20, 8184-92 (2001).
428. Tsugu, A. et al. Expression of p57(KIP2) potently blocks the growth of human astrocytomas and induces cell senescence. *Am J Pathol* 157, 919-32 (2000).
429. Fogal, V. et al. Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J* 19, 6185-95 (2000).
430. Guo, A. et al. The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 730-6 (2000).
431. Alcalay, M. et al. The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 18, 1084-93 (1998).

432. Wu, W.S. et al. The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases. *Mol Cell Biol* 21, 2259-68 (2001).
433. Scaglioni, P.P. et al. A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* 126, 269-83 (2006).
434. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70 (2000).
435. Garcia-Peydro, M., de Yébenes, V.G. & Toribio, M.L. Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. *J Immunol* 177, 3711-20 (2006).
436. Loose, M., Swiers, G. & Patient, R. Transcriptional networks regulating hematopoietic cell fate decisions. *Curr Opin Hematol* 14, 307-14 (2007).
437. Valtieri, M. et al. Enforced TAL-1 expression stimulates primitive, erythroid and megakaryocytic progenitors but blocks the granulopoietic differentiation program. *Cancer Res* 58, 562-9 (1998).
438. Newman, C.S., Chia, F. & Krieg, P.A. The XHex homeobox gene is expressed during development of the vascular endothelium: overexpression leads to an increase in vascular endothelial cell number. *Mech Dev* 66, 83-93 (1997).
439. Vignali, M., Steger, D.J., Neely, K.E. & Workman, J.L. Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes. *EMBO J* 19, 2629-40 (2000).
440. Ordentlich, P. et al. Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol Cell Biol* 18, 2230-9 (1998).
441. Inaba, T. et al. Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-lineage leukemia. *Science* 257, 531-4 (1992).
442. Raimondi, S.C. et al. New recurring chromosomal translocations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 77, 2016-22 (1991).
443. Mellentin, J.D. et al. The gene for enhancer binding proteins E12/E47 lies at the t(1;19) breakpoint in acute leukemias. *Science* 246, 379-82 (1989).
444. Brambillasca, F. et al. Identification of a novel molecular partner of the E2A gene in childhood leukemia. *Leukemia* 13, 369-75 (1999).
445. Hunger, S.P., Brown, R. & Cleary, M.L. DNA-binding and transcriptional regulatory properties of hepatic leukemia factor (HLF) and the t(17;19) acute lymphoblastic leukemia chimera E2A-HLF. *Mol Cell Biol* 14, 5986-96 (1994).
446. Hunger, S.P., Devaraj, P.E., Foroni, L., Secker-Walker, L.M. & Cleary, M.L. Two types of genomic rearrangements create alternative E2A-HLF fusion proteins in t(17;19)-ALL. *Blood* 83, 2970-7 (1994).
447. LeBrun, D.P. & Cleary, M.L. Fusion with E2A alters the transcriptional properties of the homeodomain protein PBX1 in t(1;19) leukemias. *Oncogene* 9, 1641-7 (1994).
448. Lu, Q., Wright, D.D. & Kamps, M.P. Fusion with E2A converts the Pbx1 homeodomain protein into a constitutive transcriptional activator in human leukemias carrying the t(1;19) translocation. *Mol Cell Biol* 14, 3938-48 (1994).

