UNIVERSITE DE BOURGOGNE

ECOLE DOCTORALE E2S N°490

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Discipline : Sciences de la Vie

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

présentée et soutenue publiquement le 25 Juin 2013

par

Anne LARGEOT

Contrôle de l'expression du gène *HOXA9* dans les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques : rôle des enzymes épigénétiques MOZ et MLL, et du facteur de polyadénylation Symplekin

Centre de Recherche Inserm U866 de Dijon

Jury

Monsieur le Docteur Olivier Bensaude	Rapporteur
Monsieur le Docteur Zdenko Herceg	Rapporteur
Madame le Professeur Michèle Jouvenot	Examinatrice
Madame le Docteur Sophie Pison-Rousseaux	Examinatrice
Monsieur le Docteur Stephan Vagner	Examinateur
Monsieur le Professeur Jean-Noël Bastie	Directeur
Monsieur le Docteur Laurent Delva	Co-directeur

Celui qui déplace la montagne, c'est celui qui commence à enlever les petites pierres

Kǒng Fūzǐ,, dit **CONFUCIUS** (-551 à -479 Av J.C)

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des membres du jury :

Messieur **Olivier Bensaude** et **Zdenko Herceg** d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je vous remercie vivement pour vos conseils avisés.

Madame **Sophie Pison-Rousseaux** et Monsieur **Stephan Vagner**, vous avez été membres de mon comité de suivi de thèse, et vous avez accepté de juger ce travail en tant qu'examinateurs. Je vous remercie chaleureusement pour le temps que vous m'avez consacré tout au long de ces années et pour votre gentillesse.

Madame **Michèle Jouvenot** d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examinatrice.

Monsieur **Jean-Noël Bastie** d'avoir été mon directeur de thèse. Ton humeur joviale, tes blagues accompagnées de ton rire si particulier, tes retards perpétuels à la cantine, ta Mac'attitude, tes conseils, ton soutien et l'intérêt que tu nous portes font de toi bien plus qu'un chef.

Monsieur **Laurent Delva** d'avoir été mon superviseur direct. Je ne suis pas prête d'oublier tes leçons de géopolitique, de météorologie, de la langue française selon les règles de l'Académie (quoique pour celles-ci, il me faudrait des rappels réguliers)… Tu prends toujours le temps de nous aider (même quand il s'agit de partir se faire dorer la pilule au soleil), d'apprendre à nous connaître. J'ai parfois encore du mal avec tes jeux de mots trop sophistiqués, mais j'espère avoir encore souvent l'occasion d'exercer mon cerveau en ta compagnie.

Je remercie vivement l'ensemble des membres du groupe : **Jérôme**, **mon mentor** !! Grâce à toi j'ai tout appris (on reparlera de la rémunération pour avoir écrit ça…), j'ai beaucoup aimé travailler avec toi. **Romain** pour ta bonne humeur et tes conseils avisés sur le rangement d'une paillasse. **Brice**, pour nos conversations de bureau qui prenaient souvent des allures de conversations de comptoir ainsi que pour la toupie infernale qui permettait de me remettre les idées en place. **Romain bis**, travailler à tes côtés a été un réel plaisir, ta sympathie et ta passion pour la Science font de toi un collègue de travail extra ! **Jean**, au labo comme à la ville ces quelques années en ta compagnie n'ont pas été de tout repos : blagues plus que douteuses, effets sonores plus ou moins perfectionnés et propositions déplacées, enfin bref, tu as été mon petit rayon de soleil printanier… **Laurence**, ta bonne humeur et l'énorme travail que tu fournis pour faire tourner ce labo sont précieux, j'ai aimé partager les

midis à la cantine ave toi. La relève est assurée avec **Marie** (bonne chance pour la suite, en espérant que l'avenir te comblera), **Caro**, **Ronan**, **Laetitia**, **Jennifer** et **Valérie**, je compte sur vous pour perpétrer l'esprit de cette équipe.

Un grand merci à l'ensemble des membres du laboratoire pour leur aide, leur gentillesse et leur bonne humeur : **Anne-Laure J.** (ça a été chouette de te revoir pour le jour J), **Arlette**, **Cindy, Sabrina** (je n'oublierai pas les pauses sur le toit)**, Kévinou** (bon courage pour la suite, et que je ne te croise pas les mains dans les poches !!), **Olivier, Pierre, Catherine, Aziza** (merci pour ta gentillese), **Arnaud**, **Nath**, **Marion**, **Alexandrine** (merci pour ta patience avec les commandes maudites), **Lucile**, **Cédric**, **Amandine**, **Lydie**, **Malika**, **Marion**, **Chiquette**, **Anne-Laure**, **Leslie**, **Jessy**, **Julien**, **Aurélie**, **Fanny**, **Naima**, **Ali**, **Jérôme**, **Alex**, **Jean-Claude**, **Adonis**, **Arthur**, **Kumar**, **André**, **Valentin**, **Hélène**, **Sophie**, **Margaux**…

Un immense merci à ma famille. **Maman** et **Papa**, ça y'est c'est presque fini, merci de m'avoir encouragé toutes ces années. **Céline** et **Claudine**, malgré la distance plus ou moins importante qui nous a séparé pendant cette thèse, je sais que vous m'avez soutenue. Je vous aime fort fort fort ! A ma belle famille (**Yvonne**, **Virginie**, **Tarek**, **Karim** et **Sofiane**), je suis très fière d'être officiellement l'une des vôtres maintenant. A tous les autres, **Largeot** et **Franzetti**, la liste est bien trop longue !

Merci à tous mes amis, c'est grâce à vous si les quatre années qui viennent de s'écouler n'ont pas été si difficiles : **Anne-Laure** (j'espère que ta joie et ta bonne humeur m'accompagneront encore longtemps), **Tata Elo** (ta vision du monde qui nous entoure est toujours un plaisir à écouter, même si nous ne partageons pas toujours le même avis), **Manu** (merci pour ton aide précieuse durant toutes ces années), **Elodie**, **Emilie et ses bonhommes**, **Fedra** (la fameuse tête de tigre), tous les membres de la **FDP**, **Michel**, tu m'offrais des roses volées dans le jardin des voisins, j'en aurais bien voulue une ce 25 Juin…

Enfin, toi qui m'a consolée quand les manips ne marchaient pas, toi qui m'a vu rentrer à la maison en sautillant quand au contraire les résultats étaient là, toi qui me dit souvent de ne pas baisser les bras, même si la Science est fourbe, toi qui m'aime depuis toutes ces années, **Gilou** ! Merci un millier de fois.

Résumé de la thèse

Mon travail de thèse porte sur l'étude du rôle de l'histone acétyl-transférase (HAT) **MOZ** (*Monocytic leukemia zinc finger protein*) et de l'histone méthyle-transférase (HMT) MLL (*Mixed Lineage Leukemia*) dans **l'hématopoïèse et la leucémogenèse**. MOZ et MLL sont deux enzymes modifiant les histones. Elles contrôlent l'expression de nombreux gènes, notamment des gènes *HOX*, des facteurs de transcription connus pour leur rôle dans le développement embryonnaire, mais également dans l'hématopoïèse normale et pathologique. Leur régulation transcriptionnelle implique des **mécanismes épigénétiques**, qui sont en partie imputables à **MOZ et MLL**.

Nous avions constaté que certains gènes étaient modulés de façon identique dans les leucémies aiguës comportant des protéines de fusion avec MOZ ou MLL. Parmi eux figure le gène *HOXA9* dont le potentiel leucémogène a été démontré. Ces observations nous ont conduit à rechercher une éventuelle interaction physique et une coopération fonctionnelle entre MOZ et MLL. Nous avons montré que MOZ était associée avec MLL dans les cellules souches/progénitrices humaines CD34+ afin d'activer la transcription des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9*, gènes clefs de l'hématopoïèse et de la leucémogenèse. En effet, les deux protéines interagissent et sont recrutées au niveau de leur promoteur. Nous avons mis en évidence une interférence fonctionnelle entre ces deux facteurs épigénétiques, puisque MOZ est nécessaire au recrutement et à l'activité enzymatique de MLL au niveau des histones sur les promoteurs des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9* et réciproquement.

Afin de mieux caractériser le mécanisme d'action impliquant la coopération entre MOZ et MLL, nous avons recherché d'autres partenaires associés à ce duo. Parmi les différentes protéines identifiées, la Symplekin a retenu notre attention. Ce membre de la machinerie de polyadénylation des ARN est également connu en tant que co-régulateur de la transcription. Nous avons mis en évidence l'interaction de la Symplekin avec MOZ et MLL dans les cellules de la lignée hématopoïétique immature humaine KG1. Les trois protéines sont co-recrutées sur le promoteur du gène *HOXA9*. Nous avons démontré le rôle ambivalent de la Symplekin. Bien qu'elle soit importante pour la polyadénylation et par conséquent pour la stabilité de l'ARN *Hoxa9*, la Symplekin empêche le recrutement de MOZ et de MLL au niveau du promoteur du gène *HOXA9*, conduisant ainsi à une diminution de sa transcription.

Mots-clefs : Hématopoïèse ; Epigénétique ; Gènes *HOX* ; MOZ ; MLL ; Symplekin ; Polyadénylation

Summary

My thesis project has consisted of the study of MOZ (Monocytic leukaemia Zinc finger protein) and MLL (Mixed Lineage Leukemia). MOZ is a member of the MYST family of histone acetyl-transferases involved in haematopoiesis and MLL belongs to the SET family of histone methyl-transferases. MOZ and MLL activate transcription of *HOX* genes, which are transcription factors essential during embryogenesis, haematopoiesis and leukaemogenesis.

It was shown that MOZ and MLL leukaemias harbour abnormal levels of *HOX* genes expression. In our study, we characterised an *in vivo* cooperation between MOZ and MLL in human haematopoietic stem/progenitor cells $CD34^+$ (HSCs). MOZ co-localises and interacts with MLL *in vivo*. They are both recruited onto *HOX* promoters. MOZ is essential for MLL recruitment, and this is reciprocal. In conclusion, we provided an example of a mechanism involving a direct cross-talk between two histone modifying enzymes, facilitating the rapid remodelling of chromatin in order to favour the commitment of human HSCs *via HOX* genes regulation.

In order to dissect the mechanism of action of this complex, we decided to identify novel proteins interacting with both MOZ and MLL. A member of the RNA polyadenylation machinery has been isolated: Symplekin. We confirmed the interaction between MOZ, MLL and Symplekin in the human haematopoietic immature cell line KG1. We showed that Symplekin is co-recruited to *HOXA9* promoter along with MOZ and MLL. We demonstrated the dual role of this member of the polyadenylation machinery. Indeed, besides the fact that Symplekin is important for *Hoxa9* polyadenylation, thus its stability, it prevents MOZ and MLL recruitment onto *HOXA9* promoter, leading to a decrease of *HOXA9* transcription.

Our work improved the understanding of the mechanism of action of MOZ and MLL in *HOX* control.

Keywords : Haematopoeisis ; Epigenetic regulation ; *HOX* genes ; MOZ ; MLL ; Symplekin ; Polyadenylation.

Liste des abréviations

abd-A	*abdominal-A*
abd-B	*abdominal-B*
acétyl-CoA	acétyl-CoenzymeA
ADN	acide désoxyribonucléique
AdoHcy	S-adénosyl-homocystéine
AdoMet	S-adénosyl-méthionine
ADP	adénosine diphosphate
AF4	*ALL-1-fused gene from chromosome 4*
AFF4	*AF4/FRM2 family*, *member 4*
ALL-1	*acute lymphoblastic leukaemia-1*
AML1	*acute myeloid leukemia 1*
antp	*antennapedia*
ANTP-c	*antennapedia complex*
ARN	acide ribonucléique
ARNnc	ARN non codant
ATP	adénosine triphosphate
ATRA	*all-trans retinoic acid*
ASH	*absent, small and homeotic discs*
ASH2L	*absent-small-homeotic-2-like protein*
BCR-ABL	*breakpoint cluster region-Abelson*
BFU	*burst forming unit*
BFU-E	BFU-*erythroid*
BFU-Mk	BFU-*megakaryocyte*
Bmi-1	*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*
BRPF	*bromodomain- and PHD-finger-containing protein*
BX-C	*bithorax complex*
c-ABL	*cellular-Abelson*
cad	*caudal*
CBFβ	*core-binding factor β*
CBP	*CREB-binding protein*
CD	*cluster of differentiation*
Cdx	*caudal type homeobox*
C/EBP□	*CCAAT/enhancer binding protein alpha*
SEC	*super elongation complex*
CF_m	*mammalian cleavage factor*
cfms	*cellular-feline McDonough sarcoma*
CFU	*colony forming unit*
CFU-G	CFU-*granulocyte*
CFU-GEMM	CFU-*granulocyte*, *erythrocyte*, *monocyte*, *megakaryocyte*
CFU-GM	CFU- *granulocyte, monocyte*
CFU-M	CFU-*monocyte*
CFU-Mk	CFU-*megakaryocyte*
CFU-S	CFU-*in the spleen*
CHD	*chromodomain*, *helicase*, *DNA binding*
ChIP	*chromatin immunoprecipitation*
5mC	cinq-méthyl-cytosine

CLP	*common lymphoid progenitors*
CMP	*common myeloid progenitors*
c-MPL	*cellular-myeloproliferative leukemia virus oncogene*
COMPASS	*complexof proteins associated with Set1*
CoREST	*RE1-Silencing Transcription factor corepressor*
CREB	*cAMP response element-binding*
CSH	**cellule souche hématopoïétique**
CSH-CT	CSH à court terme
CSH-LT	CSH à long terme
CSH-TI	CSH à terme intermédiaire
CSL	cellule souche leucémique
CSM	cellule souche mésenchymateuse
CPF	*cleavage and polyadenylation factor*
CPSF	*cleavage and polyadenylation specificity factor*
CSTF	*cleavage stimulating factor*
CTD	*C-terminal domain*
CXCL12	*chemokine (C-X-C 2 motif) ligand 2*
Cyp_{33}	*cyclophilin*$_{33}$
dfd	*deformed*
DNMT	*DNA methyltransferase*
DOT1	*disruptor of telomeric silencing*
DOT1L	*DOT1 like*
EAF6	*esa1-associated factor*
ECS^{ASB}	*elongin B/C-Cullin–SOCS box protein*
ELL	*eleven-nineteen lysine-rich leukemia*
ENL	*eleven-nineteen leukemia*
Enok	*enoki mushroom*
EPO	érythropoïétine
ERB2	*estrogen receptor beta 2*
Esa1	*essential Sas2-related acetyltransferase 1*
ETO	*eight twenty one*
ETP	*early thymocyte progenitors*
ETS	*E-twenty six*
ETV6	*ETS variant 6*
Exd	*extradenticle*
EZH	*enhancer of zeste*
FAB	*french-american-british*
FAD	*flavin adenin dinucleotide*
FGF	*fibroblast growth factor*
Flt3	*FMS-like tyrosine kinase 3*
FMS	*feline McDonough sarcoma*
Gal4	*galactose 4*
GATA-2	*GATA binding protein* (*Globin transcription factor 2*)
Gcn5	*General control non-derepressible*
Gfi-1	*growth factor independent-1*
GMP	*granulocyte-macrophage progenitors*

GNAT	*gcn5-related acetyltransferase*
Gsx	*genomic screened homeobox*
HAT	**histone acétyl-transférase**
HBO1	*HAT bound to ORC1*
HD	homéodomaine
HDAC	histone désacétylase
HEAT	*huntingtin*, *EF3*, *A subunit of PP2A*, *TOR1*
HEK293T	*human embryonic kidney 293T*
HIPK2	*homeodomain-interacting protein kinase 2*
HLA-DR	*human leukocyte antigen-DR*
HMT	**histone méthyl-transférase**
HOM-C	*homeobox complex*
HOTAIR	*HOX transcript antisense intergenic RNA*
HOTTIP	*HOXA transcript at the distal tip*
HOX	*homeobox gene*
HP1	*heterochromatin protein 1*
HPC2	*human polycomb protein 2*
HSF1	*heat shock factor 1*
Hsp70	*heat shock protein 70*
HXR9	*hexapeptide arginin 9*
IL	*interleukine*
ING5	*inhibitor of growth 5*
INO80	*inositol requiring 80*
ISWI	*imitation SWI*
ITD	*internal tandem repeat*
Jmjc	*jumonjiC*
KAT6A	*lysine acetyltransferase 6A*
KMD	*lysine demethylase*
K-RAS	*kirsten-ras*
Lab	*labial*
LAM	**leucémie aiguë myéloblastique**
LEDGF	*lens epithelium-derived growth factor*
LIM	*lin11*, *isl-1*, *mec-3*
Lin	*lineage*
LMO2	*LIM domain only 2*
LMPP	*lymphoid primed multipotent progenitors*
LSD1	*lysine specific demethylase 1*
MafB	*v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*
MafK	*v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K*
MAPKs	*mitogen-activated protein kinases*
MBD	*methyl-CpG binding proteins*
MBM	*Menin binding motif*
MBT	*malignant brain tumor*

M-CSF	*macrophage-colony stimulating factor*
MEIS1	*myeloid ecotropic viral integration site 1*
MEN1	*multiple endocrine neoplasia-type 1*
MEP	*megakaryocyte-erythroid progenitors*
miARN	microARN
MIM	motif d'interaction avec MEIS1
MIP1-α	*macrophage inflammatory protein-1 alpha*
MLL	***mixed lineage leukemia***
MLP	*multilymphoid progenitors*
MOF	*male-absent on the first*
MORF	*MOZ-related factor*
MOZ	***monocytic leukaemia zinc finger protein***
MPP	*multipotent progenitors*
MSK1	*mitogen- and stress-activated protein kinase 1*
MYH11	*myosin heavy chain 11*
MYST	MOZ, Ybf2, Sas3, Sas2 et TIP60
NCOA	*nuclear receptor co-activator*
NEMM	*N-terminal part of Enok, MOZ or MORF*
NF-κB	*nuclear factor-kappa B*
Nrf2	*nuclear factor-erythroid 2 p45 subunit-related factor 2*
NK	*natural killer*
N-RAS	*neuroblastoma-Ras*
NUP98	*nucleoporin 98*
NuRD	*nucleosome remodeling and deacetylation*
OCT4	*octamer 4*
OMS	organisation mondiale de la santé
ORC1	*origin recognition complex 1*
PABP	*poly(A) binding proteins*
PAFc	*polymerase-associated factor complex*
PAP	*polyadenylation polymerase*
Pax-5	*paired box-5*
pb	*proboscipedia* ou paire de base
PBX	*pre-B-cell leukemia homeobox*
PCAF	*P300/CBP-associated factor*
PFI	*polyadenylation factor I*
PHD	*plant homology domain*
PhoRC	*pleiohomeotic repressive complex*
PIC	*pre-initiation complex*
PID	*PBX interacting domain*
piARN	*piwi-interacting RNA*
PLZF	*promyelocytic leukemia zinc finger*
PML	*promyelocytic leukemia protein*
PRC	*polycomb repressive complex*
pta1	*pre-tRNA accumulation 1*
PTD	*partial tandem duplication*
P-TEFB	*positive transcription elongation factor*

RARα	*retinoic acid receptor alpha*
RARE	*retinoic acid response element*
Ras	*rat sarcoma viral oncogen*
RBBP5	*retinoblastoma-binding protein-5*
RUNX1	*runt-related transcription factor 1*
RXR	*retinoid X receptor*
Sas	*something about silencing*
SCA-1	*stem cell antigen-1*
SCF	*stem cell factor*
SCMH1	*sex comb on midleg homolog 1*
SCL	*stem cell leukemia*
SCR	*sex combs reduced*
SDF-1	*stromal derived factor-1*
SEPT6	*septin 6*
SET	*su(var)$_{3\text{-}9}$,* e(z)*, trithorax*
Sin3	*switch independent 3*
siRNA	*small interfering RNA*
SOX2	*SRY-box 2*
Spi-1/PU.1	*spleen focus forming virus proviral integration site-1/purine rich box.1*
SRY	*sex determining region Y*
SSU72	*suppressor of sua7-1 clone 2*
Suv39	*suppressor of variegation 3-9*
SWI/SNF	*switching defective/sucrose non fermenting*
Symplekin	***sigma upsilon mu pi lambda epsilon kappa epsilon iota nu***
TAC1	*trithorax acetylation complex*
$TAF_{II}250$	*TBP-associated factor of 250 kDa*
TALE	*three amino-acid loop extension*
TAL1	*T-cell acute lymphocytic leukemia 1*
tbx1	*T-box DNA binding transcription factor 1*
TEL	*translocation-ETS-leukemia*
TET	*ten-eleven translocation*
TF	*transcription factor*
TGF-β	*transforming growth factor-beta*
TIF2	*transcriptional intermediary factor 2*
TIP60	*HIV-1 Tat interacting protein 60 kDa*
TPO	thrombopoïétine
ubx	*ultrabithorax*
VCAM1	*vascular cell-adhesion molecule 1*
WDR5	*WD repeat protein-5*
Win	*WDR interaction*
Wnt	*wingless-type MMTV integration site*
Xlox	*xenopus laevis homeobox*
Ybf2	*yeast binding factor 2*

ZO	*zonula occludens*
ZONAB	*ZO-1-associated nucleic acid binding*

Liste des figures

Figure 1 : Modèles d'auto-renouvellement des CSH. ……...… 5

Figure 2 : Différents modèles de la différenciation hématopoïétique. …….. 6

Figure 3 : Les niches hématopoïétiques endostéale et vasculaire. …… 8

Figure 4 : Principaux facteurs de transcription impliqués dans le maintien des CSH, et dans les principales voies de différenciation. ……. 12

Figure 5 : Modèle de clonalité hétérogène. ……... 14

Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation génomique des *clusters* des gènes *HOX* chez les Mammifères. ……..……... 16

Figure 7 : Représentation schématique des ARN et des protéines HOXA9 et HOXA9T. ……... 17

Figure 8 : Représentation de la structure en trois dimensions de l'homéodomaine et de son interaction avec l'ADN. …….. 17

Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation génomique des *clusters* des gènes *HOX* chez les Mammifères et patron d'expression embryogénique. ……18

Figure 10 : Phénotypes hématopoïétiques liés à l'invalidation ou à la surexpression des gènes *Hox* chez la Souris. …….……... 19

Figure 11 : Représentation schématique du contrôle de l'expression des gènes *HOX*. ….24

Figure 12 : Représentation schématique de l'origine des *clusters* HOX et ParaHOX. ….26

Figure 13 : Les différents degrés de compaction de l'ADN au sein du noyau. ……31

Figure 14 : Photographie au microscope électronique d'un noyau d'une cellule de moelle osseuse. ……... 31

Figure 15 : Représentation schématique du nucléosome. ……. 32

Figure 16 : Enchaînement de nucléosomes dans une structure en « collier de perles ». ... 32

Figure 17 : Dérégulation de la méthylation de l'ADN et lien avec le cancer. ……...34

Figure 18 : Acétylation et désacétylation d'une lysine (Lys) d'une histone. …… 37

Figure 19 : Méthylations d'une lysine (Lys) d'une histone. ……..39

Figure 20 : Déméthylation d'une lysine mono-méthylée d'une histone par LSD1. ……..40

Figure 21 : Déméthylation d'une lysine mono-méthylée d'une histone par JHDM (protéine possédant un domaine JmjC). ……. 40

Figure 22 : Représentation schématique de la coopération entre les modifications d'histones à la base de la théorie du « code histone ». ……... 41

Figure 23 : Différents modèles afin d'expliquer l'hérédité des modifications épigénétiques. ……. 42

Figure 24 : Représentation schématique de la protéine MOZ humaine. ……... 44

Figure 25 : Représentation schématique du complexe tétramérique de MOZ. ……. 47

Figure 26 : Représentation schématique de la protéine MOZ humaine et des protéines de fusion de MOZ. ……. 53

Figure 27 : Images d'hémophagocytose par des blastes porteurs d'une translocation de MOZ sur un myélogramme. ……... 53

Figure 28 : Représentation schématique de la protéine MLL. …….. 56

Figure 29 : Représentation schématique du complexe « cœur » de MLL. ……. 57

Figure 30 : Fréquences des différentes translocations de MLL. ……. 62

Figure 31 : Exemples de structures des protéines de fusion impliquant MLL. ……. 62

Figure 32 : Mécanisme de leucémogenèse des protéines de fusion impliquant MLL et des membres du complexe de super-élongation. ……. 63

Figure 33 : Les patrons d'expression des leucémies impliquant MOZ et MLL sont proches. ……... 67

Figure 34 : Réprésentation schématique des protéines Symplekin et Pta1. …….. 95

Figure 35 : Principales étapes de la polyadénylation chez les Mammifères. …… 95

Figure 36 : Membres des complexes de polyadénylation chez le Mammifère et la Levure. ……. 96

Figure 37 : Coordination entre la transcription et la polyadénylation. ……..98

Figure 38 : Modèle de la coopération entre MOZ et MLL dans l'activation de l'expression des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9*. ……. 135