449. Williams, D.L. et al. New chromosomal translocations correlate with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 36, 101-9 (1984).
450. Honda, H. et al. Expression of E2A-HLF chimeric protein induced T-cell apoptosis, B-cell maturation arrest, and development of acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 93, 2780-90 (1999).
451. Kamps, M.P. & Baltimore, D. E2A-Pbx1, the t(1;19) translocation protein of human pre-B-cell acute lymphocytic leukemia, causes acute myeloid leukemia in mice. *Mol Cell Biol* 13, 351-7 (1993).
452. Monica, K., LeBrun, D.P., Dedera, D.A., Brown, R. & Cleary, M.L. Transformation properties of the E2a-Pbx1 chimeric oncoprotein: fusion with E2a is essential, but the Pbx1 homeodomain is dispensable. *Mol Cell Biol* 14, 8304-14 (1994).
453. Smith, K.S., Rhee, J.W. & Cleary, M.L. Transformation of bone marrow B-cell progenitors by E2a-Hlf requires coexpression of Bcl-2. *Mol Cell Biol* 22, 7678-87 (2002).
454. Smith, K.S., Rhee, J.W., Naumovski, L. & Cleary, M.L. Disrupted differentiation and oncogenic transformation of lymphoid progenitors in E2A-HLF transgenic mice. *Mol Cell Biol* 19, 4443-51 (1999).
455. Sykes, D.B. & Kamps, M.P. E2a/Pbx1 induces the rapid proliferation of stem cell factor-dependent murine pro-T cells that cause acute T-lymphoid or myeloid leukemias in mice. *Mol Cell Biol* 24, 1256-69 (2004).
456. Yoshihara, T., Inaba, T., Shapiro, L.H., Kato, J.Y. & Look, A.T. E2A-HLF-mediated cell transformation requires both the trans-activation domains of E2A and the leucine zipper dimerization domain of HLF. *Mol Cell Biol* 15, 3247-55 (1995).
457. Dedera, D.A. et al. Chimeric homeobox gene E2A-PBX1 induces proliferation, apoptosis, and malignant lymphomas in transgenic mice. *Cell* 74, 833-43 (1993).
458. Sjogren, H., Wedell, B., Meis-Kindblom, J.M., Kindblom, L.G. & Stenman, G. Fusion of the NH2-terminal domain of the basic helix-loop-helix protein TCF12 to TEC in extraskeletal myxoid chondrosarcoma with translocation t(9;15)(q22;q21). *Cancer Res* 60, 6832-5 (2000).
459. Lin, Y.W. et al. OLIG2 (BHLHB1), a bHLH transcription factor, contributes to leukemogenesis in concert with LMO1. *Cancer Res* 65, 7151-8 (2005).
460. Yasmeen, N. & Ashraf, S. Childhood acute lymphoblastic leukaemia; epidemiology and clinicopathological features. *J Pak Med Assoc* 59, 150-3 (2009).
461. Campese, A.F. et al. Notch1-dependent lymphomagenesis is assisted by but does not essentially require pre-TCR signaling. *Blood* 108, 305-10 (2006).
462. Aifantis, I. et al. A critical role for the cytoplasmic tail of pTalpha in T lymphocyte development. *Nat Immunol* 3, 483-8 (2002).
463. Yamasaki, S. et al. Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nat Immunol* 7, 67-75 (2006).
464. Hayday, A.C. & Pennington, D.J. Key factors in the organized chaos of early T cell development. *Nat Immunol* 8, 137-44 (2007).

465. Taghon, T.N., David, E.S., Zuniga-Pflucker, J.C. & Rothenberg, E.V. Delayed, asynchronous, and reversible T-lineage specification induced by Notch/Delta signaling. *Genes Dev* 19, 965-78 (2005).
466. Aster, J.C., Pear, W.S. & Blacklow, S.C. Notch signaling in leukemia. *Annu Rev Pathol* 3, 587-613 (2008).
467. Palomero, T. et al. Transcriptional regulatory networks downstream of TAL1/SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 108, 986-92 (2006).
468. Viale, A. et al. Cell-cycle restriction limits DNA damage and maintains self-renewal of leukaemia stem cells. *Nature* 457, 51-6 (2009).
469. Hsiao, M.H., Yu, A.L., Yeargin, J., Ku, D. & Haas, M. Nonhereditary p53 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia are associated with the relapse phase. *Blood* 83, 2922-30 (1994).
470. Mungamuri, S.K., Yang, X., Thor, A.D. & Somasundaram, K. Survival signaling by Notch1: mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent inhibition of p53. *Cancer Res* 66, 4715-24 (2006).
471. Finkel, T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 15, 247-54 (2003).
472. Schmidt, K.N., Traenckner, E.B., Meier, B. & Baeuerle, P.A. Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-kappa B. *J Biol Chem* 270, 27136-42 (1995).
473. Los, M. et al. IL-2 gene expression and NF-kappa B activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. *EMBO J* 14, 3731-40 (1995).
474. Bonizzi, G. et al. Reactive oxygen intermediate-dependent NF-kappaB activation by interleukin-1beta requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. *Mol Cell Biol* 19, 1950-60 (1999).
475. Chang, P.Y., Draheim, K., Kelliher, M.A. & Miyamoto, S. NFKB1 is a direct target of the TAL1 oncoprotein in human T leukemia cells. *Cancer Res* 66, 6008-13 (2006).
476. Takahashi, A. et al. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol* 8, 1291-7 (2006).
477. Hagen, T.M. et al. Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3064-9 (1997).
478. Lee, A.C. et al. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 274, 7936-40 (1999).
479. Ding, Y. et al. Molecular cloning and functional characterization of the upstream promoter region of the human p73 gene. *DNA Res* 6, 347-51 (1999).
480. Jensen, K., Shiels, C. & Freemont, P.S. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223-33 (2001).
481. Fagioli, M. et al. Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms. *Oncogene* 7, 1083-91 (1992).

482. Salomoni, P. & Bellodi, C. New insights into the cytoplasmic function of PML. *Histol Histopathol* 22, 937-46 (2007).
483. Mu, Z.M., Le, X.F., Vallian, S., Glassman, A.B. & Chang, K.S. Stable overexpression of PML alters regulation of cell cycle progression in HeLa cells. *Carcinogenesis* 18, 2063-9 (1997).
484. Bernardi, R. et al. PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* 6, 665-72 (2004).
485. de Stanchina, E. et al. PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* 13, 523-35 (2004).
486. Ciofani, M. et al. Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J Immunol* 172, 5230-9 (2004).
487. Guidos, C.J. Synergy between the pre-T cell receptor and Notch: cementing the alphabeta lineage choice. *J Exp Med* 203, 2233-7 (2006).

Annexe 1

Figure A.1 L'activité répressive de SCL nécessite son domaine HLH et ne peut être contrée par le superactivateur SCL-VP16.

A) Alignement de la région bHLH de SCL avec les protéines E. B) La répression de l'activité enhancer du *Ptcr* par SCL est médiée par son domaine HLH et ne peut être contrée par le domaine d'activation de VP16. La lignée de cellules T AD10.1 a été transfectée avec la construction de l'enhancer du *Ptcr* ($pT\alpha$) et SCL, les chimères de SCL, le domaine d'activation VP16 ou le vecteur MSCV vide. Les résultats sont exprimés en activité luciférase relativement au promoteur TATA et représentent la moyenne \pm SD de 3 expériences indépendantes. Les activités des rapporteurs luciférase ont été normalisées à celles d'un contrôle interne (CMV- β gal). L'expression des chimères de SCL dans des cellules 293T a été analysée par immunobuvardage de type Western en utilisant des anticorps contre SCL et GFP, le contrôle d'efficacité de transfection. C) La protéine de fusion SCL-VP16 est fonctionnellement active sur un promoteur artificiel. Le rapporteur GAL4 (5xGAL4UAS-tk109-Luciférase) a été cotransfecté dans les cellules NIH3T3 avec une concentration croissante des vecteurs d'expression pour la chimère GAL4 DBD-E2A en présence ou en absence de SCL ou de la protéine de fusion SCL-VP16. Les résultats sont exprimés par rapport au niveau d'activation par-dessus l'activité du rapporteur GAL4 seul et représentent la moyenne \pm SD de 3 expériences indépendantes. D) La protéine de fusion SCL-VP16 agit en tant que superactivateur sur le promoteur *Gpa*. La construction du promoteur *Gpa* a été cotransfectée dans les cellules NIH3T3 avec le vecteur d'expression pour GATA1, LMO2, LDB1 et E2A en présence ou en absence de SCL ou de la protéine de fusion SCL-VP16. Les résultats sont exprimés par rapport au niveau d'activation par-dessus l'activité du complexe en absence de SCL et représentent la moyenne \pm SD de 3 expériences indépendantes.