Table des matières

Citation …… i

Remerciements …… ii

Résumé …….. iv

Summary ……... v

Liste des abréviations ……... vi

Listes des figures ……..……xii

……

Introduction …….. 1

A. L'hématopoïèse et la leucémogenèse ……..... 3

I. Généralités ……..3

II. La hiérarchie hématopoïétique : les CSH au sommet …….....3

III. Le contrôle de l'hématopoïèse …… 7

1. La voie extrinsèque : le rôle de la niche ……8

2. La régulation intrinsèque : les facteurs de transcription ……12

IV. Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) …….. 13

1. Généralités …….....13

2. Altérations génétiques à l'origine des leucémies aiguës …… 13

3. Les cellules souches leucémiques (CSL) ……... 14

B. les gènes *HOX* ……..... 16

I. Les gènes *homeobox* ou les gènes à boîte homéotique …….....……16

II. Structure du gène *HOXA9* ……..... 17

III. Les différentes fonctions des gènes *HOX* ……..... 18

1. Rôle des gènes *HOX* dans le développement …… 18

2. Rôle des gènes *HOX* durant l'hématopoïèse ……..... 19

3. Rôle des gènes *HOX* dans la leucémogenèse des LAM ……20

IV. Mode d'action des protéines HOX à travers leurs interactions …… 21

1. PBX 22

2. MEIS1 23

V. Le contrôle de l'expression des gènes *HOX* 24

1. Le système endocrinien 24

a. l'acide rétinoïque 24

b. Le FGF 25

c. La voie Wnt 25

2. Les facteurs de transcription 26

a. CDX 26

b. RUNX1 27

3. La régulation épigénétique 27

a. Les ARN non codants 27

b. Les modifications de la chromatine 28

C. L'épigénétique 30

I. La structure de la chromatine 31

1. Généralités 31

2. Le nucléosome 32

3. Les histones 32

II. Les différents mécanismes de régulation épigénétique 33

1. Les modifications de l'ADN 33

2. Les variants d'histones 34

3. Le remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP 35

4. Les ARN non codants 35

5. Les modifications post-traductionnelles des histones 36

a. L'acétylation des lysines 36

b. La méthylation des lysines 39

6. Le « code des histones » 40

7. L'hérédité cellulaire des marques épigénétiques 41

D. MOZ ET MLL, deux enzymes épigénétiques impliquées dans le contrôle de l'expression des gènes *HOX* **43**

I. MOZ, Monocytic leukaemia zinc finger protein **43**

1. Généralités **43**

a. La famille MYST **44**

b. Organisation de la protéine MOZ **44**

2. Modèles murins d'invalidation de MOZ **46**

3. MOZ est une histone acétyl-transférase **47**

a. MOZ possède une activité HAT in vitro et in vivo **47**

b. Le complexe tétramérique de MOZ **47**

4. MOZ est un activateur transcriptionnel **48**

a. RUNX1 ..... **48**

b. Spi-1/PU.1 ..... **48**

c. P53 ..... **49**

d. RUNX2 ..... **49**

e. NF-kB **50**

f. Nrf2/MafK **50**

g. ETV6 ..... **50**

h. c-Jun **50**

i. Rôle des activités HAT dans la co-activation transcriptionnelle **50**

5. Rôle de MOZ dans l'embryogenèse **51**

6. Rôle de MOZ dans l'hématopoïèse **52**

7. Rôle de MOZ dans la leucémogenèse **53**

a. Réarrangements chromosomiques associés à MOZ **53**

b. Mode d'action des protéines de fusion de MOZ **53**

c. Profils d'expression génique dans les LAM impliquant MOZ **55**

II. MLL, Mixed Lignage Leukemia **55**

1. Organisation de MLL **55**

2. MLL est une HMT nécessitant son complexe «cœur» ……...56

3. Autres partenaires protéiques de MLL …….....58

a. Menin et LEDGF ……...58

b. Association avec des HAT ……..... 58

c. Association avec des facteurs de transcription ……..... 59

d. Association avec des répresseurs transcriptionnels …….....59

e. Association avec Cyp_{33} ……..... 59

4. Rôle de MLL dans le développement, l'hématopoïèse et l'activation transcriptionnelle des gènes *Hox* …….....59

a. Modèles murins d'invalidation totale ou partielle de Mll ……..... 59

b. Démonstration du rôle de MLL sur l'expression des gènes HOX par l'utilisation d'autres modèles ……..... 61

5. Rôle de MLL dans la leucémogenèse …….....62

a. Généralités ……..... 62

b. Activité moléculaire des protéines de fusion impliquant MLL 63

c. Fonctions biologiques des protéines de fusion contenant MLL 64

d. Les gènes HOX et leurs co-facteurs sont des gènes clefs de la leucémogenèse impliquant des anomalies de MLL ……..... 65

Résultats …… 66

A. Identification d'une association fonctionnelle entre les deux onco-protéines MOZ et MLL activant la transcription des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9* dans les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques humaines …… 67

Résumé …… 67

B. La Symplekin, un membre de la machinerie de polyadénylation interagit avec MOZ et MLL, bloquant ainsi leur activité au niveau du promoteur du gène *HOXA9* dans les cellules hématopoïétiques humaines …… 94

Introduction sur la Symplekin …… 94

1. Généralités ……..... 94

2. Rôle de Pta1 dans la polyadénylation des ARN chez la Levure …….....**96**

3. Rôle de la Symplekin dans la polyadénylation chez le Mammifère ……...**96**

4. Coordination entre transcription et polyadénylation ……..... **97**

5. Possibilité pour la Symplekin d'agir en tant que co-régulateur transcriptionnel, indépendamment de la polyadénylation …… **98**

Résumé …… **99**

Discussion et Perspectives ……**134**

A. MOZ et MLL coopèrent dans la régulation des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9* ……...……. **135**

I. MOZ active directement l'expression des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9* ……. **135**

II. Une coopération fonctionnelle réciproque existe entre MOZ et MLL ……...……. **135**

III. D'autres protéines sont impliquées dans la coopération entre MOZ et MLL **138**

IV. Rôle de la coopération entre MOZ et de MLL dans la différenciation hématopoïétique et dans les leucémies associées à ces protéines ...…… **138**

B. Discussion et perspectives sur l'association entre MOZ, MLL et la Symplekin …… **139**

I. La Symplekin est nécessaire à la polyadénylation de l'ARN *Hoxa9* ……**139**

II. La Symplekin empêche le recrutement de MOZ et de MLL au niveau du promoteur du gène *HOXA9* ……..... **140**

III. Coordination entre la transcription et les différentes étapes de la maturation des ARN ……..**142**

C. Conclusion ……..... **143**

Annexes …….....**147**

Références bibliographiques ……..... **187**

INTRODUCTION

Introduction

L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse s'intéresse à la régulation génique au sens large, dans un contexte d'hématopoïèse et de leucémogenèse.

Mon travail de thèse a consisté à caractériser le rôle des protéines MOZ et MLL, deux enzymes modifiant les histones et impliquées dans l'hématopoïèse et la leucémogenèse, capables d'activer la transcription de nombreux gènes, notamment des gènes *HOX*.

L'hématopoïèse est un processus actif, ordonné, et hautement régulé faisant intervenir des étapes de prolifération, de différenciation et d'apoptose et permettant la production de toutes les cellules sanguines matures à partir d'un nombre restreint de cellules souches hématopoïétiques. La dérégulation des mécanismes intervenant dans l'hématopoïèse induit le développement d'hémopathies, notamment de leucémies. Ainsi, la première partie de l'introduction traitera de l'hématopoïèse et de la leucémogenèse. Dans la deuxième partie de l'introduction, l'état actuel des connaissances sur les gènes *HOX*, particulièrement *HOXA9* sera détaillé. L'épigénétique étant un des mécanisme impliqué dans la régulation des gènes *HOX* par MOZ et MLL, la troisième partie de ce manuscrit sera consacrée à ce domaine. Enfin, la dernière traitera des connaissances sur MOZ et MLL.

A. L'hématopoïèse et la leucémogenèse

I. Généralités

L'hématopoïèse (du grec *αἷματος* [*aïmatos*] qui signifie « sang » et ποιήσις [*poiêsis*] qui veut dire « création ») est un processus actif, ordonné, et hautement régulé ayant pour but de maintenir l'homéostasie des cellules sanguines. L'hématopoïèse fait intervenir des étapes de prolifération, de différenciation et d'apoptose permettant la production et le renouvellement continu de toutes les cellules sanguines matures (lymphocytes, granulocytes [polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles], monocytes, hématies et plaquettes) à partir d'un nombre très restreint de cellules dites immatures.

Le nombre de cellules sanguines matures est très élevé, de l'ordre de 25 000 milliards d'hématies, 200 à 500 milliards de plaquettes et 4 à 11 milliards de leucocytes. La durée de vie de ces cellules est limitée : 120 jours pour les hématies, 7 à 10 jours pour les plaquettes et 1 à 3 jours environ pour les polynucléaires neutrophiles. Afin d'assurer leur renouvellement, l'hématopoïèse génère de façon quotidienne 250 milliards d'hématies, 150 milliards de plaquettes et 100 milliards polynucléaires neutrophiles.

Chez l'Homme adulte, l'hématopoïèse se déroule dans la moelle osseuse des os courts, des os plats et dans l'épiphyse des os longs (soit 20% au niveau du crâne, 30% du thorax [sternum, côtes, vertèbres, clavicules, omoplates], 40% du rachis lombaire et de la ceinture pelvienne [sacrum, os iliaques] et 10% des fémurs) alors que chez le fœtus, les sites varient durant le développement, les organes hématopoïétiques principaux étant la rate et le foie. La masse des cellules de la moelle osseuse représente 4 à 5% de la masse corporelle.

II. La hiérarchie hématopoïétique : les CSH au sommet

La différenciation hématopoïétique se déroule selon un modèle hiérarchique faisant intervenir des étapes successives correspondant à une restriction progressive des potentialités cellulaires. Quatre compartiments cellulaires sont décrits, les cellules souches hématopoïétiques (CSH), les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures.

L'ensemble des cellules sanguines matures (ou différenciées) provient d'une population très limitée de cellules médullaires pluripotentes appelées **les cellules souches hématopoïétiques**. En 1951, Jacobson et ses collaborateurs observèrent qu'en protégeant la rate d'une souris irradiée à dose létale, celle-ci survivait en conservant une hématopoïèse efficace (Jacobson *et al.,* 1951). La même année, Lorenz et ses collègues démontrèrent que l'injection de cellules de moelle osseuse chez une souris irradiée permettait une reconstitution hématopoïétique (Lorenz et Congdon 1954). Dix ans plus tard, Till et McCulloch (Till et McCulloch 1961; Becker *et al.,* 1963) observèrent après la greffe de moelle osseuse de souris irradiées, la formation de colonies hématopoïétiques dans la rate qu'ils dénommèrent CFU-S (*colony forming unit in the spleen*). Ces colonies sont composées des cellules des différents lignages érythrocytaire, granulocytaire et mégacaryocytaire. De plus, l'injection d'une colonie splénique à une nouvelle souris irradiée conduit à la reconstitution de son hématopoïèse. Ces différents travaux ont démontré l'existence d'une population cellulaire médullaire pluripotente capable de se différencier en cellules de l'ensemble des lignages hématopoïétiques et de s'auto-renouveler. Depuis lors, de multiples études ont caractérisé les CSH mais leur secret n'est pas encore totalement révélé. Néanmoins, il a été démontré que les CFU-S sont formées à partir de cellules progénitrices et non de CSH (Na Nakorn *et al.,* 2002).

Les CSH proviennent des précurseurs mésodermaux embryonnaires, appelés hémangioblastes, qui ont la double capacité de donner des cellules endothéliales et des CSH (Lancrin *et al.,* 2009).

Chez l'adulte, il a été démontré que seule une minorité des CSH était en phase active de prolifération et de différenciation. **La majorité des CSH sont quiescentes**, c'est-à-dire en phase G0 du cycle cellulaire. Ceci explique leur relative résistante aux radiations ionisantes et aux agents chimiothérapeutiques. Il est classique de distinguer les CSH en deux groupes fonctionnels : les CSH-LT (*CSH à long terme*) qui en situation de greffe reconstituent l'hématopoïèse à long terme et les CSH-CT (*CSH à court terme*) qui reconstituent l'hématopoïèse les huit premières semaines suivant la greffe (Spangrude *et al.,* 1988). Ces deux populations sont pluripotentes mais présentent une différence au niveau de leur potentiel d'auto-renouvellement qui est plus limité pour les CSH-CT que pour les CSH-LT. Un troisième groupe a été récemment identifié. Il s'agit des CSH-TI (CSH à terme intermédiaire) capables de reconstituer l'hématopoïèse pendant six à huit mois (Benveniste *et al.,* 2010). Les CSH ne sont pas reconnaissables morphologiquement. **Afin de les identifier phénotypiquement, différents**

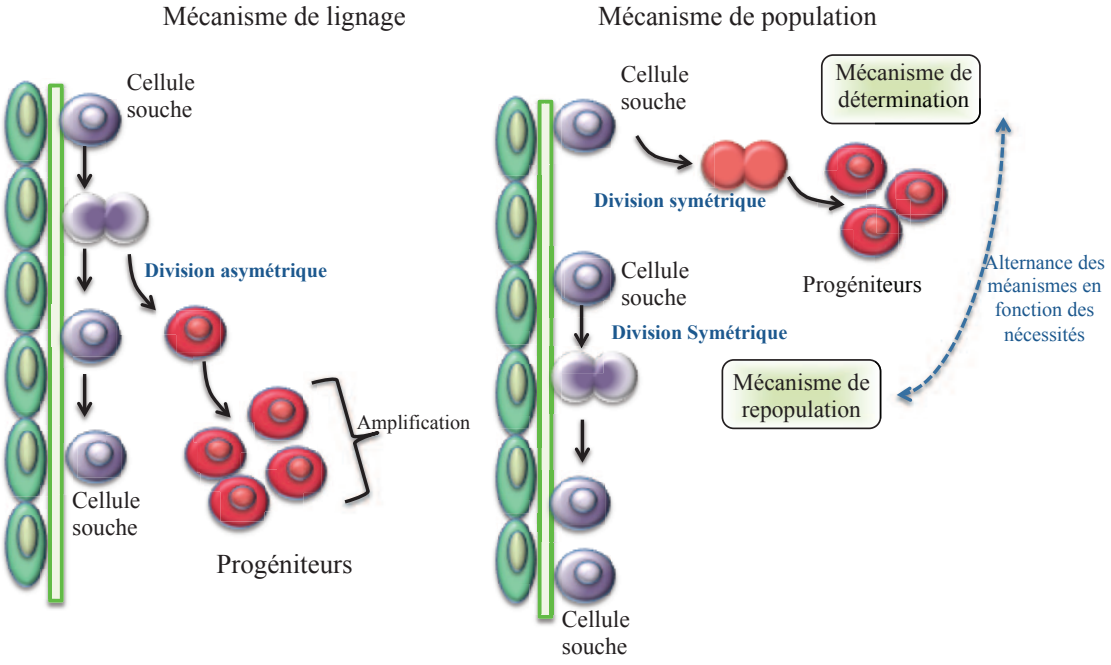


Figure 1 : Modèles d'auto-renouvellement des CSH.

Dans le modèle de lignage, la division des CSH donne naissance à deux cellules qui vont évoluer vers des destins différents.
Dans le modèle de population, la CSH se multiplie en cellules identiques. Lors d'un stress cellulaire, les CSH sont amplifiées de cette manière

(D'après Spradling et al., 2001)

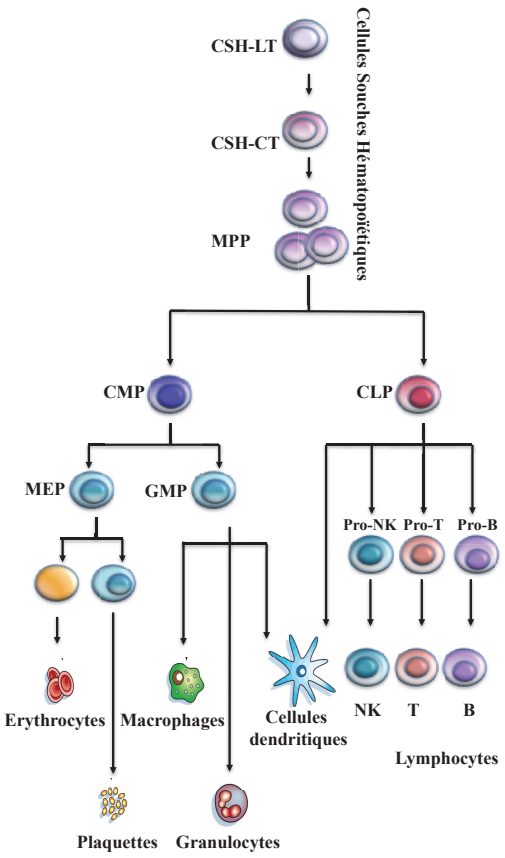
profils de marqueurs membranaires ont été proposés et sont actuellement largement utilisés. Cependant, aucun ne permet de caractériser formellement la CSH la plus primitive. Chez l'Homme, le marqueur de surface le plus utilisé dans le cadre clinique et au laboratoire pour la purification des CSH est la sialomucine ou marqueur CD34 (*cluster of differentiation 34*). Son expression membranaire est d'autant plus forte que les CSH sont primitives. Or, la population $CD34^+$ est hétérogène et contient aussi des cellules déjà engagées dans une voie de différenciation. Irving Weissman et ses collaborateurs identifient les CSH humaines grâce à l'ensemble des marqueurs membranaires suivants : exclusion des marqueurs de différenciation (Lin^- pour *Lineage negative*), des marqueurs CD38 et CD45RA combinés à une forte expression des marqueurs CD34 et CD90 (cellules Lin^-, $CD34^+$, $CD38^-$, $CD45RA^-$, $CD90^+$) (Majeti *et al.,* 2007). Les travaux de l'équipe de John Dick ont récemment rapporté que l'ajout du marqueur CD49f permettait de distinguer les CSH des progéniteurs multipotents (MPP *: multipotent progenitor*) (Notta *et al.,* 2011). En ce qui concerne l'hématopoïèse murine, le marqueur CD34 n'est pas pertinent. Il est classique d'isoler les CSH à partir des marqueurs suivant : c-kit^+, Sca-1^+ (*stem cell antigen-1*), Lin^-, $CD90^{low}$, $CD45^+$, $CD150^+$, $CD48^-$, $CD244^-$ associés ou pas à un marquage avec des fluorochromes métaboliques.

Deux modèles ont été proposés afin d'expliquer l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH. **Le premier modèle, dit « de lignage », est celui de la division asymétrique** des cellules souches. Celles-ci, en se divisant, donnent naissance à deux cellules filles dont la destinée est différente. L'une des cellules filles conserve le caractère « souche », en maintenant le contact avec la niche, alors que la seconde s'engage dans une voie de différenciation. **Le second modèle, dit « de population », propose une division symétrique** des cellules souches, correspondant après division à l'apparition de deux cellules souches ou deux cellules filles engagées (Spradling *et al.,* 2001) (Figure 1). La division asymétrique est vraisemblablement le mécanisme par lequel les cellules souches se renouvellent dans des conditions normales (Wilson et Trumpp 2006). Cependant, seul le mécanisme de division symétrique peut expliquer l'amplification du compartiment des cellules souches observée dans des situations de stress. Ainsi, il est probable que ces deux mécanismes cohabitent.

Le deuxième compartiment cellulaire hématopoïétique contient les **progéniteurs.** Il regroupe une population hétérogène de cellules plus ou moins matures, présentant des propriétés de différenciation variables et une prolifération importante. Il s'agit des progéniteurs immatures qui possèdent une grande capacité de prolifération et sont multipotents et des

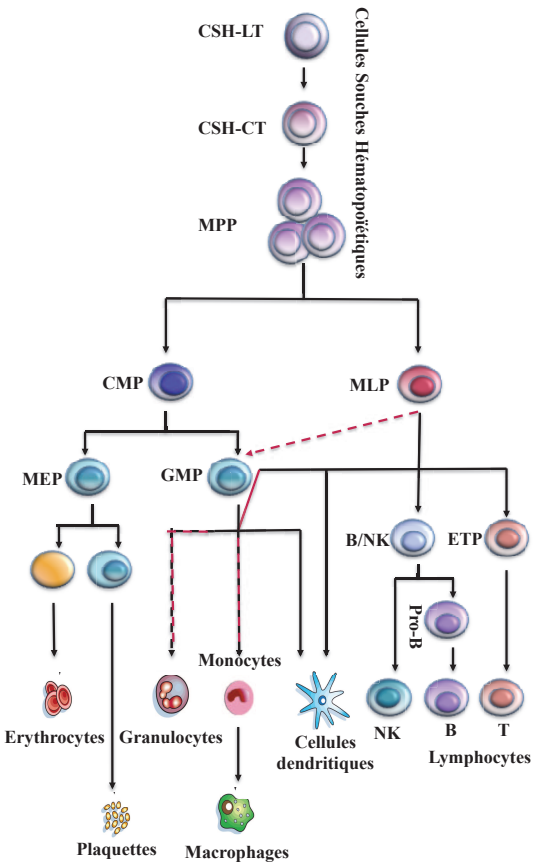
Modèles de la différenciation hématopoïétique

A selon Irving Weissman



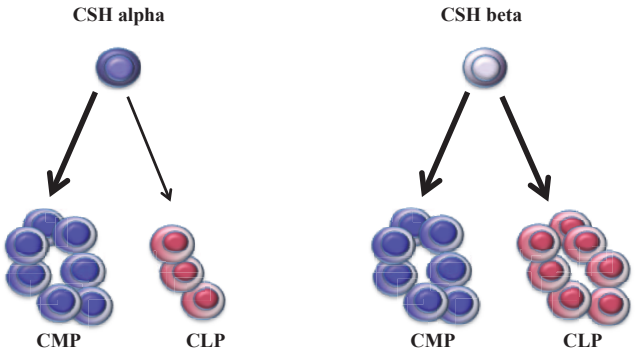
(Adapté de Reya et al., 2001)

B selon John Dick



(Adapté de Doulatov et al., 2012)

C **Modèle de l'hétérogénéité des CSH**



(Adapté de Benz et al., 2012)

Figure 2 : Différents modèles de la différenciation hématopoïétique.

progéniteurs matures qui ont un potentiel de prolifération plus réduit et une différenciation plus restreinte.

Le troisième compartiment comprend les **précurseurs** qui sont des cellules engagées dans la différenciation vers un lignage cellulaire, identifiables morphologiquement et caractérisés par des marqueurs membranaires spécifiques.

Enfin, le quatrième compartiment contient les **cellules matures et fonctionnelles**, qui en traversant les cellules endothéliales rejoignent la circulation sanguine.

Irving Weissman a été le premier à décrire une organisation hiérarchique de la différenciation hématopoïétique (Reya *et al.,* 2001). Dans ce modèle (Figure 2A), les CSH donnent des progéniteurs multipotents (MPP) ayant perdu la capacité d'auto-renouvellement (Morrison *et al.,* 1997). Ces MPP se différencient en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP, *common lymphoid progenitors*) qui génèrent l'ensemble des cellules du lignage lymphoïde (Kondo *et al.,* 1997), ou en progéniteurs myéloïdes communs (CMP, *common myeloid progenitors*) correspondant aux colonies de type CFU-GEMM (CFU-*granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte*), qui produisent l'ensemble des cellules du lignage érythro-myéloïde (Akashi *et al.,* 2000). Les CMP donnent d'autres progéniteurs tels que les progéniteurs granulo-monocytaires (GMP, *granulocyte-macrophage progenitors*) et érythro-mégacaryocytaires (MEP, *megakaryocyte-erythroid progenitors*). Les GMP, correspondant aux colonies de type CFU-GM (*CFU- granulocyte, monocyte*), forment les progéniteurs monocytaires (colonies de type CFU-M, *CFU-monocyte*) et granulocytaires (colonies de type CFU-G, *CFU-granulocyte*) qui produisent respectivement les précurseurs des monocytes/macrophages et des polynucléaires. Les MEP forment les progéniteurs mégacaryocytaires (colonies de type BFU-Mk, *burst forming unit-megakaryocyte*, puis CFU-Mk) et érythroïdes (colonies de type BFU-E, *BFU-erythroid*) qui génèrent respectivement les précurseurs des plaquettes et les hématies.

Ce modèle est caractérisé par des décisions binaires au niveau des progéniteurs qui restreignent leur multi-potentialité au cours des différenciations successives, la divergence lymphoïde/myéloïde apparaissant très précocement. **Des modèles alternatifs ont été proposés et discutés**. En effet, il a été décrit chez la Souris des progéniteurs ayant des capacités lymphoïdes et myéloïdes appelées LMPP (*lymphoid primed multipotent progenitors*) (Adolfsson *et al.,* 2005). Ces progéniteurs sont capables d'assurer la formation de toutes les

cellules lymphocytaires, mais également des cellules myéloïdes, les monocytes et les granulocytes. Ils sont dépourvus de capacité de différenciation érythroïde et mégacaryocytaire. Chez l'Homme, Doulatov et ses collaborateurs mirent en évidence que les colonies issues de la culture de progéniteurs lymphoïdes donnent toujours naissance à des cellules myéloïdes, et que la greffe de ces cellules dans des souris est capable de former des cellules lymphoïdes mais aussi des monocytes (Doulatov *et al.,* 2010; Doulatov *et al.,* 2012). Du fait de l'hétérogénéité de ces progéniteurs, pourvus de capacités de différenciation très variables, les auteurs ont préféré mentionner l'existence de MLP (*multilymphoid progenitors*). Les progéniteurs des lymphocytes B et des cellules NK (*Natural killer*) seraient communs alors que les lymphocytes T ont leur propre progéniteur, les ETP (*Early thymocyte progenitors*) (Figure 2B).

L'idée que les CSH sont homogènes est remise en cause depuis de nombreuses années. Des expériences de transplantations d'une cellule unique ont permis de montrer que **les CSH sont hétérogènes concernant leur potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation**. Certaines d'entre elles ont des capacités similaires de différenciation en lignages myéloïdes ou lymphoïdes, tandis que d'autres se différencient plus aisément vers le lignage myéloïde (Figure 2C). Ces différences pourraient s'expliquer par un programme épigénétique différent (Benz *et al.,* 2012; Copley *et al.,* 2012; Muller-Sieburg *et al.,* 2012).

III. Le contrôle de l'hématopoïèse

Les mécanismes à l'origine de l'engagement d'une cellule souche dans une des voies de différenciation hématopoïétique ne sont pas encore totalement élucidés. Deux modèles sont proposés pour rendre compte de cet engagement (D'Andrea 1994). **Le premier modèle, dit « instructif »**, postule que le micro-environnement médullaire a un rôle déterministe sur la cellule souche par l'intermédiaire de facteurs de croissance et d'interactions cellulaires. Dans ce modèle, la cellule reçoit de l'extérieur, de façon extrinsèque, un ou des signaux qui vont déclencher le programme génétique de différenciation. **Le second modèle, dit « stochastique »**, suppose que ces étapes se déroulent en absence de tout signal extérieur, de façon intrinsèque au programme génétique. Dans ce modèle, les facteurs de croissance ont un rôle « permissif » en apportant à la cellule des signaux de prolifération et de survie.

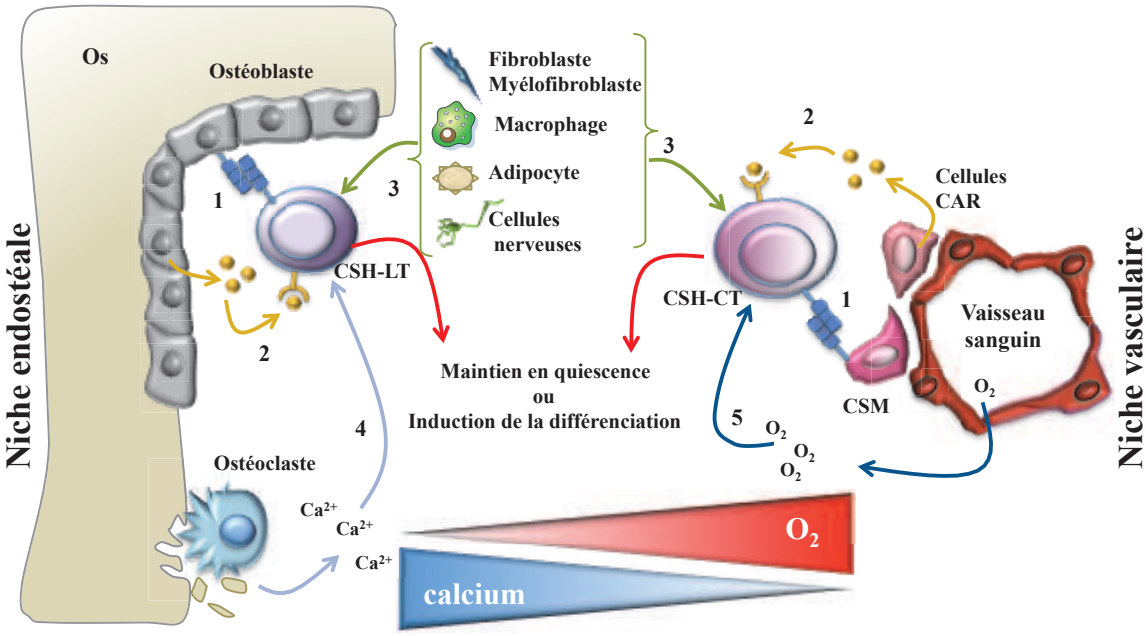


Figure 3 : Les niches hématopoïétiques endostéale et vasculaire.

La niche endostéale est principalement composée d'ostéoblastes et d'ostéoclastes, alors que la niche vasculaire comprend des CSM et des cellules CAR. Des signaux moléculaires présentés à la membrane des cellules (1) ou sécrétés (2) sont intégrés par la CSH par le biais de récepteurs spécifiques. Certains composants cellulaires communs aux deux niches sont présents (3). Enfin, les taux de calcium (4) et d'oxygène (5) influencent également le maintien et le devenir des CSH.

1. La voie extrinsèque : le rôle de la niche

Les cellules souches hématopoïétiques résident dans la moelle osseuse des os longs, au niveau des travées osseuses. Le tissu médullaire hématopoïétique, d'origine conjonctive, est situé entre les lamelles d'os spongieux, séparé de l'os par l'endoste fortement vascularisé. Les cellules matures s'échappent de la moelle osseuse par un mécanisme actif à travers les sinus veineux. Les cellules hématopoïétiques sont disposées dans une trame de tissu de soutien conjonctif. Le micro-environnement ou stroma médullaire est composé de cellules stromales et d'une matrice extra-cellulaire. Son rôle est d'assurer la nutrition des cellules hématopoïétiques mais également de contrôler leur développement et leur détermination. La disposition spatiale particulière des cellules stromales qui permet une association étroite avec les CSH est appelée niche hématopoïétique. Dès 1978, Ray Schofield apporta cette notion de niche hématopoïétique en émettant l'hypothèse de l'existence de cellules à proximité des CSH, ayant la capacité d'exercer une influence sur leur fonctionnement (Schofield 1978). Aujourd'hui encore, la localisation précise des CSH dans la moelle osseuse est sujette à débat (Ehninger et Trumpp 2011). Deux types de niches ont été décrites, la niche vasculaire et la niche endostéale (Figure 3).

Dans la **niche endostéale,** les CSH se localisent à proximité des ostéoblastes qui bordent l'endostéum osseux (Zhang *et al.,* 2003). Dans la **niche périvasculaire**, les CSH sont situées de façon plus centrale, au niveau des vaisseaux sanguins en interaction avec les cellules endothéliales (Kiel *et al.,* 2005). Un rôle fonctionnel différent des niches est envisagé puisque la niche endostéale contiendrait la majorité des CSH quiescentes alors que la niche périvasculaire accueillerait principalement les CSH avec un fort potentiel d'auto-renouvellement (Wilson et Trumpp 2006; Kubota *et al.,* 2008).

Les **ostéoblastes** sont les cellules principales de la niche endostéale. Ils sont connus à l'origine pour leur rôle dans la reconstruction osseuse. Cependant, il a été rapporté que leur déplétion au niveau de la moelle osseuse provoquait une migration des CSH vers la rate (Visnjic *et al.,* 2004). Il est désormais démontré que les ostéoblastes produisent différents facteurs impliqués dans le maintien et la quiescence des CSH et sont donc des régulateurs importants de celles-ci. Les CSH expriment un récepteur à l'ion calcium dont le rôle est primordial pour le maintien des CSH dans la niche endostéale. Ce récepteur permet à la CSH de détecter le gradient de calcium provoqué lors du remodelage osseux des **ostéoclastes**

(Adams *et al.,* 2006). Les **fibroblastes** et les **myofibroblastes** médullaires représentent une fraction importante des cellules stromales. Ces cellules maintiennent l'hématopoïèse *in vitro* (Moreau *et al.,* 1993). Les fibroblastes médullaires produisent un grand nombre de protéines entrant dans la constitution de la matrice extracellulaire. Les **adipocytes** médullaires sont relativement similaires aux adipocytes extramédullaires. Leur fonction dans la moelle osseuse n'est pas très bien définie, mais ils semblent avoir un rôle important dans l'hématopoïèse. Ces cellules constituent une réserve en métabolites énergétiques nécessaires à l'hématopoïèse. Leur déplétion au sein de la moelle osseuse a révélé qu'elles ont une action inhibitrice sur les fonctions des CSH (Naveiras *et al.,* 2009).

Une seconde niche a été décrite, localisée près des vaisseaux sanguins : la niche périvasculaire. Les **cellules endothéliales** qui composent la paroi des vaisseaux sanguins en représentent un des constituants. La délétion de leur récepteur gp130 provoque une diminution du nombre de CSH (Yao *et al.,* 2005). Plus récemment, les **Cellules Souches Mésenchymateuses** (CSM) ont été associées à cette niche. Ces cellules sont les précurseurs des ostéoblastes, des adipocytes et des chondrocytes. Elles sont localisées à proximité des vaisseaux sanguins. Le marqueur membranaire, la nestine a été décrit comme spécifique de ces cellules et permet leur localisation au niveau médullaire. Les CSM participent activement au rôle de la niche périvasculaire dans le contrôle des fonctions et du maintien des CSH. De façon remarquable, la niche périvasculaire participe également à la maturation des CSM. Ainsi, les CSH et les CSM partagent la même niche (Mendez-Ferrer *et al.,* 2010). Les **progéniteurs mésenchymateux** exprimant fortement la cytokine CXCL12 (*CXCL12-abundant reticular cells : CAR cells*) sont également des cellules importantes de la niche périvasculaire (Omatsu *et al.,* 2010).

Certains **macrophages** sont des composants actifs de la niche hématopoïétique. Leur absence entraîne une recirculation sanguine des CSH. Ils agiraient directement sur les ostéoblastes et les CSM (Winkler *et al.,* 2010; Chow *et al.,* 2011).

De plus, certains travaux indiquent que le **système nerveux central sympathique** influence la mobilisation des CSH. Une déficience en enzyme UDP-galactose céramide galactosyl-transférase, essentielle à la myélinisation nerveuse, empêche la mobilisation des CSH après traitement au G-CSF. L'ablation chimique des neurones noradrénergiques conduit aux mêmes résultats (Katayama *et al.,* 2006).

Les **composants moléculaires** de la niche sont nombreux, et peuvent être liés à la membrane des cellules qui composent les niches ou être sécrétés dans le milieu. Les cellules productrices de ces molécules ne sont pas toujours identifiées ou sont multiples, ce qui contribue à la difficulté de l'étude de ces facteurs. Parmi ces molécules, il faut citer les **composants de la matrice extracellulaire** (la laminine, la fibronectine et le collagène de type I, III et IV), **les cytokines** et **les chimiokines**, **les facteurs de croissance**, **les molécules d'adhésion** telle que la N-cadhérine, **les ligands** tels que Wnt (*wingless-type MMTV integration site*), les ligands de Notch, de Flt3 et **l'oxygène.**

Les cytokines sont des glycoprotéines produites principalement par les cellules du stroma médullaire, à l'exception notable de l'érythropoïétine (EPO) surtout sécrétée par les cellules tubulaires proximales rénales. Elles interviennent par fixation spécifique sur des récepteurs de la membrane cellulaire de la cellule cible, induisant la transmission du signal au niveau nucléaire. Les cytokines ont généralement un rôle d'activation de signaux de survie et de prolifération et peuvent agir de concert (Metcalf 2008). Il a récemment été démontré que le M-CSF (*Macrophage-colony stimulating factor*), connu pour son rôle dans la différenciation tardive du lignage myéloïde, cible également les CSH et permet leur engagement précoce dans cette voie de différenciation (Mossadegh-Keller *et al.,* 2013).

Les chimiokines composent une sous-classe de cytokines ayant un pouvoir chimio-attractant. Le SDF-1 (*stromal derived factor-1*), également appelé CXCL12, est la plus remarquable dans les niches. Il agit sur les CSH *via* leur récepteur spécifique CXCR4. SDF-1 est impliquée dans la domiciliation (*homing*) et dans la survie des CSH (Moore *et al.,* 2001; Broxmeyer 2008).

Le récepteur Notch est exprimé par les CSH (Milner *et al.,* 1994). Ce récepteur a plusieurs ligands dont les molécules Delta et Jagged. Ce dernier est exprimé à la surface des ostéoblastes. Initialement décrit comme important dans l'embryogenèse, la voie Notch est activée au cours de la différenciation hématopoïétique. L'activation des ostéoblastes par l'hormone parathyroïdienne provoque une élévation du nombre des CSH, qui s'expliquerait par une augmentation du niveau d'expression de Jagged à la surface des ostéoblastes (Calvi *et al.,* 2003). En sus, l'inhibition de la voie de signalisation de Notch *in vivo* dans des CSH induit une accélération de leur différenciation (Duncan *et al.,* 2005). Un rôle de supresseur de tumeur de cette voie est décrite puisque la délétion de la voie Notch promeut le développement de

leucémie myélomonocytaire chronique (Klinakis *et al.,* 2011). Néanmoins, la double délétion de Jagged et de Notch1 dans la niche hématopoïétique n'a pas d'effet sur les CSH (Mancini *et al.,* 2005). Le rôle précis de la voie Notch et de ses ligands reste donc à élucider.

Les protéines Wnt font partie des rares protéines à être modifiées par liaison à un lipide (Willert *et al.,* 2003). La voie de signalisation Wnt est très complexe. Il existe en effet 19 ligands Wnt, 10 récepteurs et 2 co-récepteurs. De surcroît, l'activation de cette voie se fait soit par la voie de transduction canonique, impliquant l'activation du co-activateur transcriptionnel β-caténine, soit par une voie non canonique associant la signalisation calcique. Le rôle de la voie canonique dans la fonction des CSH est sujette à de nombreuses controverses. En effet, diverses études montrent son implication dans le maintien de la quiescence des CSH, tandis que d'autres résultats indiquent l'inverse (Malhotra et Kincade 2009). Il a récemment été démontré que la voie non canonique participe au maintien des CSH (Sugimura *et al.,* 2012).

Le récepteur Flt3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*), dont le **ligand est le** Flt3, est exprimé par les CSH (Matthews *et al.,* 1991). Des mutations du gène codant pour ce récepteur sont fréquemment trouvées dans différents cas de leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), suggérant son rôle dans l'hématopoïèse. Or, les souris n'exprimant pas ce récepteur n'ont pas de défauts des CSH à l'état stable (Sitnicka *et al.,* 2002). De manière inattendue, les modèles de souris comportant les mutations précédemment identifiées développent un syndrome myéloprolifératif et pas une LAM (Li *et al.,* 2008).

Le TGF-β (*transforming growth factor-beta*) est un répresseur de l'entrée en cycle cellulaire des progéniteurs et un inhibiteur puissant de la mégacaryopoïèse (Kim et Letterio 2003).

La concentration en oxygène module également les fonctions des CSH au sein des niches. L'air ambiant a une concentration en oxygène d'environ 21%. Cette concentration variant en fonction des tissus d'un organisme, il est généralement admis que **l'hypoxie** se situe en deçà d'une concentration en oxygène de 5%. Au sein de la moelle osseuse, il existe une forte hypoxie puisque celle-ci serait inférieure à 1%, en particulier dans les zones les moins vascularisées comme dans la niche endostéale (Chow *et al.,* 2001; Harrison *et al.,* 2002). Il a été démontré que les CSH ayant le potentiel de reconstitution à long terme le plus important se trouvaient dans les zones les plus hypoxiques de la moelle osseuse (Parmar *et al.,* 2007). Le

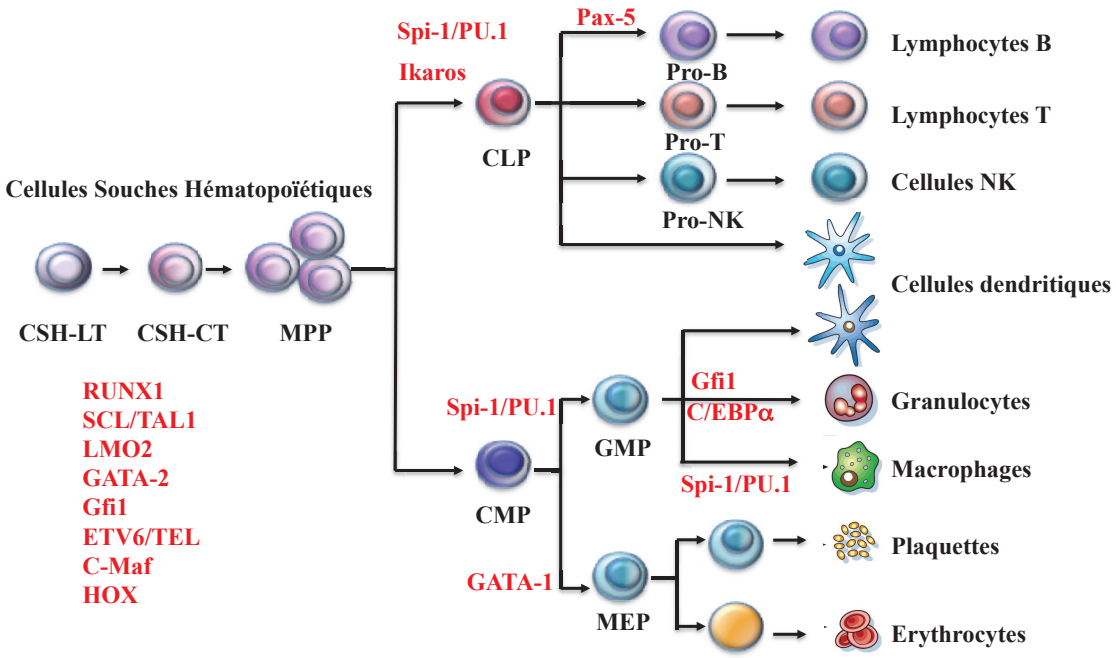


Figure 4 : Principaux facteurs de transcription impliqués dans le maintien des CSH et dans les principales voies de différenciation.

Différents facteurs de transcription sont impliqués dans l'hématopoïèse. Certains d'entre eux maintiennent la quiescence des CSH, alors que d'autres agissent dans la différenciation dans des lignages spécifiques.

(Adapté de Orkin et Zon, 2008)

facteur de transcription HIF-1α (*hypoxia inducible factor-1 alpha*) serait un des facteurs clefs du contrôle de l'hypoxie sur les CSH. Sa stabilisation en condition hypoxique permet au CSH-LT de se maintenir en état de quiescence, en agissant directement sur le cycle cellulaire (Takubo *et al.,* 2010). En outre, l'hypoxie limite la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS : *reactive oxygen species*) en réduisant la production énergétique due à la respiration mitochondrienne. Ceci a pour conséquence la protection à long terme des CSH, en limitant le stress oxydatif (Jang et Sharkis 2007).

2. La régulation intrinsèque : les facteurs de transcription

L'ensemble des constituants de la niche sont importants dans la régulation et le maintien des CSH. Néanmoins, il existe des **facteurs internes** à ces cellules, ayant également un rôle fondamental dans la biologie des CSH. Par exemple, chez la Souris, trois semaines après la naissance, les CSH passent d'un stade très prolifératif à un état quiescent. Cette transition se déroule de manière indépendante de la niche puisqu'elle est observée même après transplantation dans des souris d'âges différents (Blank *et al.,* 2008).

De nombreuses études ont été réalisées, en particulier grâce à des stratégies d'invalidation génique ou de surexpression chez la Souris, afin d'identifier les facteurs de transcription critiques du maintien des CSH et des différentes voies de différenciation. Les facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse étant très nombreux, en faire une liste exhaustive serait fastidieux. Néanmoins, il est possible de citer ceux qui sont le mieux caractérisés (Orkin et Zon 2008) (Figure 4).

Les facteurs de transcription intervenant dans la formation et le maintien des CSH incluent **RUNX1** (*runt-related transcription factor 1*) (ou AML1 (*acute myeloid leukemia 1*)), **SCL** (*stem cell leukemia*)/TAL1 (*T-cell acute lymphocytic leukemia 1*), **LMO2** (*LIM* [*Lin11, Isl-1 & Mec-3*] *domain only 2*), **GATA-2** (*GATA binding protein* (*Globin transcription factor 2*)), Gfi-1 (*growth factor independent-1*) et **TEL** (*translocation-ETS-leukemia*)/ETV6 (*ETS variant 6*). **MafB** (*v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*) contrôle le maintien de l'équilibre dans l'engagement des CSH dans les différentes voies de différenciation (Sarrazin *et al.,* 2009).

Au niveau du CMP, **GATA-1** induit la différenciation érythro-mégacaryocytaire et **Spi-**

1/PU.1 (*spleen focus forming virus proviral integration site-1/purine rich box.1*) la différenciation granulo-monocytaire, ces deux facteurs s'antagonisant mutuellement. Plus en aval, **Spi-1/PU.1** intervient dans la monopoïèse alors que **C/EBPα** (*CCAAT/enhancer binding protein alpha*) et Gfi1 agissent sur la granulopoïèse.

Ikaros et **Spi-1/PU.1** sont impliqués dans la lymphopoïèse et **Pax-5** (*paired box-5*) plus précisément dans la lymphopoïèse B.

Il est également nécessaire de citer **les gènes *HOX*** qui codent des facteurs de transcription ayant un rôle crucial dans l'hématopoïèse, mais dont les fonctions ne sont pas forcément bien comprises à ce jour (Argiropoulos et Humphries 2007). La deuxième partie de ce manuscrit sera dédiée à la famille des gènes *HOX*.

IV. Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM)

1. Généralités

Les LAM sont des **pathologies tumorales des cellules hématopoïétiques immatures** caractérisées par une prolifération anormale et excessive avec un arrêt de la différenciation, conduisant à une insuffisance médullaire. Ce sont des hémopathies malignes très hétérogènes du point de vue cytologique, cytogénétique et moléculaire. Chez l'adulte, ce sont les leucémies aiguës les plus fréquentes. L'âge médian de survenue est de 60 à 70 ans.

Les LAM ont été d'abord classées selon des critères cytologiques en fonction du stade au niveau duquel la différenciation hématopoïétique est bloquée (FAB, 1974). Par la suite, les critères cytogénétiques et moléculaires ont conduit à la classification actuelle (réalisée en 2000 et révisée en 2008 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)).

2. Altérations génétiques à l'origine des leucémies aiguës

Il s'avère qu'excepté dans quelques très rares cas, une seule mutation ne suffit pas au développement d'une LAM (McCormack *et al.,* 2005; Fortier et Graubert 2010). L'événement fondateur que l'on retrouve dans toutes les cellules d'une LAM confère un avantage prolifératif aux CSH ou aux progéniteurs affectés. Du fait d'une prolifération importante, d'autres

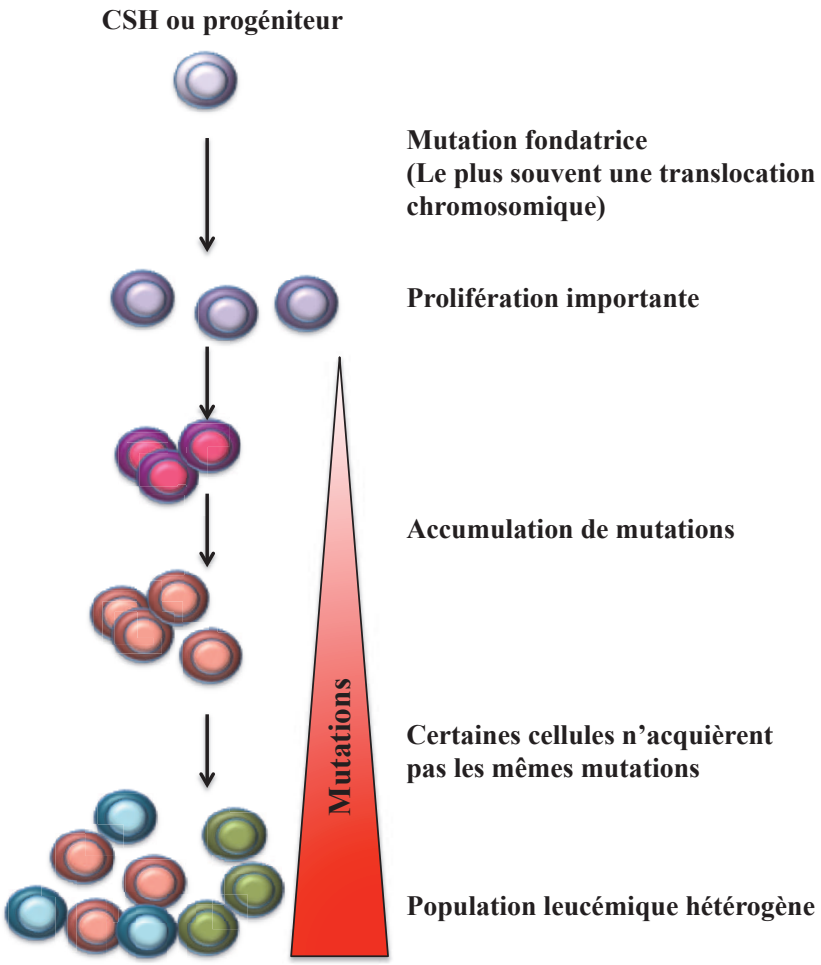


Figure 5 : Modèle de clonalité hétérogène.

Toutes les cellules leucémiques portent la mutation fondatrice, mais elles accumulent des mutations qui peuvent différer.

(Adapté de Jan et Majeti, 2013)

mutations apparaissent alors, certaines pouvant bloquer la différenciation. Chaque cellule accumulant différentes mutations, ceci explique que malgré le fait d'une première altération retrouvée dans toutes les cellules, la population tumorale est hétérogène, **c'est ce que l'on nomme « la clonalité hétérogène »** (Figure 5) (Murati *et al.,* 2012; Jan et Majeti 2013).

Il existe 5 classes de gènes qui sont cibles, soit d'altérations chromosomiques soit de mutations. Il s'agit des gènes impliqués dans des voies de signalisation cellulaire, des facteurs de transcription, des régulateurs épigénétiques, des suppresseurs de tumeurs et des composants de la machinerie d'épissage.