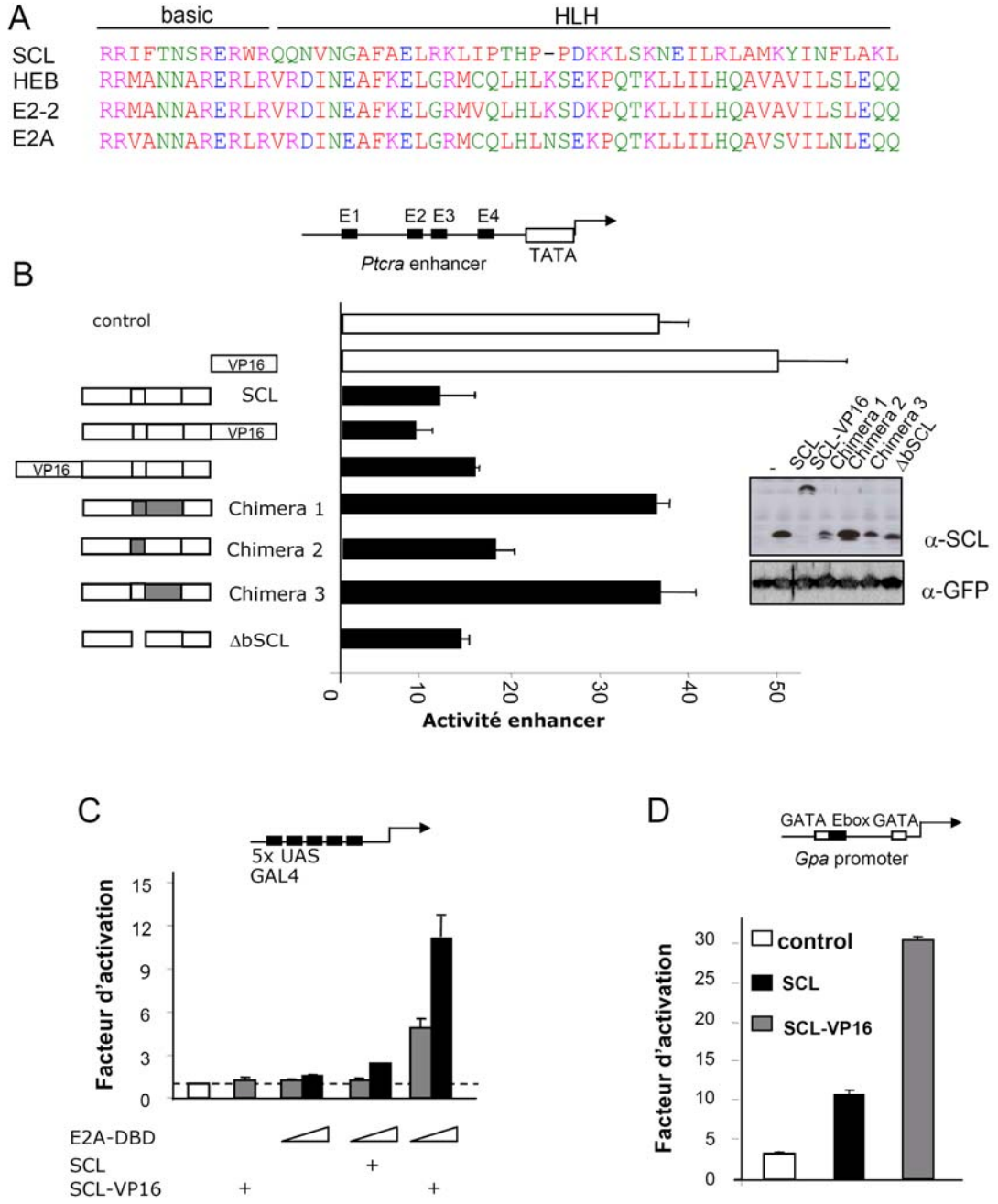


Figure A.1

Figure A.2 L'interaction protéique entre SCL et LMO1 est nécessaire à la leucémogénèse.

A) Courbes de survie de type Kaplan-Meier du temps d'apparition de la leucémie pour les souris *SCL^{tg}LMO1^{tg}* et *M13^{tg}LMO1^{tg}*. Une chute de la ligne représente le sacrifice ou la mort d'un animal diagnostiqué avec un lymphome thymique malin à la nécropsie. B) Niveaux d'expression des protéines SCL ou SCL-M13 dans le thymus de souris au stade préleucémique par immunofluorescence intracellulaire en cytométrie de flux (FACS). C) Phénotype des lymphomes thymiques de souris *SCL^{tg}LMO1^{tg}* et *M13^{tg}LMO1^{tg}* analysés par cytométrie de flux (FACS) en utilisant des anticorps contre CD4, CD8 et Thy1.2. D) Les niveaux protéiques de LMO1 sont modulés par l'interaction avec SCL par l'inhibition de sa dégradation par le protéasome. Les niveaux protéiques des protéines indiquées ont été évalués par immunobuvardage de type Western à partir d'extraits nucléaires de cellules 293T surexprimant LMO1 en présence ou en absence de SCL ou du mutant d'interaction SCL-M13 traitées ou non avec du MG132. Le vecteur MSCV-GFP a été cotransfecté pour un contrôle de normalisation. À noter, SCL augmente les niveaux protéiques de LMO1, alors que SCL-M13 en est incapable. E) L'interaction entre SCL et LMO1 n'est pas nécessaire à la répression de l'activité enhancer du Ptcra. La lignée de cellules T AD10.1 a été transfectée avec la construction de l'enhancer du Ptcra et SCL, le mutant d'interaction M13 ou le vecteur MSCV vide. Les résultats sont exprimés en activité luciférase relativement au promoteur TATA et représentent la moyenne \pm SD de 3 expériences indépendantes. Les activités des rapporteurs luciférase ont été normalisées à celles d'un contrôle interne (CMV- β gal). Figure reproduite de (358) avec la permission de The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Copyright 2007.

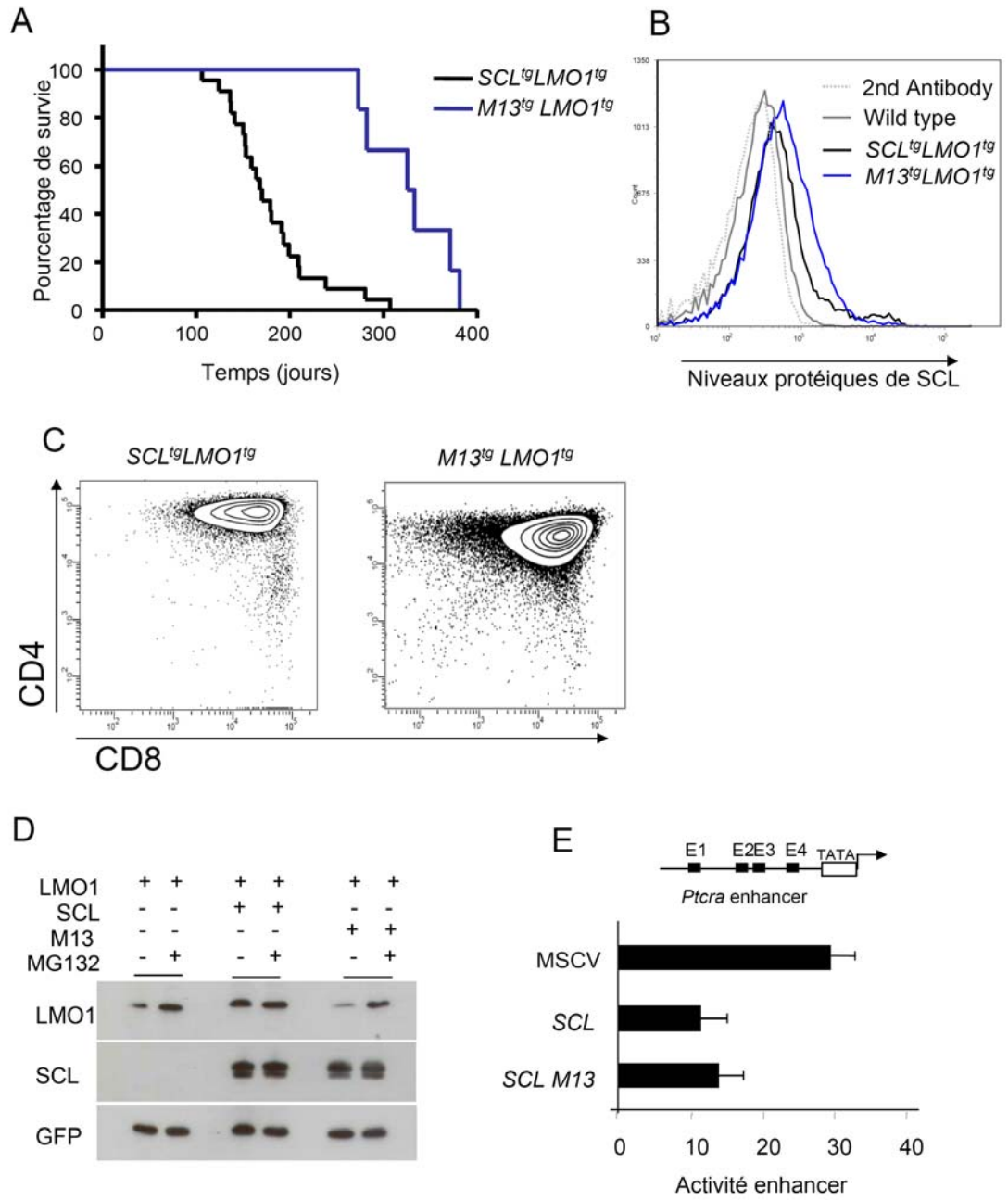
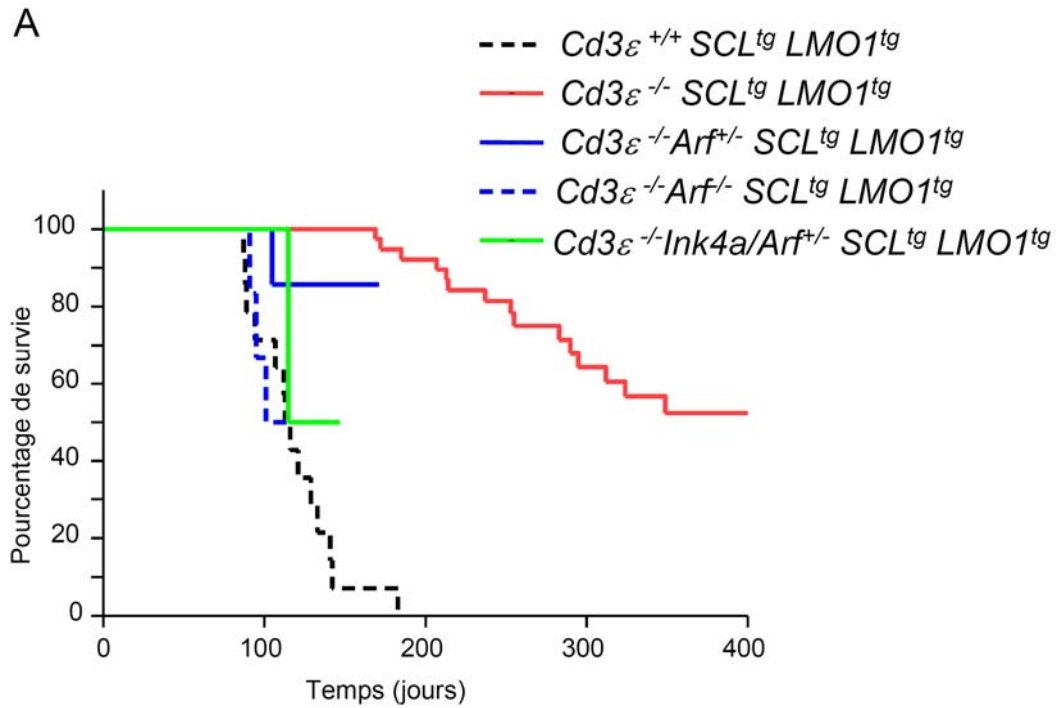