En ce qui concerne l'événement fondateur, **des remaniements génétiques récurrents** au niveau de différents gènes sont retrouvés, généralement à l'occasion d'une translocation chromosomique réciproque. Ces translocations engendrent la fusion de deux gènes différents (entiers ou non) qui génère une protéine de fusion (ou chimérique) n'existant pas dans les cellules normales, et dotée de nouvelles propriétés. Les protéines de fusion peuvent avoir des effets négatifs dominants sur la fonction normale de ces protéines ou recruter de nouveaux complexes co-régulateurs, ce qui a pour conséquence une dérégulation des gènes contrôlés par ces facteurs. Certains gènes remaniés sont systématiquement associés à un type de leucémie donné. Ainsi, le gène codant pour le récepteur nucléaire à l'acide rétinoïque RARα (*retinoic acid receptor alpha*) est transloqué dans toutes les leucémies aiguës promyélocytaires quel que soit le partenaire de translocation avec lequel il est associé (Mistry *et al.,* 2003). Certains gènes sont réarrangés dans différents types de leucémies, en fonction du partenaire avec lequel ils sont fusionnés. C'est le cas du gène codant l'histone méthyltransférase MLL (*Mixed lineage leukemia*) une protéine impliquée notamment dans la régulation des gènes *HOX* (Hess 2004).

Des mutations ponctuelles peuvent également affecter les gènes codant les facteurs de transcription dans les LAM. C'est le cas par exemple des gènes codant pour Spi-1/PU.1, GATA-1, C/EBPα, RUNX1 ou PAX5 (Rosenbauer et Tenen 2007; Teitell et Pandolfi 2009).

3. Les cellules souches leucémiques (CSL)

Les cellules composant une LAM ont été longtemps considérées comme homogènes. Cependant, il est désormais clairement établi que la population leucémique est hétérogène. Elle est composée de **cellules dites souches leucémiques** (CSL), de cellules leucémiques

progénitrices clonogènes et de blastes en différenciation. Ainsi, une homologie entre l'hématopoïèse normale et leucémique existe. L'ensemble de ces cellules proviendrait de la population rare de cellules clonales, les cellules souches leucémiques, ayant acquis des altérations génétiques précédemment décrites, qui seraient capables d'initier et de maintenir le clone leucémique (Huntly et Gilliland 2005; Krause et Van Etten 2007). Ces cellules ont été identifiées par des expériences de xénotransplantation de cellules leucémiques chez la Souris (Lapidot *et al.,* 1994; Bonnet et Dick 1997).

Les CSL s'auto-renouvellent et se différencient grâce à des divisions asymétriques, à l'instar des CSH. Elles ne sont vraisemblablement pas astreintes aux mêmes contrôles d'auto-renouvellement que les CSH du fait de leurs anomalies génétiques et peuvent donc générer de manière indéfinie et de façon conséquente des cellules leucémiques plus différenciées avec des capacités prolifératives accrues. La quiescence d'une partie des CSL explique les nombreuses rechutes observées après rémission, consécutives à des traitements chimiothérapeutiques. En effet, la chimiothérapie ciblant principalement les cellules en cycle actif, elle élimine les cellules leucémiques qui prolifèrent. A l'opposé, les CSL quiescentes seraient épargnées par ces traitements et pourraient donc reconstituer le « *pool* » leucémique.

L'origine de la cellule subissant les événements oncogéniques la transformant en cellules leucémiques est sujette à discussion. En fait, en fonction des anomalies moléculaires, leur origine est multiple. Elle peut être **soit une CSH soit un progéniteur**. Les progéniteurs normaux ont perdu la capacité de s'auto-renouveler mais certaines mutations pourraient induire la restauration de cette propriété propre à la CSH. Ainsi, les protéines de fusion MLL-ENL, MLL-AF9 ou MOZ-TIF2 sont capables de conférer aux progéniteurs CMP ou GMP la propriété d'auto-renouvellement (probablement en perturbant la régulation des gènes *HOX*) et de les transformer en CSL (Cozzio *et al.,* 2003; Krivtsov *et al.,* 2006).

Les CSL des LAM impliquant des anomalies de MLL ont d'ailleurs un profil génomique plus proche des cellules souches embryonnaires que des CSH. Ce patron d'expression génique leur conférerait alors des capacités d'auto-renouvellement importantes (Somervaille *et al.,* 2009).

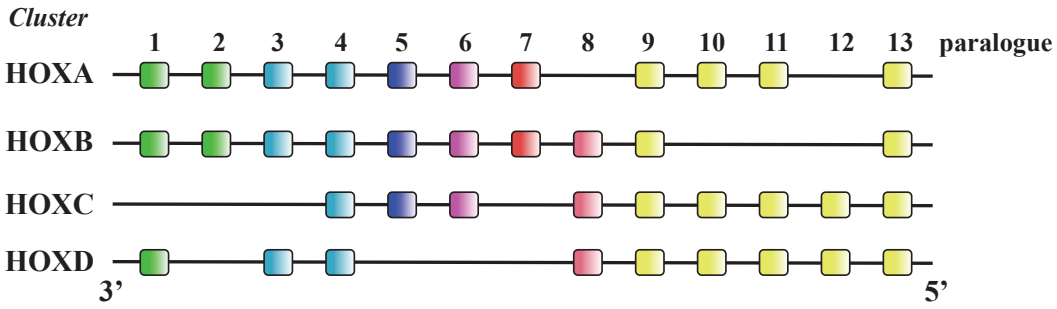


Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation génomique des *clusters* des gènes *HOX* chez les Mammifères.

Chez le Mammifère, quatre *clusters* de gènes *HOX* sont retrouvés répartis sur différents chromosomes. En leur sein, il existe différents paralogues, numérotés de 1 à 13.

(Adapté de Daftary et Taylor, 2006)

B. les gènes *HOX*

I. Les gènes *homeobox* ou les gènes à boîte homéotique

Le terme « **homeobox** » est une contraction entre les mots « *homeosis* » et « *box* ». Le mot « *homeosis* » (homéose en français), utilisé dans le domaine de l'embryogenèse, fait référence à des mutations qui conduisent à la transformation d'une structure située au niveau d'un segment du corps en une autre homologue localisée dans un autre segment. C'est le cas par exemple de la transformation d'une vertèbre cervicale en une vertèbre lombaire. Le terme « *box* » (ou boîte) renvoie à la séquence d'ADN d'environ 180 paires de base codant pour un domaine de liaison à l'ADN, le domaine homéotique. Grâce aux propriétés de ce domaine, les membres de la super-classe des gènes à boîte homéotique sont majoritairement des **facteurs de transcription**. Chez l'Homme, 235 gènes à boîte homéotique fonctionnels ont été identifiés (Holland *et al.,* 2007). Ils sont répartis en 11 classes selon leur origine phylogénique. Même si leurs fonctions sont multiples, ils sont essentiels à la mise en place des axes lors du développement et sont également impliqués dans les processus de différenciation cellulaire.

Les **gènes *HOX*** font partie de la classe ANTP (*antennapedia*) de cette famille. Le nom ANTP a pour origine la mutation d'un gène qui provoque la mise en place de pattes au lieu d'antennes chez la Drosophile. L'organisation et la structure des gènes *HOX* sont hautement conservées chez les Mammifères. Dans l'espèce humaine, les 39 gènes *HOX* répertoriés sont répartis en 4 groupes (de A à D ; appelés *clusters*) situés au niveau de quatre chromosomes distincts (Apiou *et al.,* 1996). Au sein de ces *clusters*, différents paralogues sont retrouvés et numérotés de 1 à 13 selon leur position sur le chromosome de 3' en 5'. Ainsi, le gène *HOXA9* représente le neuvième gène du *cluster* A (Figure 6). Les paralogues des différents *clusters* possèdent une forte similarité entre eux et avec les gènes du complexe *HOM-C* (*homeotic gene complexes*) de la Drosophile. Cette organisation suggère l'existence de duplications successives au cours de l'Evolution. Chez la Drosophile les gènes du complexe *HOM-C* sont organisés en deux *clusters*. Le *cluster* BX-C (*bithorax complex*) est composé des gènes *ubx* (*ultrabithorax*), *abd-A* (*abdominal-A*) et *abd-B* (*abdominal-B*). Le *cluster* ANTP-c (*antennapedia complex*) est formé des gènes *antp* (*antennapedia*), *lab* (*labial*), *dfd* (*deformed*), *pb* (*proboscipedia*) et *scr* (*sex combs reduced*).

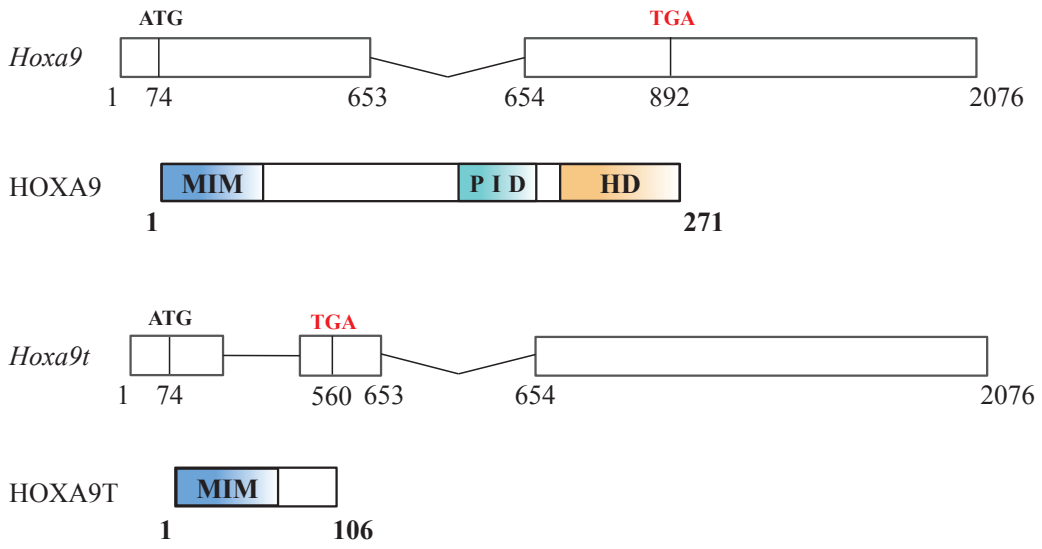


Figure 7 : Représentation schématique des ARN et des protéines HOXA9 et HOXA9T.

MIM : Motif d'interaction avec MEIS1, PID : *PBX interacting domain*, HD : Homéodomaine

(Adapté de He et al., 2012)

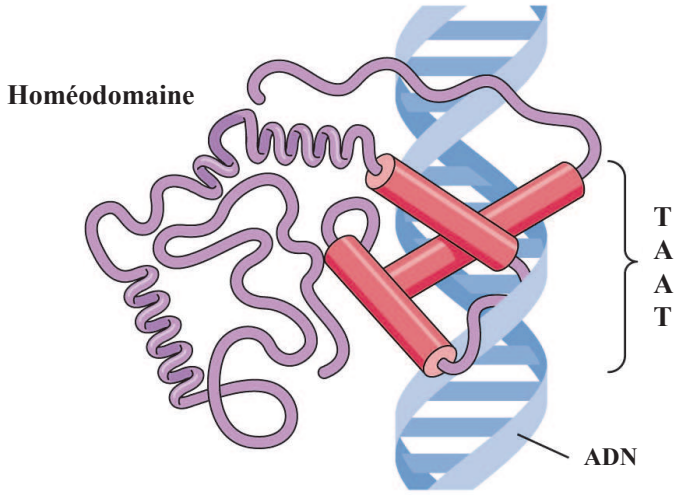


Figure 8 : Représentation de la structure en trois dimensions de l'homéodomaine et de son interaction avec l'ADN.

Au niveau de la partie C-terminale de l'homéodomaine, une des hélice se fixe sur le grand sillon de l'ADN. La partie N-terminale de ce domaine est capable de lier le petit sillon de l'ADN.

(Tiré du site internet de l'Université *Memorial* de Terre-Neuve, NL, Canada)

Les différentes fonctions et modes d'action des gènes *HOX* chez les Mammifères seront décrits par la suite, tout particulièrement ceux du gène *HOXA9*, gène clef de la leucémogenèse impliquant MOZ (*Monocytic leukaemia zinc finger protein*) et MLL.

II. Structure du gène *HOXA9*

Chez l'Homme, le gène *HOXA9* est localisé sur le chromosome 7 et est composé de deux exons. La protéine résultante, formée de 272 acides aminés, comporte plusieurs domaines fonctionnels tels que le domaine homéotique ou **homéodomaine** (HD), **le motif d'interaction à son co-facteur MEIS1** (*Meis1 intercating motif* : MIM) et la séquence riche en tryptophane (Tp) correspondant au **domaine d'interaction avec PBX** (PID : *pbx interacting domain*), un autre co-facteur de HOXA9 (Figure 7). Comme indiqué précédemment, le domaine homéotique est très conservé entre les différents membres de la famille. Il consiste en 60 acides aminés organisés en motif Hélice-Tour-Hélice. Cette région correspond au domaine de liaison à l'ADN des gènes *Homeobox* (Desplan *et al.,* 1988). Au niveau de la partie C-terminale de ce domaine, deux hélices sont antiparallèles alors que la troisième est perpendiculaire aux deux premières. Cette dernière se fixe directement sur le grand sillon de l'ADN. La partie N-terminale de ce domaine n'a pas de structure particulière et est capable de lier le petit sillon de l'ADN (Sitwala *et al.,* 2008) (Figure 8). L'homéodomaine est très conservé parmi les membres de la grande famille des gènes à boîte homéotique et se lie à une séquence consensus non spécifique (5'TAAT), retrouvée en moyenne toutes les 500 paires de base. **Ce domaine ne détermine donc pas la spécificité d'action de ces protéines** (Müller *et al.,* 1988), celle-ci provenant des partenaires protéiques de chaque HOX. En ce qui concerne HOXA9, sa spécificité réside dans ses interactions avec des co-facteurs, tels que PBX et Meis1 qui seront décrits par la suite.

L'analyse détaillée du locus du gène *HOXA9* a permis de mettre en évidence l'existence d'une isoforme issue d'un épissage alternatif. Cette maturation alternative induit un décalage du cadre de lecture, introduisant ainsi dans la séquence un codon STOP précoce. **La protéine tronquée résultante (HOXA9T)**, composée de 105 acides aminés, est identique à la partie N-terminale de HOXA9 et ne comprend pas le domaine HD (Figure 7) (Fujimoto *et al.,* 1998; He *et al.,* 2012). Cette protéine tronquée est exprimée chez l'embryon et chez l'adulte dans les reins, les intestins et les cellules hématopoïétiques. Contrairement au transcrit principal de *HOXA9*, la forme tronquée est détectée dans le noyau mais également dans le cytoplasme (Dintilhac *et al.,* 2004).

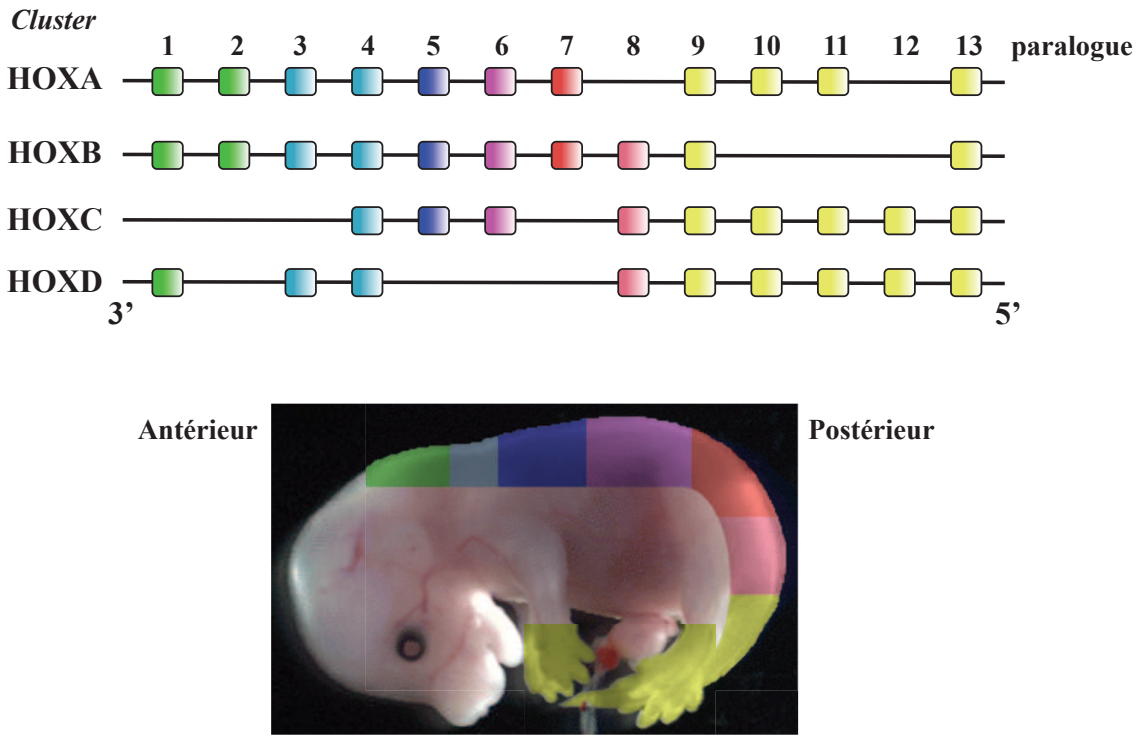


Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation génomique des *clusters* des gènes *HOX* chez les Mammifères et patron d'expression embryogénique.

Lors du développement, les gènes *HOX* situés en 3' du chromosome sont exprimés de manière antérieure alors que ceux localisés en 5' sont produits au niveau postérieur de l'embryon.

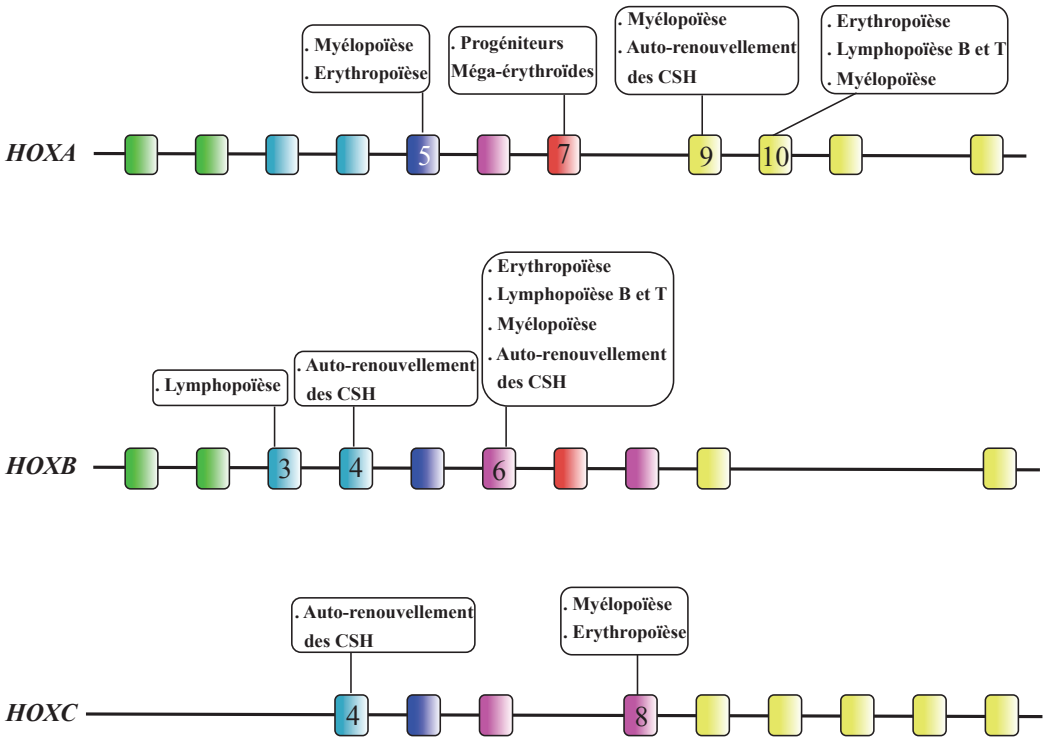
(Adapté de Daftary et al., 2006)

III. Les différentes fonctions des gènes *HOX*

1. Rôle des gènes *HOX* dans le développement

Au cours du développement, les gènes *HOX* sont responsables de la mise en place de l'axe antéro-postérieur et des membres. De façon surprenante, Edward Lewis identifia dans l'embryon de Drosophile une corrélation entre la localisation des gènes *bithorax* sur le chromosome et le site d'expression de la protéine correspondante, le long de l'axe antéro-postérieur, les gènes en 3' étant exprimés de manière antérieure et les gènes en 5' de manière postérieure (Lewis 1978). Cette **colinéarité spatiale** est également retrouvée chez les Mammifères (Gaunt 1988) (Figure 9). De plus, il existerait une **colinéarité temporelle** : les gènes situés en 3' s'exprimant de manière plus précoce que ceux situés en 5' (Duboule et Dolle 1989). Ainsi, comme chaque zone de l'embryon est caractérisée par un patron d'expression de gènes *HOX*, il a été proposé un « code des gènes *HOX* ». Chez la Souris, les gènes *Hox* sont essentiels à la mise en place de la colonne vertébrale (Rancourt *et al.,* 1995), du rhombencéphale (Lufkin *et al.,* 1991) et des membres (Davis et Capecchi 1994). La perte de fonction d'un gène *HOX* provoque des défauts du développement dans la limite antérieure de son expression. Cette **règle de prévalence postérieure** s'explique par le fait que les protéines HOX répriment le niveau d'expression des gènes *HOX* exprimés dans les zones antérieures (St-Jacques et McMahon 1996). Néanmoins, il n'est pas rare que la simple délétion d'un gène *HOX* ne provoque pas ou peu de modifications phénotypiques du fait de la **redondance fonctionnelle** des différents paralogues entre eux. Par exemple, la simple délétion des gènes *Hoxa11* ou *Hoxd11* provoque des défauts mineurs dans la formation des os des membres antérieurs, l'ulna et le radius. En revanche, la délétion concomitante des deux gènes induit une perte totale de ces deux os (Davis *et al.,* 1995). De même, la simple délétion du gène *Hoxa9* engendre une transformation antérieure des vertèbres lombaires, associée à l'apparition d'une paire de côtes surnuméraire. La double mutation *Hoxa9*/*Hoxad9* conduit quant à elle à une transformation antérieure plus marquée des vertèbres lombaires, ainsi qu'à de graves défauts au niveau du développement de l'humérus, phénotype absent dans les simples mutants (Fromental-Ramain *et al.,* 1996).

Le rôle des gènes *HOX* lors du développement ne se limite pas à la mise en place de l'axe antéro-postérieur. En effet, des anomalies au niveau des organes internes non segmentés sont observés chez les souris possédant des mutations des gènes *Hox* (Satokata *et al.,* 1995). Ainsi,



<u>Figure 10</u> : Phénotypes hématopoïétiques liés à l'invalidation ou à la surexpression des gènes *Hox* chez la Souris.

Différents modèles d'invalidation génique ou de surexpression chez la Souris ont permis de déterminer le rôle des différents gènes *Hox* dans l'hématopoïèse.

(D'après Argiropoulos et Humphries, 2007)

la double délétion des gènes *Hoxa7* et *Hoxb7* mène à des altérations au niveau du thymus (Chen *et al.,* 1998) et le gène *Hoxa5* est primordial dans la maturation pulmonaire (Boucherat *et al.,* 2009). Dans l'espèce humaine, des mutations dans ces gènes sont associées à des malformations congénitales (Redline *et al.,* 1992). Dans le cas du syndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (importantes anomalies des appareils génitaux internes chez la femme), des mutations des gènes *HOXA10* et *HOXA13* ont été identifiées (Ekici *et al.,* 2013).

2. Rôle des gènes *HOX* durant l'hématopoïèse

L'importance des gènes *HOX* n'est pas limitée au développement. Chaque tissu adulte exprime spécifiquement certaines protéines HOX, mais leur rôle précis n'est pas encore complètement caractérisé. Une hypothèse considère que les gènes *HOX* seraient essentiels dans les tissus adultes dans lesquels se déroule un **développement rapide de type embryonnaire**, à savoir un renouvellement important associé à une différenciation en cellules terminales fonctionnellement indépendantes et un fort potentiel de prolifération (Daftary et Taylor 2006). Le système hématopoïétique correspond à un de ces tissus pour lequel effectivement les gènes *HOX* ont un rôle primordial.

Au niveau du système hématopoïétique, certains gènes *HOX* sont exprimés dans tous les lignages alors que d'autres ont une expression restreinte à certains lignages, et d'autres ne sont pas du tout détectés (Kongsuwan *et al.,* 1988; Shen *et al.,* 1989). En effet, seuls les gènes du *cluster* A, B et C sont exprimés et majoritairement dans les cellules les plus primitives (par exemple les cellules $CD34^+$ humaines) (Sauvageau *et al.,* 1994; Kawagoe *et al.,* 1999). La variation expérimentale de l'expression de certains gènes *HOX* provoque un changement de voie de différenciation (Shen *et al.,* 1992). Ainsi, la surexpression de *Hoxa5* dans des cellules de moelle osseuse facilite la différenciation myéloïde (Figure 10) (Crooks *et al.,* 1999).

Le gène *HOXA9* est le plus exprimé dans les CSH et son expression est réprimée au cours de la différenciation, suggérant ainsi son implication dans la fonction et le destin de ces cellules (Sauvageau *et al.,* 1994; Pineault *et al.,* 2002). Sa surexpression *in vitro* dans la lignée de cellules immatures de souris 32Dcl3 bloque la différenciation myéloïde, confirmant la nécessité d'une expression diminuée afin d'induire la différenciation (Fujino *et al.,* 2001). Parmi les modèles murins nullizygotes pour les différents gènes *Hox*, celui présentant une délétion du gène *Hoxa9* comporte **les plus graves défauts de l'hématopoïèse**. Ces souris sont

caractérisées par une rate et un thymus de petite taille. Au niveau sanguin, un faible nombre de lymphocytes, de polynucléaires neutrophiles et de monocytes est retrouvé. Le nombre de progéniteurs myéloïde, érythroïde et lymphoïde B est réduit dans la moelle osseuse (Lawrence *et al.,* 1997). Une étude plus approfondie des CSH de ces souris montre une altération de leur capacité à proliférer, à répondre à un stress hématopoïétique et à générer une hématopoïèse complète après transplantation (Lawrence *et al.,* 2005). A l'inverse, la surexpression du gène *Hoxa9*, *in vitro* ou *in vivo*, conduit à une augmentation de l'auto-renouvellement des CSH (Thorsteinsdottir *et al.,* 2002). Dans les CSH humaines, HOXA9 réhausse le niveau d'expression des gènes impliqués dans la voie Wnt, voie cruciale pour le maintien de ces cellules (Ferrell *et al.,* 2005). Des expériences de précipitation de la chromatine suivies de séquençage dans des cellules de moelle osseuse murine ont établi que HOXA9 était principalement recrutée au niveau de régions *cis*-activatrices. Ainsi, **HOXA9 stimule l'expression de gènes contrôlant la prolifération et le maintien des CSH**. Il a également été démontré que Hoxa9 est capable de réprimer l'expression de gènes responsables de la différenciation myéloïde, tels que *Runx1* et *Cd33* (Huang *et al.,* 2012).

3. Rôle des gènes *HOX* dans la leucémogenèse des LAM

Classiquement, la dérégulation des gènes importants dans l'hématopoïèse normale est un événement clef de la leucémogenèse, ce qui est le cas pour les gènes *HOX*. La première preuve directe de ce rôle provint de la mise en évidence d'une expression constitutive de *Hoxb8* dans une lignée de leucémie myéloïde murine (Blatt *et al.,* 1988). La surexpression de ce gène dans des cellules hématopoïétiques leur confère un potentiel d'auto-renouvellement accru, ainsi que des capacités à induire des leucémies après transplantation (Perkins et Cory 1993). L'étude du profil d'expression des gènes *HOX* dans différents types de leucémies aiguës humaines a démontré que l'expression de *HOXC4* est associée à des leucémies aiguës lymphoblastiques, alors que celle de *HOXA10* est retrouvée dans des leucémies aiguës myéloblastiques (Celetti *et al.,* 1993).

L'étude de l'induction de leucémies dans le modèle murin BXH-2, par l'utilisation d'insertions provirales, a donné lieu à l'identification de certains gènes nécessaires au développement leucémique (Largaespada *et al.,* 1995). Cette étude a permis pour la première fois de démontrer que *Hoxa9* agissait en tant qu'oncogène dans les leucémies aiguës (Nakamura *et al.,* 1996b). La transplantation de cellules surexprimant *Hoxa9* provoque

l'apparition de LAM. Cependant, le délai de latence élevé suggère la nécessité d'au moins un deuxième événement oncogénique afin d'induire la leucémogenèse (Kroon *et al.,* 1998). Le clonage des gènes impliqués dans la **translocation (7;11)(p15;p15)** décrits dans certaines LAM a permis d'identifier le gène *HOXA9* fusionné avec le gène *NUP98* (Borrow *et al.,* 1996a; Nakamura *et al.,* 1996a). *NUP98* qui code pour une nucléoporine est également impliqué dans la survenue de leucémies chroniques et de syndromes myélodysplasiques secondaires ou non à des traitements (Arai *et al.,* 1997; Ikeda *et al.,* 1999; Nishiyama *et al.,* 1999). La transplantation de cellules médullaires surexprimant la protéine de fusion NUP98-HOXA9 provoque la survenue d'un syndrome myéloprolifératif, évoluant dans certains cas vers une LAM (Kroon *et al.,* 2001). Cette protéine chimérique bloque la différenciation *in vitro* des CSH tant vers la voie myéloïde qu'érythroïde (Takeda *et al.,* 2006a). Elle est capable de fixer certains promoteurs de gènes cibles afin d'activer leur transcription, de manière dépendante du domaine à boîte homéotique de HOXA9 (Ghannam *et al.,* 2004). Les gènes ciblés par ce facteur de transcription aberrant agissent sur la **prolifération cellulaire**, la **survie** et le **métabolisme**, expliquant partiellement son pouvoir transformant. D'autres partenaires de fusion du gène *HOXA9* ont été identifiés, dont *MSI2* (*Musashi-2*) lors du passage en forme aiguë de leucémies myéloïdes chroniques (Barbouti *et al.,* 2003).

Les translocations chromosomiques récurrentes impliquant *HOXA9* ne sont pas les seules causes de sa dérégulation dans les leucémies aiguës. En effet, *HOXA9* est surexprimé dans de nombreux cas de leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) ou de LAM (Armstrong *et al.,* 2002; Casas *et al.,* 2003). Le rôle de certaines protéines de fusion impliquées dans la dérégulation du gène *HOXA9* dans ces leucémies sera approfondi dans la dernière partie de ce manuscrit. De plus, sa surexpression chez les patients atteints de LAM est un marqueur défavorable de réponse aux chimiothérapies classiquement utilisées dans le traitement de ces leucémies (Golub *et al.,* 1999). Au cours du vieillissement, le niveau d'expression du gène *HOXA9* s'accroît, ce qui semble associer le vieillissement à l'augmentation de la fréquence de survenue de certaines leucémies (Morgan *et al.,* 2005).

IV. Mode d'action des protéines HOX à travers leurs interactions

Comme précédemment indiqué, la spécificité d'action des gènes *HOX* réside dans leur association avec leurs co-facteurs. PBX et MEIS1, protéines à boîte homéotique de la famille TALE (*three amino-acid loop extension*) interagissant avec HOXA9, sont détaillées ci-après.

1. PBX

Chez la Drosophile, les protéines ANTP et UBX sont deux membres de la famille des gènes à boîte homéotique reconnaissant la même séquence d'ADN. Néanmoins, leur fonction au cours du développement est différente. **Ce paradoxe a été élucidé** avec la découverte de la protéine Extradenticle (EXD) qui appartient à cette famille (Rauskolb et Wieschaus 1994). Les embryons comportant une mutation du gène *exd* sont sujets à de graves défauts du développement, sans que le patron d'expression des gènes du complexe HOM-C ne soit affecté. Les gènes ciblés et activés par EXD sont les mêmes que ceux contrôlés par les protéines du complexe HOM-C. Ceci a permis de démontrer que EXD est un **co-facteur** de ce complexe (Peifer et Wieschaus 1990; Mann et Chan 1996).

Chez l'Homme, l'homologue de *exd*, ***PBX* (*pre-B-cell leukemia homeobox*)**, a été identifié dans des leucémies affectant les précurseurs des lymphocytes B (Kamps *et al.,* 1990). PBX appartient à la sous-famille PBC (*PBX and CEH-20*). Il existe 4 gènes *PBX* codant pour 4 protéines très similaires : PBX1 à 4 (Monica *et al.,* 1991). L'interaction entre certaines protéines HOX et PBX est nécessaire à leur fixation spécifique au niveau de gènes cibles (Lu *et al.,* 1995). Le domaine homéotique de PBX est crucial pour cette interaction (Chang *et al.,* 1995) alors que dans les protéines HOX, c'est une séquence peu conservée se trouvant à proximité de l'homéodomaine, qui s'avère nécessaire mais non suffisante pour cette interaction (Phelan *et al.,* 1995). En fonction de la protéine HOX, cette séquence est appelée « hexapeptide », « pentapeptide » ou encore « motif YPWM ». Une nomenclature plus récente l'a renommée « **domaine d'interaction avec les protéines PBX** » (PID : *PBX interacting domain*) (In der Rieden *et al.,* 2004). PBX forme donc des dimères avec les protéines HOX, et agit en tant que co-facteur, en modifiant la séquence consensus préférentiellement fixée par celle-ci, par le biais d'un **changement de conformation** (Chan *et al.,* 1996).

Au cours du développement, HOXA9 interagit avec PBX1 (LaRonde-LeBlanc et Wolberger 2003) tandis que dans les cellules adultes myéloïdes, HOXA9 est associée à PBX2 (Shen *et al.,* 1999). Les niveaux d'expression des gènes *HOXA9* et *PBX3* sont conjointement augmentés dans des leucémies comprenant des anomalies du gène *MLL* (Li *et al.,* 2013). Le rôle précis de l'hétérodimère formé par HOXA9 et PBX3 n'est pas encore élucidé. Cependant, les deux protéines sont essentielles au processus de transformation leucémique puisque l'inhibition de l'une ou l'autre induit une perte des capacités transformantes de cellules

arborant des anomalies de MLL (Li *et al.,* 2013). En sus, l'utilisation de la molécule HXR9 (*hexapeptide arginin 9*), connue pour interrompre les interactions entre les protéines HOX et PBX, provoque une diminution de la prolifération des cellules leucémiques (Morgan *et al.,* 2007).

2. MEIS1

Le gène ***Meis1*** **(*Myeloid ecotropic viral integration site 1*)** a été identifié dans le modèle murin leucémique BXH-2 (modèle d'insertion rétrovirale). Il s'avère que dans 15% des cas de LAM observées chez cette souris, l'insertion pro-virale est localisée au niveau de ce gène (Moskow *et al.,* 1995). Le gène humain *MEIS1* (homologue de *Pbx*) a été cloné en 1997 (Smith *et al.,* 1997). Au cours du développement murin, Meis1 agit sur la mise en place de l'axe proximo-distal des membres antérieurs et postérieurs (Mercader *et al.,* 1999). Les souris nullizygotes pour ce gène révélèrent son importance dans le développement de l'hématopoïèse, particulièrement pour le maintien en quiescence des CSH (Hisa *et al.,* 2004; Azcoitia *et al.,* 2005). Meis1 entraîne la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques, exceptés ceux du lignage érythroïde (Cai *et al.,* 2012). Une part de son action sur le maintien de CSH s'explique par l'activation de la transcription des gènes *HIF1*α et *HIF2*α, deux facteurs de transcription impliqués dans le contrôle du métabolisme hypoxique (Kocabas *et al.,* 2012). A l'instar de HOXA9, MEIS1 est **fortement exprimé dans les cellules hématopoïétiques les plus primitives** et son expression est réprimée au cours de la différenciation hématopoïétique (Fujino *et al.,* 2001; Argiropoulos *et al.,* 2007).

La fonction de transactivation de la transcription de MEIS1 est portée par son domaine C-terminal (Mamo *et al.,* 2006). Il interagit avec PBX (Knoepfler *et al.,* 1997) et certaines protéines HOX, dont HOXA9. Malgré l'homologie de MEIS1 avec PBX, son interaction avec HOXA9 ne se déroule pas au niveau du domaine PID des protéines HOX. Elle se situe au niveau d'un domaine situé dans la partie N-terminale de HOXA9, appelé MIM (**motif d'interaction avec MEIS1)** (Shen *et al.,* 1997). Dans les cellules myéloïdes, il a été démontré que HOXA9, PBX2 et MEIS1 forment un hétérotrimère (Shen *et al.,* 1999). De plus, MEIS1 représente un **co-facteur important dans les processus de transformation leucémogène induite par HOXA9**. Lors d'une transplantation dans une souris irradiée létalement de cellules hématopoïétiques surexprimant conjointement Hoxa9 et Meis1, la latence de survenue d'une LAM est fortement réduite en comparaison à la greffe de cellules surexprimant uniquement

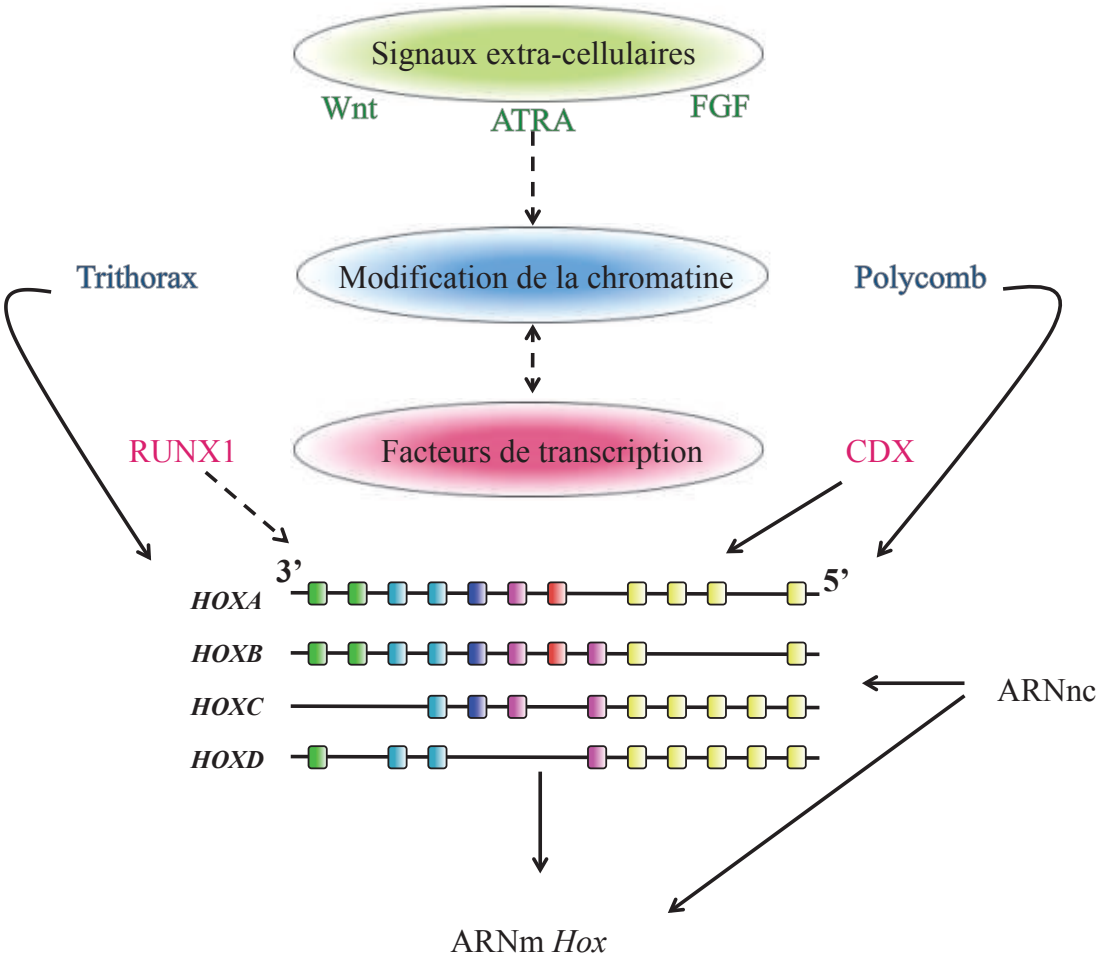


Figure 11 : Représentation schématique du contrôle de l'expression des gènes *HOX*.

Différents facteurs sont impliqués dans le contrôle transcriptionnel des gènes *HOX*. Des signaux endocriniens, des modifications épigénétiques et des facteurs de transcription agissent afin d'établir ou de maintenir leur patron d'expression.

Flèche pleine : action directe prouvée
Flèche en pointillé : action directe non prouvée

(D'après McGonigle et al., 2008)

Hoxa9 (Kroon *et al.,* 1998). En sus, le niveau de *MEIS1* est également accru dans les cas de LAM ou de leucémies aiguës lymphoblastiques où le taux de *HOXA9* est élevé, suggérant une régulation commune de leur expression (Kawagoe *et al.,* 1999; Rozovskaia *et al.,* 2001; Armstrong *et al.,* 2002).

Par ailleurs, l'activité de transactivation de Meis1 conduit à la surexpression des gènes cibles Flt3l (Wang *et al.,* 2005) et c-myb (Hess *et al.,* 2006).

V. Le contrôle de l'expression des gènes *HOX*

Comme précédemment indiqué, le rôle des protéines HOX est essentiel, et des anomalies de leur expression peuvent être responsables de diverses pathologies. Il s'agit désormais de décrire les différents éléments impliqués dans le contrôle du niveau d'expression des gènes *HOX* (Figure 11).

Du fait de leur organisation en *cluster,* la modulation de leur taux d'expression est complexe. Il existe en effet des séquences activatrices et des promoteurs propres à chaque gène. Cependant, certaines de ces séquences communes à plusieurs gènes, sont à l'origine de la production de transcrits polycistroniques. Par exemple, les gènes *HOXC4*, *HOXC5* et *HOXC6* partagent le même promoteur (Simeone *et al.,* 1988).

Deux classes de régulateurs de l'expression des gènes *HOX* ont été identifiées, celles responsables de l'initiation de la mise en place du profil d'expression et celles impliquées dans leur maintien. L'étape d'initiation est dépendante du système endocrinien et des facteurs de transcription tels que les CDX (*caudal type homeobox*), alors que le maintien de leur transcription nécessite des modifications épigénétiques (McGonigle *et al.,* 2008).

1. Le système endocrinien

a. l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque tout-*trans* (ATRA : *all-trans retinoic acid*) est un métabolite du rétinol (vitamine A). L'ATRA se fixe sur ses récepteurs nucléaires RAR (*retinoic acid receptor*). Les RAR sont des facteurs de transcription, activés par la fixation de leur ligand. Ils forment des

dimères avec les récepteurs RXR (*retinoid X receptor*). L'ATRA est connu pour son rôle primordial au cours de l'embryogenèse. Ainsi, des embryons humains ou murins exposés à de fortes doses d'ATRA subissent de graves anomalies homéotiques (Lammer *et al.,* 1985). Cette sur-exposition provoque une augmentation du niveau d'expression des gènes *HOX* antérieurs (Kessel et Gruss 1991). Il s'avère que tous les gènes *HOX* ne sont pas sensibles aux mêmes doses d'ATRA (Simeone *et al.,* 1990).

Des éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE : *retinoic acid response element*) ont été identifiés à proximité des gènes *HOX* (Marshall *et al.,* 1994; Morrison *et al.,* 1996). La délétion du RARE à proximité du gène *Hoxa1*, entraîne une baisse de son expression ainsi qu'une transformation homéotique (Dupé *et al.,* 1997).

b. Le FGF

Il existe 4 récepteurs au FGF (*fibroblast growth factor*), portant tous une activité de type tyrosine kinase. Une des signalisations induites par la fixation du FGF à l'un de ses récepteurs implique **la voie Ras-Map-Kinase**, menant en dernier lieu à l'activation de facteurs de transcription. Une exposition à de fortes doses de FGF génère des transformations homéotiques associées à une surexpression des gènes *HOX* postérieurs chez la Drosophile, le Xénope ou la Souris (Cho et De Robertis 1990; Pownall *et al.,* 1996). Il pourrait s'agir d'un rôle indirect puisque la voie de signalisation induite par le FGF stimule l'activité des facteurs de transcription CDX, connus pour induire la transcription des gènes *HOX* (Isaacs *et al.,* 1998).

c. La voie Wnt

Chez le Caenorhabditis elegans, des protéines de la voie Wnt activent l'expression de gènes *Hox* lors du développement du système nerveux (Maloof *et al.,* 1999). Il a été montré chez la Souris que la voie Wnt induisait l'expression de *Cdx1*, suggérant ainsi son rôle indirect dans le contrôle des gènes *Hox* (Pilon *et al.,* 2007).

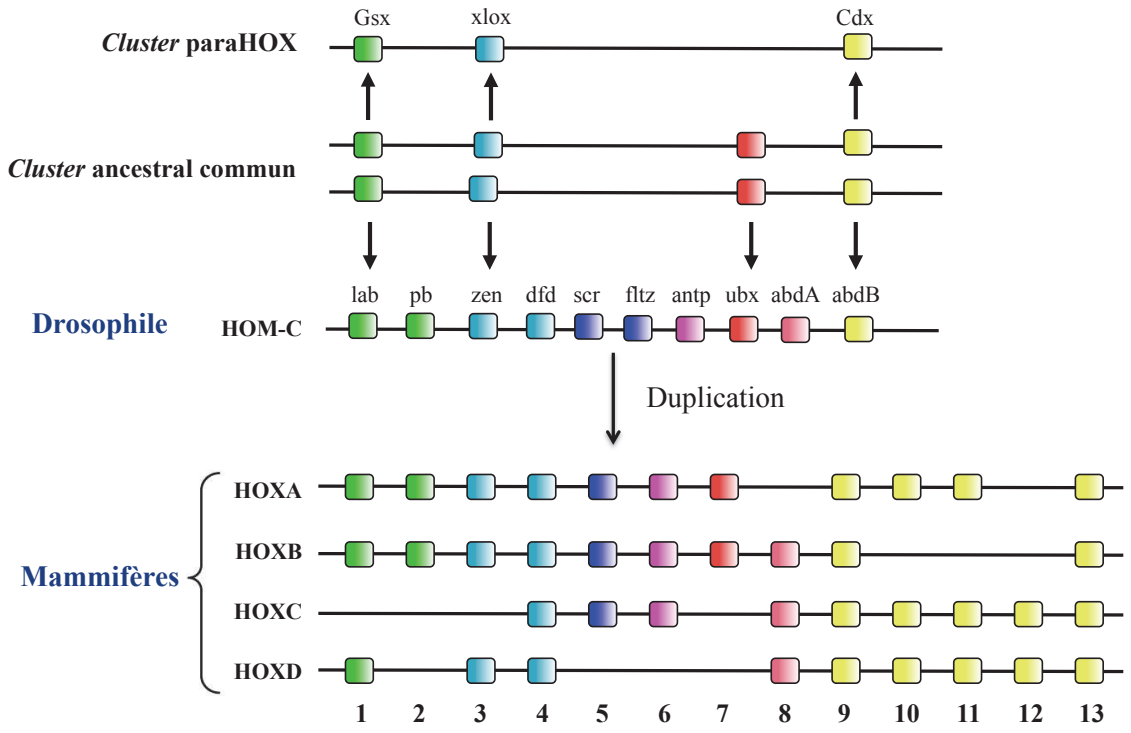


Figure 12 : Représentation schématique de l'origine des *clusters* HOX et ParaHOX.

Les *clusters HOX* et para*HOX* ont évolué à partir de deux *clusters* ancestraux générés à la suite d'une duplication.

(Adapté de Brooke et al., 1998)

2. Les facteurs de transcription

a. CDX

Au cours du développement de la Drosophile, le gène *caudal* (*cad*), un gène à boîte homéotique, s'exprime très précocement grâce à son rôle essentiel à la spécification postérieure. Il est exprimé de manière maternelle, c'est-à-dire que son ARN est hérité de l'ovocyte, et son niveau protéique forme un gradient antéro-postérieur du fait de sa dégradation dans les zones antérieures par la protéine Bicoïd. Chez les Mammifères, il existe trois homologues à Caudal : **CDX1, CDX2 et CDX4**. Ces gènes font partie de la classe des para*HOX*, appelée ainsi du fait de l'appartenance de *CDX2* à un *cluster* de gènes organisé de manière très proche à celui des gènes *HOX* (Brooke et al., 1998). Le *cluster* para*HOX* est composé des gènes *CDX2*, *Gsx* (*Genomic screened homeobox*) et *Xlox* (*Xenopus laevis homeobox*). Les *clusters paraHOX* et *HOX* dériveraient d'un *cluster* ancestral commun. Les gènes *CDX* sont homologues aux gènes *HOX* postérieurs (Figure 12) (Brooke *et al.,* 1998). A l'instar de gènes *Hox*, les gènes *Cdx* sont impliqués dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur lors du développement (Young et Deschamps 2009). L'invalidation du gène *Cdx1* chez la Souris a pour conséquence une transformation homéotique antérieure, proche des phénotypes observés dans les souris nullizygotes pour les gènes *Hox* (Subramanian *et al.,* 1995. Par ailleurs, la perte d'expression des gènes Cdx provoque une disparition des segments postérieurs chez le Poisson-Zèbre {Hammerschmidt, 1996 #3522). **Des sites de fixation des protéines CDX** ont été identifiés dans les séquences régulatrices des gènes *HOX*. Cdx1 est capable de transactiver l'expression de *Hoxa7 in vitro* (Subramanian *et al.,* 1995). Les trois homologues murins peuvent se fixer au niveau de séquences activatrices du gène *Hoxa5*, stimulant ainsi sa transcription (Tabariès *et al.,* 2005).