Figure A.2

Figure A.3 La perte de fonction des gènes *Ink4a* et/ou *Arf* accélère la leucémie induite par *SCL* et *LMO1* en absence d'un pré-TCR fonctionnel.

A) Courbes de survie de type Kaplan-Meier du temps d'apparition de la leucémie pour les souris *SCL^{tg}LMO1^{tg} Cd3ε^{+/+}* ou *Cd3ε^{-/-}* en présence ou en absence d'une ou deux copie des gènes *Ink4a* et/ou *Arf*. Une chute de la ligne représente le sacrifice ou la mort d'un animal diagnostiqué avec un lymphome thymique malin à la nécropsie. B) Analyse de la survie de souris des génotypes indiqués. Le ratio du nombre de souris décédées à 115 jours par rapport à chaque cohorte est indiqué.



B

	Leucémies développées à 115 jours
$SCL^{tg} LMO1^{tg} Cd3\epsilon^{-/-}$	0/6
$SCL^{tg} LMO1^{tg} Cd3\epsilon^{-/-} Arf^{+/-}$	1/6
$SCL^{tg} LMO1^{tg} Cd3\epsilon^{-/-} Arf^{-/-}$	3/6
$SCL^{tg} LMO1^{tg} Cd3\epsilon^{-/-} Ink4a/Arf^{+/-}$	1/3

Figure A.3