Chez le Poisson-Zèbre, l'inhibition du niveau d'expression du gène *cdx4* mène à des défauts de l'organogenèse, mais également à des altérations de l'hématopoïèse embryonnaire (Davidson *et al.,* 2003). La double répression de *cdx1* et *cdx4* chez cette espèce animale entraîne l'absence de cellules érythroïdes ainsi qu'**une réduction du nombre des CSH**. Par contre, la surexpression du gène *Hoxa9* dans ces poissons restaure le phénotype sauvage, soulignant l'importance de la régulation des gènes *Hox* dans la signalisation par les protéines *Cdx* (Davidson et Zon 2006). Dans une lignée murine de CSH, Cdx4 se lie aux séquences régulatrices du gène *Hoxa9*, activant ainsi sa transcription (Yan *et al.,* 2006). L'utilisation des

cellules souches embryonnaires murines a aussi révélé l'importance des Cdx dans la différenciation hématopoïétique (McKinney-Freeman *et al.,* 2008). *A contrario*, il a été montré que le niveau d'expression des gènes *CDX1* et *CDX4* dans la moelle osseuse humaine ou murine était très faible, *CDX2* n'étant même pas détectable (Lengerke et Daley 2012).

Le gène *CDX2* est la cible d'une translocation chromosomique conduisant à sa fusion avec le gène *ETV6* dans certains cas de **LAM** (Chase *et al.,* 1999). D'autre part, alors que dans de nombreux cas de LAM le niveau d'expression de *CDX2* est augmenté, rien ne prouve que cette expression aberrante induise la surexpression des gènes *HOX* associés (Lengerke et Daley 2012).

b. RUNX1

Parmi les trois isoformes existantes de RUNX1, RUNX1a est la forme la plus exprimée dans les cellules hématopoïétiques immatures. Sa surexpression dans des CSH permet leur expansion *in vivo* et *ex vivo*. L'augmentation de l'auto-renouvellement observée est en partie imputable à l'élévation du niveau d'expression du gène *HOXA9*. Néanmoins, le rôle direct de RUNX1 dans cette surexpression n'a pas été vérifié (Tsuzuki et Seto 2012).

3. La régulation épigénétique

L'épigénétique correspond à l'ensemble des mécanismes héritables de régulation du niveau d'expression de gènes qui ne dépendent pas de modifications de la séquence de l'ADN.

a. Les ARN non codants

Les ARN non codants (ARNnc) sont impliqués dans le contrôle de l'expression de gènes cibles. Il existe deux classes d'ARNnc, **les petits ARNnc** (Hornstein et Shomron 2006) et **les longs ARNnc** (Rinn et Chang 2012). Les ARNnc ont un rôle clef dans la régulation du niveau d'expression des gènes *HOX* (Brock *et al.,* 2009).

- *Les petits ARNnc*

Trois types de petits ARNnc ont été identifiés. Il s'agit des petits ARN interférents (*siRNA, small interfering RNA*), des piARN (*piwi-interacting RNA*) et des microARN (ou miARN). Deux groupes de microARN sont impliqués dans le contrôle des gènes *HOX*, ceux codés en dehors des *clusters HOX* et ceux intégrés en leur sein. Ils sont ainsi transcrits parallèlement aux gènes *HOX* avec lesquels ils partagent la localisation. Parmi eux, les familles de miR-10 et mir-196 sont trouvées chez les Mammifères. Ils participeraient à la prévalence postérieure en inhibant les ARN des gènes *HOX* exprimés de manière plus antérieure dans l'embryon (Mansfield et McGlinn 2012).

- *Les longs ARNnc*

Les longs ARNnc mesurent de 300 à plusieurs milliers de paires de base. A l'instar des ARN messagers, ils sont épissés et polyadénylés (Carninci *et al.,* 2005). Plusieurs mécanismes d'action ont été décrits tels que la compétition pour les complexes de transcription avec des gènes situés à proximité (Shearwin *et al.,* 2005) ou le recrutement de complexes répresseurs (Plath *et al.,* 2003).

Le premier ARNnc impliqué dans la régulation des gènes *HOX* fut mis en évidence en 2007 par Rinn et ses collaborateurs. Ce long ARNnc appelé HOTAIR (*HOX transcript antisense intergenic RNA*) est localisé au sein du *cluster HOXC*. De manière inattendue, il réprime le niveau d'expression des gènes du *cluster* D en recrutant des co-répresseurs du groupe Polycomb (Rinn *et al.,* 2007). En 2011, Wang et ses collègues identifièrent HOTTIP (*HOXA transcript at the distal tip*), situé au niveau du *cluster* A, et responsable de l'activation de leur transcription *via* le recrutement de WDR5, une protéine nécessaire à l'activité enzymatique d'un facteur épigénétique bien connu des gènes *HOX*, MLL (Wang *et al.,* 2011).

b. Les modifications de la chromatine

Les marques épigénétiques correspondent à l'ensemble des modifications des composants de la chromatine, produisant soit des changements locaux dans sa structure, soit une modulation des protéines recrutées au niveau de ces marques. L'étude de la régulation du niveau d'expression des gènes *HOX* chez la Drosophile a conduit à la découverte de divers

complexes épigénétiques, appartenant aux **groupes Trithorax ou Polycomb**. Leur nom provient des protéines éponymes qui ont été découvertes à l'origine. Ces complexes ne sont pas nécessaires à la mise en place du patron d'expression des gènes *HOX*, mais **ils sont requis pour leur maintien** (Dejardin et Cavalli 2004). Les membres du groupe Trithorax sont impliqués dans la conservation d'un état d'activation transcriptionnelle alors que le groupe Polycomb préserve un état répressif. Les protéines des deux groupes sont hétérogènes puisqu'il s'agit d'enzymes modifiant les histones, de protéines du remodelage de la chromatine ou de protéines capables de se lier à l'ADN. Trois complexes protéiques majeurs du groupe Polycomb ont été mis au jour. Il s'agit de PhoRC (*pleiohomeotic repressive complex*), PRC1 (*polycomb repressive complex 1*) et PRC2. Concernant les membres du groupe Trithorax, les complexes principaux sont COMPASS (*complex proteins associated with Set1*), ASH (*Absent, small and homeotic discs*), TAC1 (*trithorax acetylation complex*) et des complexes de remodelages de la chromatine dépendants de l'ATP (Schuettengruber *et al.,* 2011). **Des éléments de réponse aux groupes Trithorax ou Polycomb** ont été identifiés au niveau des séquences régulatrices des gènes *HOX*. Ils sont essentiels à la conservation de l'état actif ou inactif de la chromatine durant les différentes étapes du développement (Schwartz et Pirrotta 2007).

Des homologues mammaliens aux différentes protéines des deux groupes ont été caractérisés, notamment les protéines MLL, homologues de la protéine Trithorax.

La régulation épigénétique étant au cœur de mon projet de recherche, la troisième partie de ce manuscrit est donc consacrée à ce vaste domaine.

C. L'épigénétique

Le terme épigénétique, littéralement « au-delà de la génétique », correspond à **l'étude de l'hérédité de phénotypes qui n'est pas explicable par des changements dans la séquence d'ADN**. Il a été créé en 1942 par Conrad Waddington alors qu'il étudiait le lien entre le génome et le phénotype au cours du développement. La découverte que **l'ADN est le support de l'information génétique**, dans les années 1940 par Oswald Avery, suivi peu de temps après par la compréhension de la structure de cette molécule par le duo formé de James Watson et Francis Crick, ont soulevé presque autant de questions qu'ils n'en ont résolues. En effet, comment expliquer que toutes les cellules du corps humain soient composées de la même séquence d'ADN alors que chaque type cellulaire est différent ? A une plus grande échelle, pourquoi des jumeaux partageant la même information génétique ne sont-ils pas strictement identiques ?

C'est la mise en évidence que les gènes peuvent être activés ou réprimés, par François Jacob et Jacques Monod au début des années 1960, qui a permis de comprendre que la différence entre deux cellules contenant la même séquence d'ADN réside dans le fait que **certains gènes sont éteints et d'autres transcriptionnellement actifs.** Hormis lors de la maturation des lymphocytes, il n'est pas observé pour les autres types cellulaires de pertes ou de gains d'information génétique (Wilmut *et al.,* 1997; Ralston et Shaw 2008). De façon remarquable, la régulation du niveau d'expression de gènes est **héritable après la mitose**. Ainsi, une cellule de peau qui se divise donne une autre cellule de peau, avec le même phénotype. Il existe donc des mécanismes capables de modifier le niveau d'expression de gènes, qui sont héritables malgré la division cellulaire.

C'est la découverte de **la méthylation de l'ADN** et de son implication dans la répression transcriptionnelle qui donna tout son sens au terme « Epigénétique » (Holliday et Pugh 1975; Riggs 1975). Il fut ensuite démontré que des modifications d'autres composants de la chromatine, en particulier les modifications post-transcriptionnelles des histones induisaient des variations dans le niveau d'expression de gènes, et étaient héritables au cours de la division cellulaire. Plus récemment, les ARN non codants ont intégré cette régulation dite « épigénétique » puisqu'ils permettent une régulation d'expression de certains gènes au long cours.

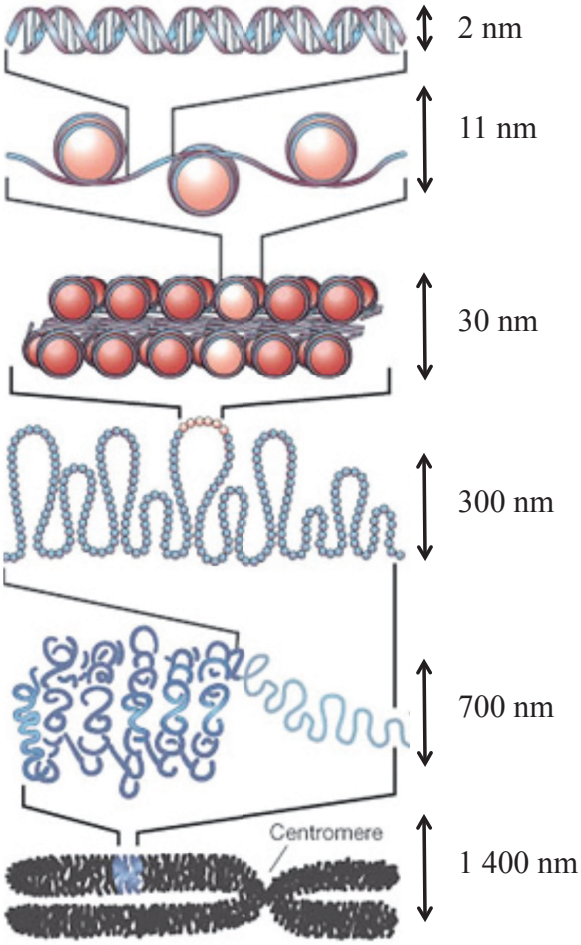


Figure 13 : Les différents degrés de compaction de l'ADN au sein du noyau : de la fibre de 11 nm au chromosome métaphasique. Les structures tertiaires sont hypothétiques.

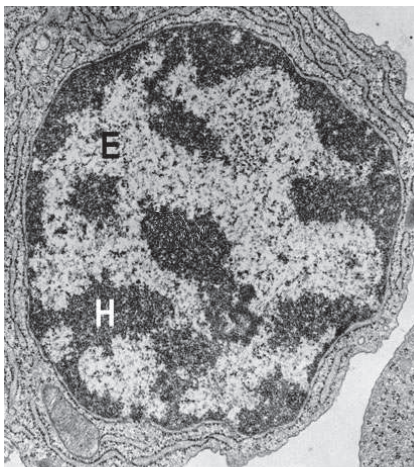


Figure 14 : Photographie au microscope électronique d'un noyau d'une cellule de moelle osseuse. (E) Euchromatine, (H) Hétérochromatine. (Université de Californie, San Francisco, CA, Etats-Unis d'Amérique).

L'hétérochromatine est la région condensée de la chromatine alors que l'euchromatine l'est moins. L'hétérochromatine constitutive contient peu de gènes et est présente dans des régions fonctionnelles des chromosomes. L'hétérochromatine facultative est constituée de régions codantes associées à un état silencieux. A l'opposé, l'euchromatine est fonctionnellement associée à une activation de la transcription.

En fonction de leur activité, les complexes protéiques impliqués dans le contrôle épigénétique peuvent être classés en trois catégories. Les membres de la première, responsables des différentes modifications sur la chromatine sont les « écrivains » (*writer*), la deuxième catégorie, les « lecteurs » (*reader*), est composée de protéines qui reconnaissent ces marques épigénétiques, et ceux de la troisième, capables d'ôter les modifications portées par la chromatine, sont les « effaceurs » (*eraser*).

I. La structure de la chromatine

1. Généralités

Chez les organismes eucaryotes, l'ADN contenu au sein du noyau cellulaire est associé à des protéines afin de former la chromatine. En effet, les deux mètres d'ADN devant être contenus dans un noyau d'une dizaine de microns, il est nécessaire que l'ADN soit fortement compacté. Néanmoins, l'ADN doit être accessible aux protéines participant aux mécanismes cellulaires cruciaux que sont la transcription des gènes, la réplication ou la réparation de l'ADN. Ainsi, la régulation de l'organisation chromatinienne est fondamentale dans les processus nucléaires (Ehrenhofer-Murray 2004).

L'unité de base de la chromatine est **le nucléosome constitué d'ADN et de protéines, les histones**. Cette structure est régulièrement répétée pour former le nucléofilament (fibre de 11 nm) qui constitue la forme la plus décondensée de la chromatine (structure primaire). Ce nucléofilament s'organise en une structure secondaire, la fibre de 30 nm, grâce à des interactions entre nucléosomes selon vraisemblablement un modèle de type « zigzag » (Woodcock et Dimitrov 2001; Horn et Peterson 2002; Khorasanizadeh 2004) (Figure 13). Ces structures secondaires forment des structures tertiaires plus compactes, modélisées diversement et controversées. Le niveau de compaction le plus élevé correspond au chromosome métaphasique (1,4 µm).

Au sein du noyau, la chromatine se présente morphologiquement sous deux aspects : **l'euchromatine et l'hétérochromatine** (Figure 14).

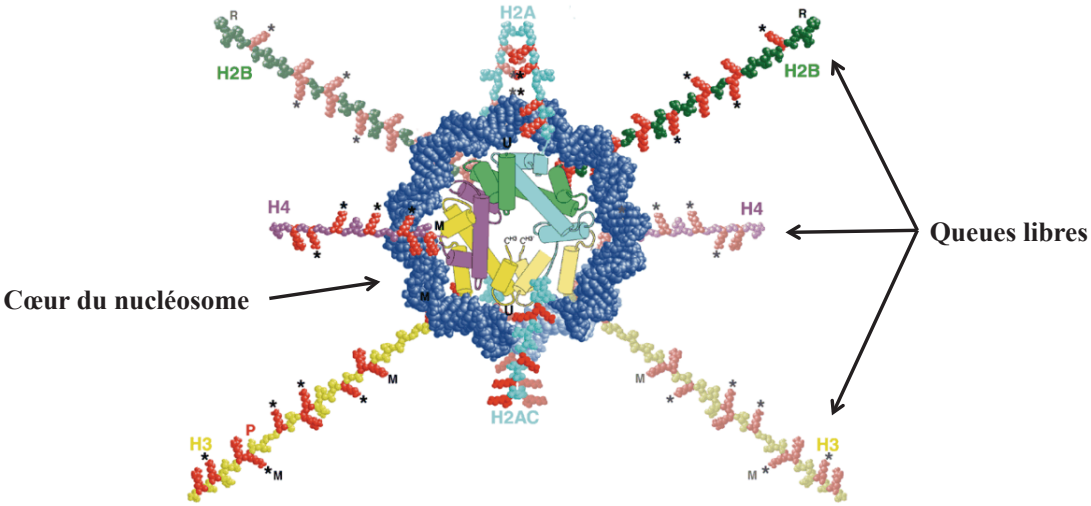


Figure 15 : Représentation schématique du nucléosome. La superhélice d'ADN est colorée en bleu, les histones H3 en jaune, H4 en cassis, H2A en cyan et H2B en vert, les extensions au-dessous du plan étant plus pâles que les extensions du dessus ; les résidus arginine et lysine sont en rouge.
(Wolffe et Hayes, 1999)

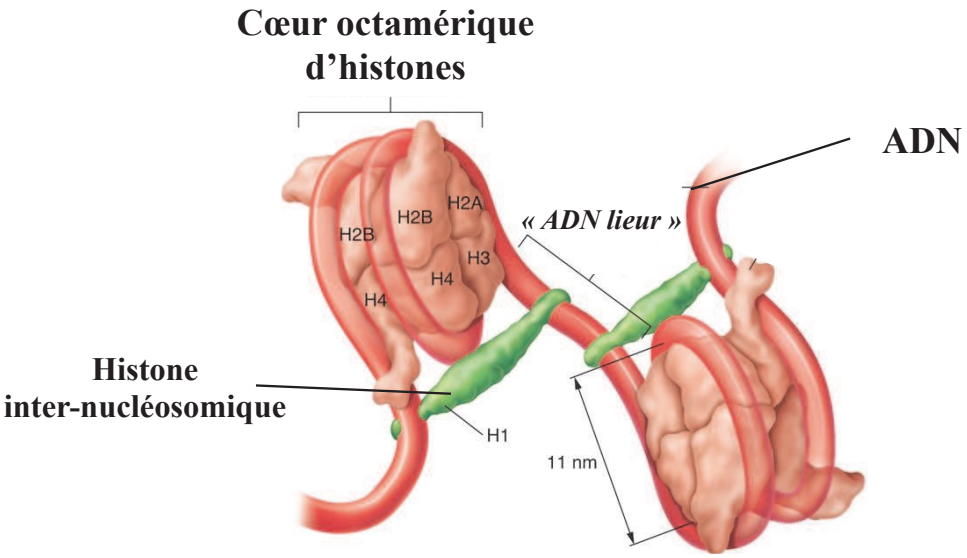


Figure 16 : Enchaînement de nucléosomes dans une structure en « collier de perles ».
(http://geisslerbiologycorner.blogspot.fr)

2. Le nucléosome

Le nucléosome, unité fondamentale de la chromatine, comprend **un cœur octamérique d'histones** autour duquel **146 pb d'ADN** sont enroulées, correspondant à 1,7 tour de superhélice gauche (Luger *et al.,* 1997; Wolffe et Hayes 1999). Le cœur d'histones, dont la structure est très conservée parmi les espèces, est formé d'un hétérotétramère d'histones H3-H4 et de deux hétérodimères d'histones H2A-H2B (Figure 15).

Les nucléosomes adjacents sont espacés par une séquence d'ADN de 10 à 80 pb, appelée « ADN lieur » (*linker DNA*) dont la longueur varie selon le type cellulaire et les espèces, ce qui forme une structure en « collier de perles » (Figure 16). C'est au niveau de cette région que les histones inter-nucléosomiques (H1 ou H5) sont incorporées.

3. Les histones

Les histones sont de petites protéines basiques. Deux types d'histones peuvent être distingués : **les histones « cœurs » nucléosomiques** H2A, H2B, H3 et H4, très conservées au cours de l'Evolution, et **les histones inter-nucléosomiques** H1 (ou H5), beaucoup plus variables.

Les histones « cœurs », similaires structurellement, contiennent un motif caractéristique, le motif « *histone fold* ». Il s'agit d'un domaine globulaire formant le corps du nucléosome. Il permet les interactions entre les histones et l'ADN.

L'extrémité N-terminale (et C-terminale pour H2A) de ces histones, appelée « queue libre », située à l'extérieur du corps du nucléosome, est peu conservée entre les histones et ne présente pas de structures secondaires. Au niveau de ces extrémités, de nombreux acides aminés basiques hautement chargés dont les lysines et les arginines sont retrouvés. Ces résidus seraient responsables de contacts inter-nucléosomiques (Luger *et al.,* 1997; Wolffe et Hayes 1999). Du fait de leur position au sein du nucléosome, ces « queues libres » sont très exposées aux modifications post-traductionnelles.

Outre ces histones « cœurs » canoniques, des variants d'histones peuvent les remplacer au sein du nucléosome dans des contextes spécifiques.

Les histones inter-nucléosomiques, dont la séquence n'est pas reliée à celle des histones « cœurs » et qui existent sous de nombreuses isoformes (Khochbin 2001), sont responsables de l'espacement entre les nucléosomes. Elles forment des structures secondaires de la chromatine en provoquant le rapprochement de nucléosomes adjacents.

II. Les différents mécanismes de régulation épigénétique

Comme déjà cité, la chromatine peut subir différentes modifications épigénétiques qui conduisent à son remodelage local, celui-ci agissant ainsi sur la régulation des fonctions de l'ADN. Ces modifications qui se déroulent indépendamment ou de concert, sont représentées par la méthylation de l'ADN, le remplacement des histones conventionnelles par des variants, le remodelage par des complexes dépendant de l'ATP (adénosine triphosphate) ainsi que les modifications post-traductionnelles des histones.

1. Les modifications de l'ADN

La modification épigénétique de l'ADN la plus fréquente est **la méthylation de la cytosine au niveau du carbone 5 des dinucléotides CpG** (5mC : 5-méthyl-cytosine). Cette modification est catalysée par des enzymes spécifiques, les ADN méthyl-transférases (DNMT, *DNA methyltransferase*) (Robertson 2002; Robertson 2005). Les enzymes DNMT3A et DNMT3B sont responsables de la méthylation *de novo*, alors que DNMT1 assure le maintien de la méthylation de l'ADN au cours des divisions cellulaires (Walton *et al.,* 2011).

Dans les cellules de Mammifères, 60 à 90% des CpG sont méthylés (Tucker 2001), principalement au niveau des régions d'ADN répétés. En revanche, les îlots CpG qui sont des régions d'ADN génomique d'environ 1 kb possédant une forte proportion de G-C et riches en CpG, sont en général hypométhylés. Ils sont trouvés principalement en position 5' de nombreux gènes, au niveau des régions régulatrices. La méthylation de l'ADN est impliquée dans de nombreuses fonctions : la régulation transcriptionnelle, la modulation de la structure chromatinienne, l'inactivation du chromosome X et le maintien de la stabilité du génome.

La méthylation de l'ADN réprime la transcription de deux manières, d'une part directement en inhibant la liaison de l'ADN à des facteurs de transcription, d'autre part,

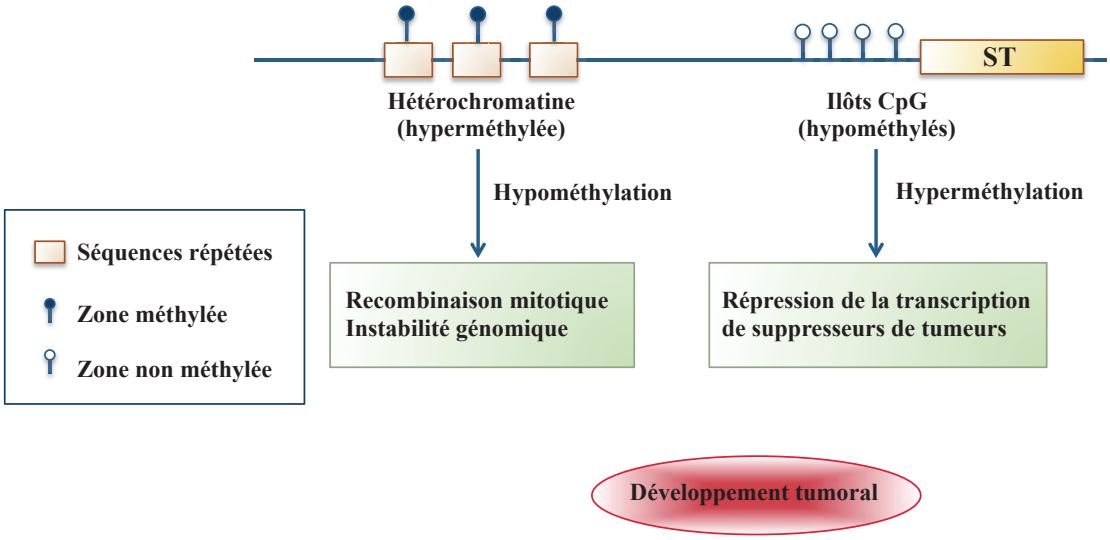


Figure 17 : Dérégulation de la méthylation de l'ADN et lien avec le cancer.

Les zones hyperméthylées sont déméthylées, ce qui conduit à de l'instabilité génomique. Au contraire, certains ilôts CpG sont hyperméthylés menant à la répression transcriptionnelle de certains suppresseurs de tumeurs (ST).

(Robertson, 2005)

indirectement en recrutant des protéines capables de fixer les CpG méthylés, les MBD (*methyl-CpG binding proteins*), ceci induisant une compaction de la chromatine.

L'état de méthylation de l'ADN est réversible puisqu'il peut être déméthylé par les protéines de la famille TET (*ten-eleven translocation*). L'un des états intermédiaires de la déméthylation correspond à la 5-hydroxyméthyl-cytosine (Kriaucionis et Heintz 2009; Globisch *et al.,* 2010). Plus qu'un stade intermédiaire au cours de la déméthylation de l'ADN, cette modification serait une marque épigénétique en elle-même (Münzel *et al.,* 2011).

Il a été démontré que des anomalies de la méthylation de l'ADN étaient un événement oncogénique fréquent. **Dans les cellules tumorales, la machinerie de méthylation de l'ADN peut être altérée**, conduisant à une inversion de la spécificité des régions méthylées et à la cancérogenèse. Ainsi, les régions où l'ADN est répété se retrouvent hypométhylées, entraînant des recombinaisons mitotiques, une instabilité génomique et la réactivation de promoteurs de transposons ou d'oncogènes. A l'inverse, les îlots CpG sont souvent hyperméthylés au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs (Jones 1999; Baylin 2001; Robertson 2001) (Figure 17). TET2, une des enzymes capables de déméthyler l'ADN, est mutée dans des cas de syndromes myélodysplasiques et de LAM (Tan *et al.,* 2013).

2. Les variants d'histones

Les variants d'histones sont des isoformes non alléliques des histones canoniques. Ils sont retrouvés chez tous les eucaryotes et il en existe pour toutes les histones conventionnelles hormis l'histone H4. Ils diffèrent des histones canoniques par des variations de leur séquence en acides aminés. Contrairement à celles-ci, les variants d'histones sont codés par un seul gène peu exprimé et sont incorporés au sein des nucléosomes dans des régions chromatiniennes spécifiques, de façon indépendante de la réplication (Jin *et al.,* 2005; Bernstein et Hake 2006).

Le remplacement d'une histone canonique par un variant participe à la régulation de processus moléculaires tels que la transcription, la réparation de l'ADN, l'assemblage et la ségrégation des chromosomes ou la formation de structures chromatiniennes spécifiques dont le centromère. **Ils agissent en modifiant la structure et la stabilité de la chromatine et/ou en permettant le recrutement de facteurs spécifiques**. Par exemple, l'histone H3.3 est spécifiquement enrichi au niveau de régions transcriptionnellement actives (Wirbelauer *et al.,*

2005; Daury *et al.,* 2006; Jin et Felsenfeld 2006). L'histone H2A.X, variant de H2A, est impliqué dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN (Fernandez-Capetillo *et al.,* 2004). H2A.Z est quant à lui enrichi au niveau de l'hétérochromatine et participe à la stabilité du génome (Rangasamy *et al.,* 2004).

3. Le remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP

Les nucléosomes représentent une formidable barrière pour l'accession des facteurs vers leurs séquences d'ADN cibles. Afin d'entraîner une mobilité de cette structure, des complexes multiprotéiques enzymatiques de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP, induisent une réorganisation locale de la chromatine (Wang *et al.,* 2007). Très conservés entre les espèces, ils possèdent une sous-unité catalytique ATPasique. L'hydrolyse de l'ATP leur permet, grâce à l'énergie libérée, d'annihiler certaines interactions entre les histones et l'ADN. Cela crée des boucles d'ADN n'interagissant plus avec les histones nucléosomiques, ou fait glisser l'octamère d'histones sur l'ADN ou l'enlève. Ces complexes sont également impliqués dans le remplacement des octamères canoniques par des variants.

Ils sont divisés en quatre familles : **SWI/SNF** (*switching defective/sucrose non fermenting*), **ISWI** (*imitation SWI*), **NuRD/Mi-2/CHD** (*nucleosome remodeling and deacetylation/chromodomain, helicase, DNA binding*) et **INO80** (*inositol requiring 80*) (Bao et Shen 2007). En augmentant l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription, ces complexes promeuvent l'activation et l'élongation de la transcription. Dans certains cas, ils ont un effet opposé en favorisant le recrutement de répresseurs transcriptionnels. De plus, ces complexes sont associés à l'assemblage chromatinien après la réplication, le maintien de l'organisation secondaire et tertiaire de la chromatine ainsi qu'à la réparation de l'ADN (Wang *et al.,* 2007).

4. Les ARN non codants

Depuis quelques années il est admis que la majorité du génome non codant est néanmoins transcrit en ARN (ARN non codant) (Birney *et al.,* 2007). Il existe deux classes d'ARNnc, **les petits ARNnc** ciblant des ARN messagers et dont la spécificité d'action est dépendante de la séquence (Hornstein et Shomron 2006) et **les longs ARNnc** qui se fixent au niveau de

séquences régulatrices du génome de manière indépendante de la séquence (Rinn et Chang 2012).

Des exemples de régulation par les ARNnc sont détaillés dans la partie consacrée au contrôle de l'expression des gènes *HOX*.

5. Les modifications post-traductionnelles des histones

Parce qu'elle est exposée à la surface du nucléosome, l'extrémité N-terminale (et C-terminale pour H2A) appelée « queue libre » des histones, est la cible de diverses enzymes catalysant des modifications post-traductionnelles sur des acides aminés précis. Ces modifications, dont la majorité est dynamique, incluent l'acétylation de lysines, la méthylation de lysines et d'arginines, la phosphorylation de sérines et de thréonines, l'ubiquitinylation et la sumoylation de lysines, l'ADP (adénosine diphosphate) ribosylation d'acides glutamiques, la désimination d'arginines, l'isomérisation de prolines (Kouzarides 2007) ou encore la propionylation et la butyrylation de lysines (Chen *et al.,* 2007), et plus récemment mis en évidence la béta-N-acétylglucosamination (Sakabe *et al.,* 2010) (Figure 6).

Ces modifications post-traductionnelles agissent à deux niveaux : premièrement sur la structure et la stabilité de la chromatine permettant un remodelage local, deuxièmement elles permettent le recrutement de protéines reconnaissant spécifiquement une modification (notion de lecture de la chromatine). **Ces modifications représentent une source très riche d'information épigénétique** (Strahl et Allis 2000). Elles ont un rôle très important dans la structure de la chromatine mais également dans la transcription génique, la réparation et la réplication de l'ADN. Seront détaillées ci-après l'acétylation et la méthylation des lysines réalisées par MOZ et MLL, deux des principaux régulateurs du gène *HOXA9*.

a. L'acétylation des lysines

L'acétylation réversible des résidus lysine des histones a été mise en évidence au début des années 1960 (Phillips 1963; Allfrey et Mirsky 1964). Il s'agit d'un processus actif : les enzymes catalysant l'acétylation sont **les histone acétyl-transférases (HAT)** et les enzymes désacétylant les histones sont **les histone désacétylases (HDAC)**, découvertes 30 ans plus tard (Brownell et Allis 1995; Kleff *et al.,* 1995; Bannister et Kouzarides 1996).

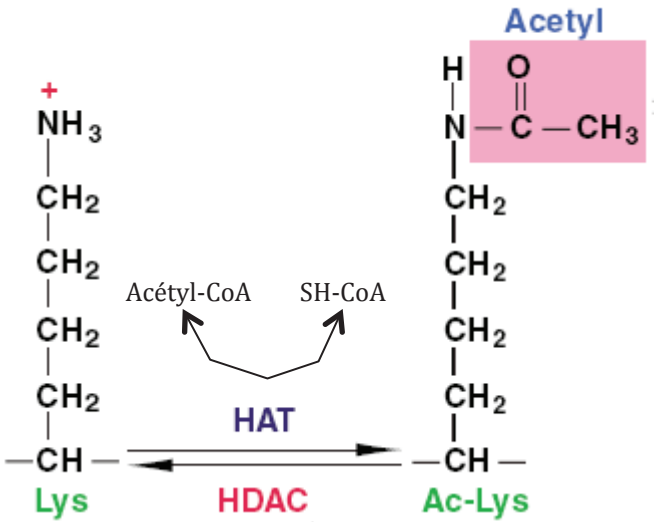


Figure 18 : Acétylation et désacétylation d'une lysine (Lys) d'une histone respectivement par une HAT et une HDAC. Le groupement acétyle est transféré de l'acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) à la lysine pour former une lysine acétylée (Ac-Lys) et le coenzyme A (SH-CoA).

(Adapté de Yang et Seto, 2007)

Les HAT catalysent le transfert d'un groupement acétyle à partir de l'acétyl-CoenzymeA (acétyl-CoA) au niveau du groupement amine (NH3+) (ε-amino) d'un résidu lysine situé sur la « queue » des histones. Les HDAC, quant à elles ôtent le groupement acétyle des résidus lysine acétylés, en générant une molécule d'acétate et un groupement ε-amino (Figure 18).

Le lien entre l'état fonctionnel de la chromatine et les modifications des histones a été établi à travers la démonstration que les *loci* des gènes transcriptionnellement activés sont enrichis en histones acétylées et inversement (Hebbes *et al.,* 1988; Jeppesen et Turner 1993). Deux phénomènes qui ont lieu en parallèle sont envisagés afin d'expliquer ce mécanisme.

D'une part, **une altération des propriétés physico-chimiques** de la chromatine mènerait à cette activation transcriptionnelle. L'acétylation des histones modifie leur charge électrochimique au niveau de l'extrémité N-terminale. Ce changement affaiblirait alors l'interaction entre l'ADN, chargé négativement, et l'histone, conduisant ainsi à l'ouverture de la chromatine et à la facilitation du recrutement de la machinerie de transcription (Hong *et al.,* 1993).

D'autre part, **l'acétylation des lysines est reconnue par différentes protéines**, celles-ci possédant très fréquemment un domaine commun, le **Bromodomaine**. Celui-ci a été identifié en premier lieu chez la Drosophile dans la protéine Brahma. Ce domaine a été depuis décrit dans de nombreuses protéines, parmi lesquelles des HAT et des membres de complexes du remodelage de la chromatine (Haynes *et al.,* 1992; Hudson *et al.,* 2000; Owen *et al.,* 2000). Le Bromodomaine est capable de s'associer avec des histones acétylées (Dhalluin *et al.,* 1999; Jacobson *et al.,* 2000). Chez l'Homme, il existe plus de 30 protéines l'arborant (Yang 2004). Les HAT contenant un Bromodomaine fixent les zones de la chromatine qui sont déjà acétylées, ce qui permettrait le maintien de l'acétylation (Hassan *et al.,* 2002). Le fait que certains membres des complexes de remodelage de la chromatine possèdent un domaine de reconnaissance des lysines acétylées, agirait sur la coordination entre l'acétylation et le remodelage local de la chromatine, favorisant ainsi l'activation de la transcription (Fry et Peterson 2001). Enfin, les protéines à Bromodomaine participent à la sauvegarde des domaines chromatiniens en exerçant un rôle de barrières entre l'euchromatine et l'hétérochromatine (Ladurner *et al.,* 2003). Il est à noter que **le domaine PHD**, connu initialement pour son rôle dans la reconnaissance des histones méthylées, est également capable de s'associer avec des histones acétylées (Yap et Zhou 2010).

Même si l'acétylation des résidus lysine des histones est majoritairement connue pour avoir un effet positif sur la transcription, elle a aussi été montrée comme **pouvant être répressive**. Ainsi, la protéine Chameau, homologue de l'HAT HBO1 de Mammifère, s'associe à des membres du groupe Polycomb afin de réprimer le niveau d'expression de certains gènes *Hox* au cours du développement de la Drosophile (Grienenberger *et al.,* 2002). De plus, chez la Levure, la délétion de Sas2 une HAT de la famille Myst, résulte en une perte de la répression télomérique après la réplication de l'ADN (Meijsing et Ehrenhofer-Murray 2001). PLZF (*Promyelocytic leukemia zinc finger*) est un répresseur transcriptionnel, dont l'acétylation par P300 est nécessaire à son action (Guidez *et al.,* 2005).

Les histones acétyl-transférases font partie le plus souvent de complexes multi-protéiques permettant une spécificité de substrats et de cibles. Certaines HAT acétylent également des protéines non histones tels que des facteurs de transcription. Elles ont été regroupées en cinq familles principales selon leur homologie (Sterner et Berger 2000; Carrozza *et al.,* 2003). **La super-famille GNAT** (*Gcn5-related acetyltransferase*) repose sur l'homologie de la protéine de Levure Gcn5 (*General control non-derepressible*). La protéine **PCAF** de cette famille a été la première protéine de Mammifère identifiée possédant une activité HAT (Yang *et al.,* 1996). **La famille CBP/P300** (*CREB* [*cAMP response element-binding]-binding protein)* agit généralement en tant qu'activateur transcriptionnel (Bannister et Kouzarides 1996). **La famille p160** est composée de co-activateurs des récepteurs nucléaires (Spencer *et al.,* 1997). **La famille des facteurs de transcription généraux** comprend entre autre **$TAF_{II}250$** (TBP-asso*ciated factor of 250 kDa*) (Mizzen *et al.,* 1996), sous-unité du facteur de transcription général TFIID (*transcription factor II D*). La famille MYST (MOZ, Ybf2 (*yeast binding factor 2*)/Sas3 (*something about silencing 3*), Sas2, et TIP60 (*HIV-1 Tat interacting protein 60 kDa*)) partage le domaine MYST responsable de l'activité HAT (Borrow *et al.,* 1996b; Yang et Ullah 2007). Ces enzymes sont capables d'acétyler d'autres substrats que les histones. De nombreux exemples existent, dont l'acétylation de P53 et BRPF1 par MOZ (Ullah *et al.,* 2008; Rokudai *et al.,* 2013), ou de PLZF par P300 (Guidez *et al.,* 2005).

Il existe **deux sous-familles d'histone désacétylases** (HDAC) (Yang et Seto 2007). La première englobe les classes I, II et IV et nécessite le zinc pour leur activité enzymatique. Les membres de la classe I sont exprimés de manière ubiquitaire et font partie de gros complexes à activité enzymatique tels que Sin3, NuRD et CoREST. L'expression des membres de la classe II et IV est variable en fonction du type tissulaire.

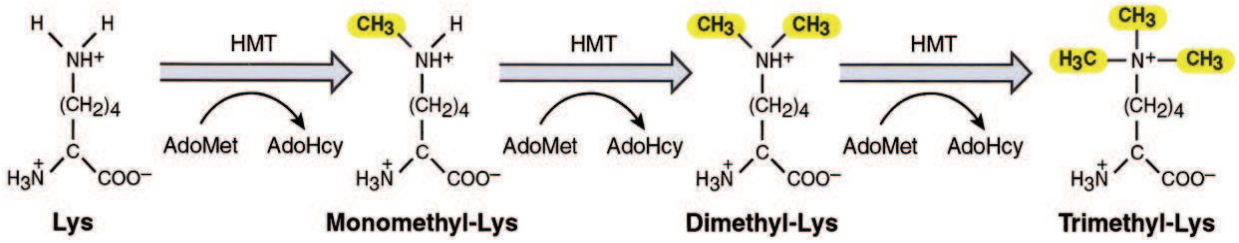


Figure 19 : Méthylations d'une lysine (Lys) d'une histone par une HMT. Les groupements méthyle sont transférés des S-adénosyl-l-méthionines (AdoMet) à la lysine pour donner une lysine méthylée et des S-adénosyl-l-homocystéines (AdoHcy).

(Zhang et Reinberg, 2001)

La seconde sous-famille inclut la classe III, aussi connue sous le nom de Sirtuine. L'activité de ces enzymes est dépendante du co-facteur NAD+. Ces HDAC sont impliquées dans divers mécanismes tels que le vieillissement, le métabolisme, la réponse à un stress cellulaire et les processus tumoraux.

b. La méthylation des lysines

La méthylation des résidus lysine des histones a également été identifiée dans les années 1960 (Allfrey *et al.,* 1964). De même, ce n'est que plusieurs années plus tard que les enzymes responsables de cette modification post-traductionnelle, **les histone méthyl-transférases (HMT)**, ont été isolées (Rea *et al.,* 2000). La méthylation des résidus lysine s'effectue par le transfert d'un groupement méthyle à partir du S-adénosyl-méthionine (AdoMet) au niveau du groupement amine, donnant ainsi un résidu lysine méthylé et une molécule de S-adénosyl-homocystéine (AdoHcy) (Figure 19). Les résidus lysine peuvent être mono-, di- ou tri-méthylés (Zhang et Reinberg 2001). Les sites majeurs de méthylation se situent sur les lysines 4, 9, 27, 36 et 79 de l'histone H3 et 20 et 59 (dans la partie globulaire) de l'histone H4.

Ces modifications post-traductionnelles provoquent soit l'activation soit la répression de la transcription selon le résidu ciblé. Elles n'induisent pas de changements de la charge au niveau de la charge globale de l'histone. Néanmoins, **l'hydrophobie** de la protéine est modifiée, ce qui pourrait influencer l'association entre les histones et l'ADN (Nakayama *et al.,* 2001). Il existe plusieurs familles de protéines capables de reconnaître et de lier les histones méthylés, la méthylation étant reconnue spécifiquement par des protéines possédant soit un domaine de **la famille Royal** (domaines chromo, Tudor ou MBT, *malignant brain tumor*), soit **une répétition de type WD40** soit **un doigt à zinc PHD** (*plant homeodomain-linked*) (Taverna *et al.,* 2007), soit **un chromodomaine** (Eissenberg 2012).

Des analyses globales de méthylation des histones sur le génome ont permis, grâce à la topographie différente des modifications, de révéler leur fonction. Ainsi, la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) est majoritairement présente au niveau des **promoteurs des gènes transcrits** (Barski *et al.,* 2007). TAF3, un membre du facteur de transcription général TFIID reconnaît cette modification spécifique *via* un de ses domaines et permet le recrutement de l'ARN polymérase II (Vermeulen *et al.,* 2007). A l'opposé, **les promoteurs des gènes non transcrits** sont enrichis à la fois par la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3,

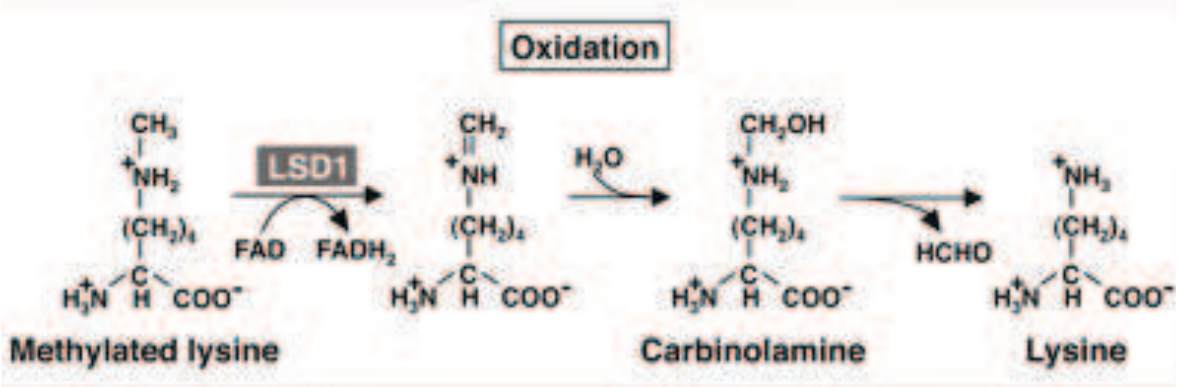


Figure 20 : Déméthylation d'une lysine mono-méthylée d'une histone par LSD1 suivant une réaction d'amino-oxydation en utilisant le FAD (flavine adénine dinucléotide) comme co-facteur. La perte du groupement méthyle passe par la formation d'un intermédiaire imine (1), grâce au FAD et au dioxygène, qui est ensuite hydrolysé (2) spontanément pour donner une lysine déméthylée et du formaldéhyde.
(Tsukada et Nakayama, 2010)

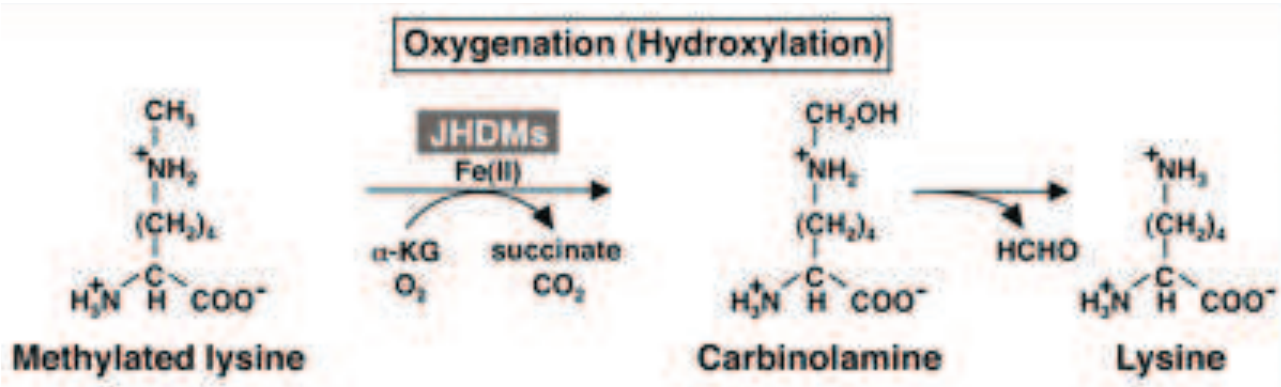


Figure 21 : Déméthylation d'une lysine mono-méthylée d'une histone par JHDM (protéine possédant un domaine JmjC) suivant une réaction d'hydroxylation utilisant le Fer(II) et l'α-cétoglutarate (αKG : *alpha-ketoglutarate*) comme co-facteur. La perte du groupement méthyle passe par la formation, grâce au dioxygène, d'un intermédiaire hydroxyméthylé (1), qui ensuite se dégrade (2) spontanément pour donner une lysine déméthylée et du formaldéhyde.
(Tsukada et Nakayama, 2010)

mais également par celle de la lysine 27 de la même histone (Bernstein *et al.,* 2006). La marque H3K4me3 influence également **la maturation des ARNm** en favorisant le recrutement de la machinerie d'épissage au niveau des gènes ciblés (Sims *et al.,* 2007).

Deux classes d'HMT sont répertoriées à ce jour. **Il s'agit des protéines contenant un domaine SET** (*Su(var)$_{3\text{-}9}$, Enhancer of zeste, trithorax*) **et des HMT sans domaine SET**.

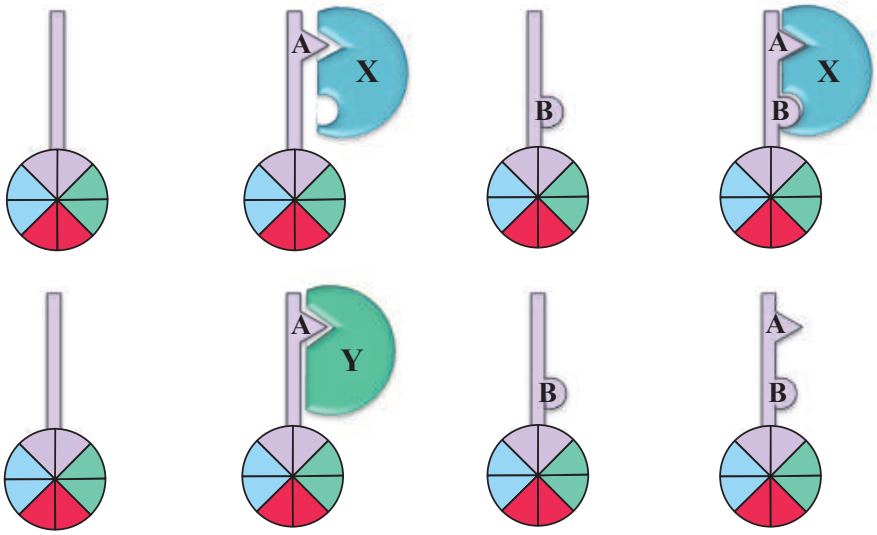
Le domaine SET est un motif conservé d'environ 130 acides aminés, identifié initialement chez la Drosophile dans les protéines Su(var)3-9 (*Suppressor of variegation 3-9*), E(z) (*Enhancer of zeste*) et Trithorax (Dillon *et al.,* 2005). Les protéines à domaines SET sont classées en 7 familles majeures : Suv$_{39}$, Set1, Set2, Ez, RIZ, SMYD, Suv$_{4\text{-}20}$ (Dillon *et al.,* 2005). Les membres de la famille SUV39 ont été les premiers à être caractérisés en tant qu'HMT (Rea *et al.,* 2000).

Les protéines de la famille DOT1 (*disruptor of telomeric silencing*) sont des HMT ne comprenant pas de domaine SET (Feng *et al.,* 2002). Dans l'espèce humaine, la protéine DOT1L (DOT1 *like*) est responsable de la méthylation de la lysine 79 sur l'histone H3 (Nguyen *et al.,* 2011).

La méthylation des lysines est réversible. La première classe **d'histones déméthylases ou KMD** (*lysine demethylase*) possède un domaine arborant une activité amine oxydase dépendante du co-facteur FAD (*flavin adenin dinucleotide*). LSD1 (*Lysine specific demethylase 1*) est la première identifiée (Figure 20) (Shi *et al.,* 2004; Klose *et al.,* 2006; Tsukada et Nakayama 2010). La seconde classe contient le domaine Jmjc (*jumonjiC*) et est capable de déméthyler les mono-, di- et tri-méthylations (Figure 21) (Swigut et Wysocka 2007).

6. Le « code des histones »

En 2001, Thomas Jenuwein et David Allis ont suggéré que l'ensemble des modifications post-traductionnelles des histones constituait un code, le **« code des histones »** dénommé ainsi par analogie au « code génétique » (Jenuwein et Allis 2001; Turner 2002). Une modification unique n'ayant pas de sens biologique, *a contrario*, c'est la combinaison de toutes les modifications post-traductionnelles sur un site particulier de la chromatine qui a une signification. Par exemple, la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est enrichie au



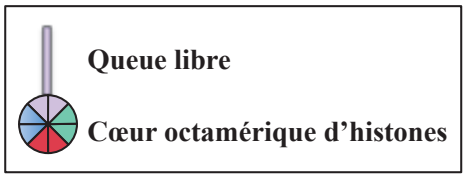


Figure 22 : Représentation schématique de la coopération entre les modifications d'histones à la base de la théorie du « code histone ».

La protéine X reconnaît l'histone portant la modification A, mais a plus d'affinité pour l'histone portant les modifications A et B. A l'inverse, la protéine Y se fixe sur l'histone arborant la modification A seule, la modification B bloquant son interaction.

(Adapté de Rando, 2012)

niveau des promoteurs actifs ou réprimés, selon qu'elle soit seule ou associée à la méthylation de la lysine 27 de la même histone (Bernstein *et al.,* 2006). **Ce phénomène s'explique par le recrutement de complexes protéiques différents, selon la combinaison des modifications associées aux histones** (Figure 22). Ainsi, la protéine Chd1 (*chromodomain helicase DNA binding protein 1*) se fixe à l'histone H3 méthylée sur l'arginine 2 et sur la lysine 4 avec beaucoup plus d'affinité que l'histone H3 seulement méthylée sur la lysine 4 (Fuchs *et al.,* 2011). A l'inverse, le recrutement de HP1 (*heterochromatin protein 1*), au niveau de la tri-méthylation de la lysine 9 sur l'histone H3, est bloqué si la sérine 10 de la même histone est phosphorylée (Fischle *et al.,* 2005).

De nombreuses modifications d'histones existant, les combinaisons possibles sont presque infinies. Or, des études globales ont montré que seule une petite fraction des combinaisons possibles est identifié *in vivo*. Le « code histone » semble donc être limité (Kharchenko *et al.,* 2011; Rando 2012).

7. L'hérédité cellulaire des marques épigénétiques

Le fondement même de l'épigénétique repose sur le fait que ces modifications sont héritables au cours des divisions cellulaires.

La conservation de **la méthylation de l'ADN** est bien comprise. Les méthylations sont symétriques au niveau de la double hélice d'ADN. En conséquence, au cours de **la réplication semi-conservatrice**, chaque molécule d'ADN synthétisée, reçoit du brin hérité l'information de la position des méthylations, qui va être dupliquée sur le brin néo-synthétisé grâce à la DNMT1, recrutée *via* les méthylations situées sur l'autre brin (Figure 23A) (Leonhardt *et al.,* 1992).

Inspirée de ce modèle, l'hypothèse de « **l'héritabilité semi-conservative des modifications post-traductionnelles des histones** » a été émise (Figure 23B). Elle repose sur deux postulats qui n'ont pas été avérés, voire contredits.

Premièrement, ces hypothèses supposent que **les modifications post-traductionnelles des histones soient symétriques**, c'est-à-dire que les histones H3 ou H4 portent les mêmes modifications au sein du nucléosome. **Ceci n'a jusqu'ici pas été vérifié.** Deuxièmement, il

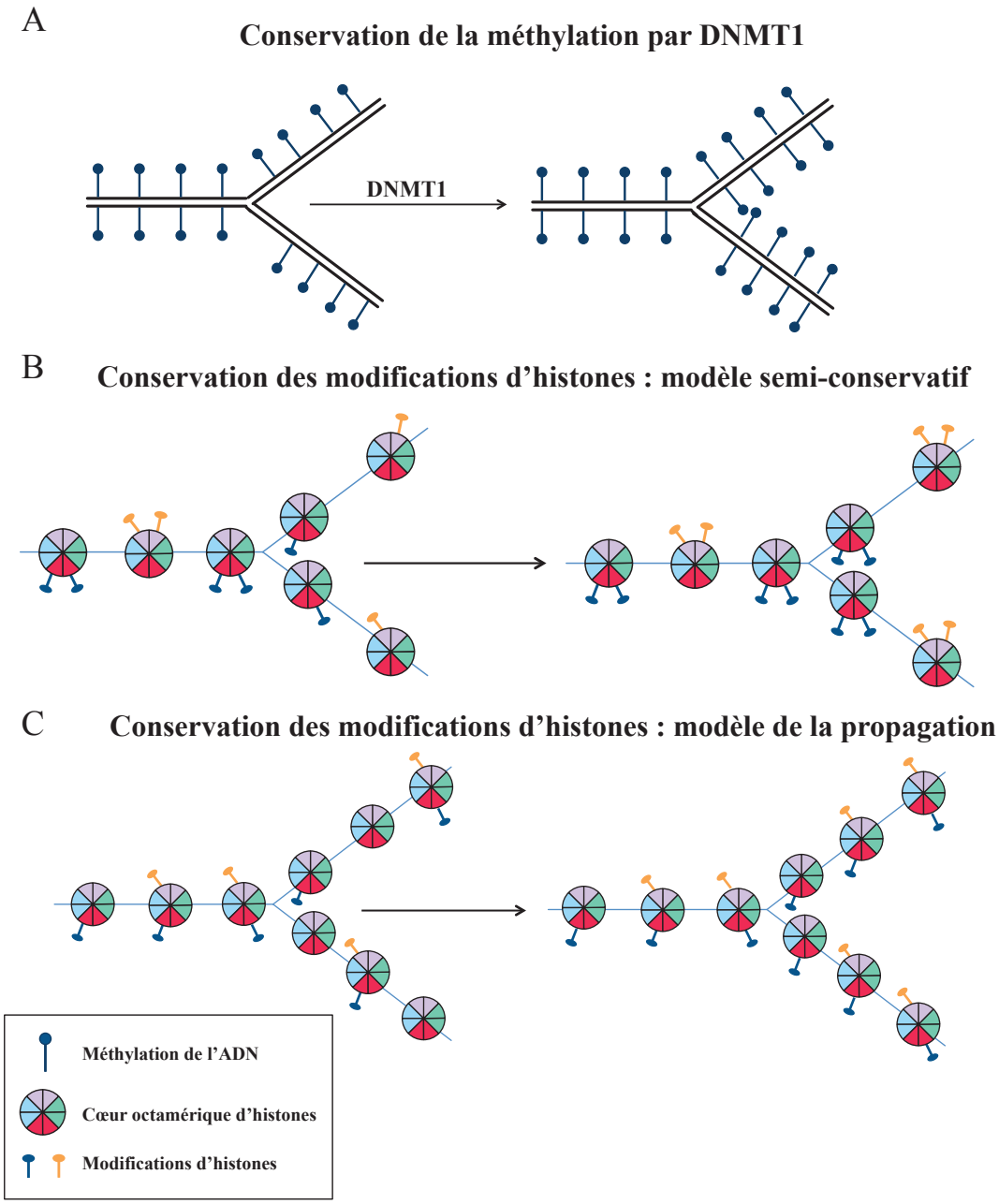


Figure 23 : Différents modèles afin d'expliquer l'hérédité des modifications épigénétiques. (Adapté de Rando, 2012)

A. Au cours de la réplication, chaque molécule d'ADN synthétisée reçoit du brin hérité l'information de la position des méthylations, qui va être dupliquée sur le brin néo-synthétisé grâce à la DNMT1.
B. Selon l'hypothèse de « l'héritabilité semi-conservative », chaque molécule d'ADN nouvellement synthétisée contient les nucléosomes portant la moitié des modifications post-traductionnelles.
C. Selon le modèle « d'héritabilité par propagation », chaque nucléosome portant des modifications sert de tremplin aux machineries enzymatiques qui propagent alors les modifications aux nucléosomes voisins, non modifiés.

faut que les nucléosomes soient intégrés au niveau de la nouvelle structure chromatinienne de **manière semi-conservatrice**, c'est-à-dire que le nucléosome soit divisé au cours de la réplication, afin que chaque nouveau nucléosome porte une histone de chaque type avec les modifications post-traductionnelles (Weintraub *et al.,* 1976). Ainsi, chaque molécule d'ADN nouvellement synthétisée contient les nucléosomes portant la moitié des modifications post-traductionnelles, qui recrutent alors les enzymes afin de rétablir la symétrie dans ces modifications.

Il a été démontré par des méthodes de **marquages radioactifs des histones** que le nucléosome n'est pas hérité de cette manière. Au contraire, chaque molécule d'ADN néo-formé reçoit la moitié des nucléosomes « pères » et la moitié des nucléosomes « vierges », ne portant pas de modifications (Leffak *et al.,* 1977). Ainsi, chaque nucléosome portant des modifications sert de tremplin et de modèle aux machineries enzymatiques qui **propagent alors les modifications** aux nucléosomes voisins, non modifiés. C'est le modèle « d'héritabilité par propagation » (Figure 23C) (Zhu et Reinberg 2011).

D. MOZ et MLL, deux enzymes épigénétiques impliquées dans le contrôle de l'expression des gènes *HOX*

Notre équipe s'est focalisée sur deux protéines modifiant les histones, impliquées dans la régulation du gène *HOXA9*, et qui sont des cibles de réarrangements chromosomiques conduisant à des leucémies aiguës, MOZ et MLL, l'une appartenant à la famille MYST des HAT et l'autre appartenant au complexe Trithorax.

I. MOZ, Monocytic leukaemia zinc finger protein

1. Généralités

***MOZ* a été identifié par le clonage des gènes issus de la translocation (8;16)(p11;p13)** de leucémies aiguës myéloblastiques (Borrow *et al.,* 1996b). Cette anomalie cytogénétique est très rare au cours des LAM puisqu'elle n'est retrouvée que dans environ 0,5% des cas. Elle est principalement présente chez de jeunes patients et elle est associée à un pronostic défavorable. Il a été démontré que la protéine de fusion résultante de cette translocation entraînait un blocage de la différenciation au stade myélo-monocytaire (Kitabayashi *et al.,* 2001). Lors du clonage, *CBP*, gène déjà connu et codant pour un co-activateur de la transcription, a été identifié au niveau de la cassure 16p11. Au niveau de la cassure 8p13, les auteurs mirent en évidence un gène encore inconnu qu'ils nommèrent MOZ. Il est localisé sur le bras court du chromosome 8 en position 11 et s'étend sur 122 509 paires de bases (pb). Ce gène est composé de 18 exons, les deux premiers ainsi qu'une partie des 3ème et 18ème étant non codants. L'ARNm de MOZ, constitué de 9 285 pb dont 6 012 pb codantes, génère une protéine de 2 004 acides aminés (AA) de masse moléculaire proche de 225 kDa.

La protéine MOZ humaine, KAT6A (*lysine acetyltransferase 6A*) ou MYST3 selon la nouvelle nomenclature des enzymes modifiant les histones, a des orthologues très proches structurellement, notamment chez la Souris et le Poisson-Zèbre. Chez la Souris, le gène *Moz* s'étend sur 83 724 pb et comporte également 18 exons. Il code un ARNm de 9 126 pb dont 6 009 pb codantes, qui est traduit en une protéine de 2 003 AA présentant 88,8% d'identité et 93,1% de similarité avec la protéine MOZ humaine. Chez le Poisson-Zèbre, le gène *moz* s'étend sur 48 802 pb et comporte 16 exons. Il code un ARNm de 7 800 pb dont 6 738 pb

Figure 24 : Représentation schématique de la protéine MOZ humaine.

Différents domaines sont retrouvés dans MOZ.

NEMM : *N-terminal part of Enok, MOZ or MORF*

PHD : *Plant homology domain*

ED : Domaine acide, riche en glutamate et aspartate

SM : Région riche en sérine et méthionine

PQ : Région riche en proline et glutamine

codantes, qui produit une protéine de 2 246 AA présentant 53,2% d'identité et 62,5% de similarité avec la protéine MOZ humaine.

a. La famille MYST

MOZ est une histone acétyl-transférase de la famille MYST. Cette famille compte trois membres chez la Levure, Ybf2/Sas3, Sas2 et Esa1 (*essential Sas2-related acetyltransferase 1*), cinq membres chez l'Homme (et les Mammifères), TIP60 (orthologue d'Esa1), MOF (*male-absent on the first* ou MYST1) similaire fonctionnellement à Sas2, HBO1 (*HAT bound to ORC1* [*origin recognition complex 1*], ou MYST2), MOZ, MORF (*MOZ-related factor*, ou MYST4, et Querkopf chez la Souris) et 5 chez la Drosophile, dTIP60, Mof, dHBO1 (ou Chameau), Enok (*Enoki mushroom*) et CG1894. Des protéines de la famille MYST existent chez la plante *Arabidopsis thaliana*, le nématode *Caenorhabditis elegans*, ou encore le protozoaire *Toxoplasma gondii*.

Les membres de la famille MYST possèdent tous **un domaine MYST très conservé**, responsable de l'activité acétyl-transférase (de 36 à 77% d'identité et de 54 à 84% de similarité). Hormis le domaine MYST, les membres de cette famille présentent une grande diversité de structures et de fonctions. Divers domaines structuraux sont retrouvés chez certains membres de la famille MYST dont des chromodomaines (pour Esa1, MOF, TIP60) ou des doigts à zinc PHD (pour Enok, MOZ, MORF). Les HAT de la famille MYST agissent au sein de complexes multi-protéiques conservés au cours de l'Evolution. Elles sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation transcriptionnelle, le cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation et la réplication de l'ADN (chez la Drosophile par MOF).

b. Organisation de la protéine MOZ

MOZ est composée de différents domaines (Figure 24) :

- le domaine NEMM (*N-terminal part of Enok, MOZ or MORF*) : Ce domaine est commun à deux autres membres de la famille MYST, à savoir la protéine Enok de Levure et la protéine MORF. Au niveau de la partie C-terminale du NEMM, le domaine H15 (*domain in histones H1 and H5*) a été découvert. Ce domaine serait impliqué dans **la localisation nucléaire** de MOZ (Kitabayashi *et al.,* 2001).

- deux doigts à zinc de type PHD (C4HC3) : Comme précédemment évoqué, il a été montré que ces doigts à zinc sont capables **de fixer les lysines méthylées** (Kouzarides 2007). De manière intéressante, il a été récemment rapporté que les deux domaines PHD de MOZ reconnaissent l'histone H3 non modifiée, ou acétylée sur la lysine 14, ce qui facilite probablement, par exemple, le recrutement de MOZ sur le promoteur du gène HOXA9 (Qiu *et al.,* 2012).

- le domaine MYST : **Il porte l'activité acétyl-transférase** (Champagne *et al.,* 2001; Kitabayashi *et al.,* 2001). Il comprend au centre le site catalytique présentant un motif de liaison à l'acétyl-coenzyme A et en N-terminal un doigt à zinc atypique de type C2HC, les deux étant nécessaires à l'activité HAT. Le doigt à zinc C2HC semble être impliqué dans la liaison au nucléosome, à l'instar de MOF (Akhtar et Becker 2001). Il a été montré que le domaine MYST de MOZ pouvait se lier *in vitro* à l'ADN *via* son doigt à zinc C2HC et qu'un motif hélice-boucle-hélice situé dans la partie C-terminale ne s'opposait pas à son activité catalytique (Holbert *et al.,* 2007). Cependant, il n'a pas été mis en évidence jusqu'ici que MOZ pouvait fixer l'ADN dans un contexte physiologique, ni le rôle potentiel de cette fixation. En outre, le doigt à zinc C2HC essentiel à l'activité acétyl-transférase, permet la reconnaissance du substrat (Yan *et al.,* 2000).

- une longue région acide riche en résidus glutamate et aspartate (ED) : Elle pourrait avoir un rôle dans **la liaison de MOZ avec les histones**. Certaines cassures chromosomiques ont lieu dans ce domaine.

- une région riche en résidus sérine et méthionine (SM) : Elle est entrecoupée d'une succession de résidus de prolines et de glutamines (PQ). La protéine MOZ humaine possède un paralogue très voisin, la protéine MORF (*MOZ-related factor* ou MYST4, ou KAT6B, et Querkopf chez la Souris) composée de 1 781 AA. Celle-ci possède 60% d'identité et 66% de similarité avec MOZ. Elle en est très proche structurellement puisqu'elle est constituée des mêmes domaines que MOZ, hormis la suite de résidus de prolines et de glutamines (PQ).

Le domaine NEMM, les PHD ainsi que le domaine acide ED, lorsqu'ils sont fusionnés au domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription Gal4 (*galactose 4*) de Levure, ont des propriétés de répression transcriptionnelle d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de séquences de fixation de Gal4. A l'inverse, le domaine C-terminal (SM) est capable d'activer la transcription (Champagne *et al.,* 2001; Kitabayashi *et al.,* 2001).

MOZ est exprimée dans de nombreux tissus mais sa régulation transcriptionnelle n'est pas encore caractérisée. Dans des cellules souches embryonnaires humaines, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivies d'une analyse par puces à ADN, ont identifié les séquences d'ADN cibles des trois facteurs de transcription suivants, OCT4 (*Octamer 4*), SOX2 (*SRY* [*sex determining region Y*]-*box 2*) et NANOG, facteurs clefs pour l'auto-renouvellement et le maintien de la pluripotentialité de ces cellules (Boyer *et al.,* 2005). Ces trois protéines ont été notamment localisées au niveau de l'intron 1 du gène *MOZ*. Ceci suggère l'implication de cette séquence dans la régulation transcriptionnelle de *MOZ* et un rôle de MOZ dans les cellules souches embryonnaires humaines.

La protéine MOZ est localisée dans le noyau cellulaire. Dans la plupart des cellules, elle est partiellement concentrée au niveau de compartiments nucléaires (*speckles*) distincts des compartiments d'épissage (*splicing speckles*), des corps de Cajal (*Cajal bodies*), des « corps *PML* (*promyelocytic leukemia protein*) » ou des « *paraspeckles* », alors qu'elle est exclue du nucléole (Kindle *et al.,* 2005).

2. Modèles murins d'invalidation de MOZ

Des modèles de souris portant des mutations de MOZ ont été générés afin de déterminer ses fonctions. Les trois actuellement décrits sont le fruit de stratégies de ciblages différentes.

Le premier modèle a été mis au point dans **l'équipe d'Issay Kitabayashi** (Katsumoto *et al.,* 2006). La stratégie utilisée a consisté à cibler le gène *Moz* à partir du deuxième exon, en le remplaçant par le gène codant pour la néomycine phosphotransférase (neo). Dans les souris homozygotes, l'ARNm et la protéine Moz ne sont pas détectables. Ainsi, cette stratégie conduit à la perte totale de Moz. Cette délétion est létale au stade embryonnaire du fait de défauts hématopoïétiques qui seront détaillés ci-après.

Le deuxième type de souris, créé par **le groupe de Tim Thomas et Anne Voss** (Thomas *et al.,* 2006; Voss *et al.,* 2009), réside dans l'insertion du gène *neo* au niveau de l'exon 16 de *Moz*. De manière surprenante, l'ARNm de *Moz* est détectable alors que la protéine ne l'est pas dans ces souris. Contrairement au premier modèle, elles meurent à la naissance du fait d'un problème d'oxygénation provoqué par des défauts de l'aorte. Ces souris sont aussi plus petites et outre des altérations de l'hématopoïèse, présentent des anomalies cranio-faciales.

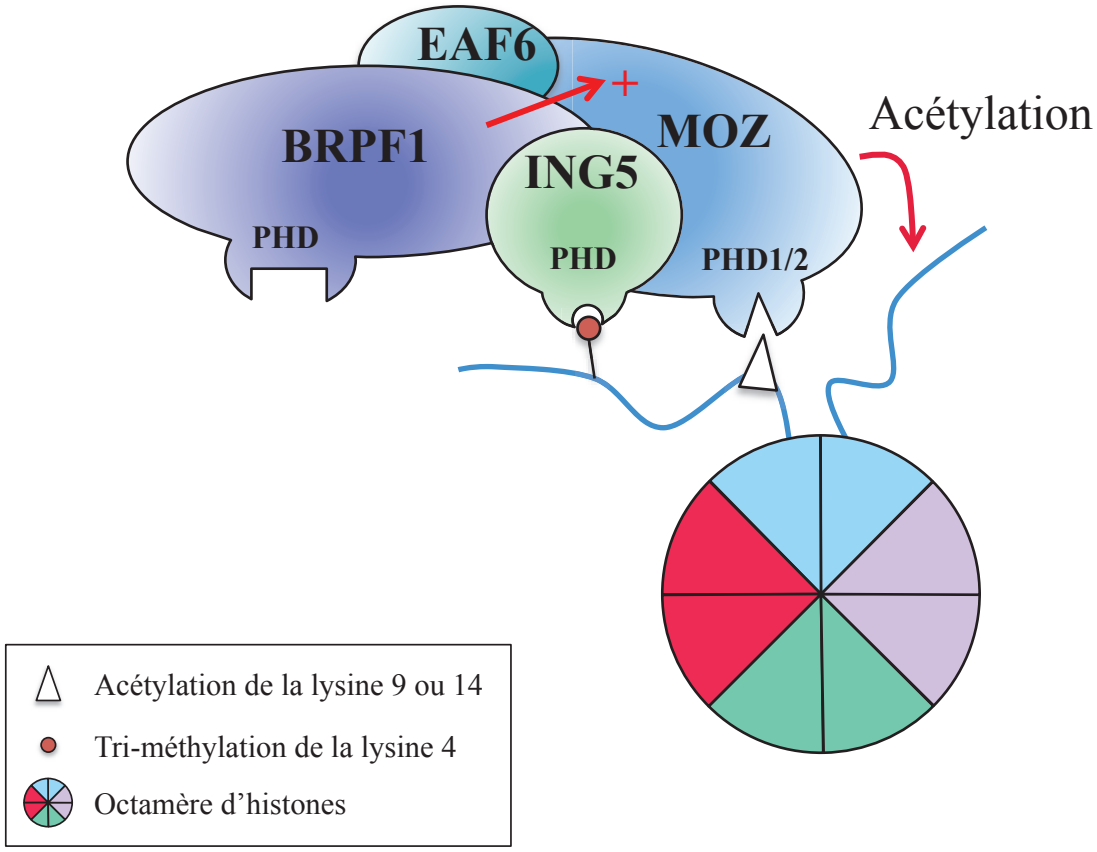


Figure 25 : Représentation schématique du complexe tétramérique de MOZ.

Alors qu'ING5 reconnaît la tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 4, le domaine PHD de MOZ se lie à cette histone acétylée sur la lysine 9 ou 14. Le complexe est recruté *via* ces modifications d'histones. BRPF1 active l'activité HAT de MOZ, qui peut alors acétyler soit la queue libre de l'histone du même nucléosome, soit celle d'un nucléosome adjacent.

(D'après Muzaffar et al., 2012)

Le troisième modèle provenant **du laboratoire de Georges Lacaud** a quant à lui été généré afin de déterminer le rôle de l'activité HAT de MOZ *in vivo* (Perez-Campo *et al.,* 2009). Il repose sur la mutation d'un nucléotide au niveau du domaine MYST de MOZ, conduisant ainsi à la production de la protéine dépourvue de son activité HAT. Des défauts dans la fonction des CSH sont observés, et 40% de ces souris meurent après l'âge de 6 mois.

3. MOZ est une histone acétyl-transférase

a. MOZ possède une activité HAT in vitro et in vivo

Par des tests d'acétylation *in vitro*, il a été démontré que MOZ était capable d'acétyler les histones H3, H4 et H2A (Champagne *et al.,* 2001). La même année, Issay Kitabayashi et ses collègues ont déterminé que les **lysines 14 de l'histone H3 et 5, 8, 12 et 16 de l'histone H4 sont acétylées *in vitro*** par le domaine HAT de MOZ (Kitabayashi *et al.,* 2001). De manière inattendue, l'invalidation de *Moz* dans des souris a permis d'observer que Moz est essentielle à **l'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 *in vivo***, au niveau des gènes *Hox* (Voss *et al.,* 2009). Lorsqu'il est présent sous la forme de complexe (cf ci-dessous), MOZ acétyle la lysine 14 de l'histone H3 (Doyon *et al.,* 2006).

b. Le complexe tétramérique de MOZ

MOZ appartient à un complexe composé de quatre sous-unités, appelé le « quatuor ». Il est composé des protéines **ING5** (*inhibitor of growth 5*), un des suppresseurs de tumeur **BRPF1, 2 ou 3** (*Bromodomain- and PHD-finger-containing protein 1, 2 ou 3*) et **EAF6** (*Esa1-associated factor 6 ortholog*). Au sein de ce complexe, MOZ semble acétyler la lysine 14 de l'histone H3 (Doyon *et al.,* 2006). BRPF1 promeut l'activité HAT de MOZ et a une fonction centrale dans l'association entre les 4 protéines (Figure 25) (Ullah *et al.,* 2008; Ali *et al.,* 2012). Moz et Ing5 participent à la régulation du niveau d'expression du gène *tbx1* (*T-box DNA binding transcription factor 1*) qui est la cible d'une délétion chromosomique dans le syndrome de DiGeorge, maladie héréditaire comportant des défauts cardiaque et aortique ainsi qu'une atteinte du développement cranio-facial (Voss *et al.,* 2012).

4. MOZ est un activateur transcriptionnel

MOZ s'associe avec des facteurs de transcription et agit en tant que co-activateur transcriptionnel. Certains d'entre eux sont spécifiques de l'hématopoïèse, d'autres non.

a. RUNX1

RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*), précédemment appelé AML1 (*acute myeloid leukemia1*), est un facteur de transcription agissant en coopération avec son co-facteur CBFβ (*core binding factor beta*) (Hart et Foroni 2002). Il peut agir en tant qu'activateur ou répresseur selon les co-facteurs qui lui sont associés. Il se fixe sur la séquence consensus TGT/cGGT et est recruté au niveau de nombreux promoteurs de gènes impliqués dans l'hématopoïèse, tels que ceux codant pour la myéloperoxydase (Nuchprayoon *et al.,* 1994) ou pour des cytokines hématopoïétiques (Takahashi *et al.,* 1995). **RUNX1 est un facteur essentiel de l'hématopoïèse primitive** (Okuda *et al.,* 1996; Lacaud *et al.,* 2002).

MOZ interagit avec RUNX1 en agissant en tant que co-activateur transcriptionnel. De manière surprenante, le domaine HAT de MOZ n'est pas requis dans cette fonction de co-activation transcriptionnelle au niveau du gène de la *Myéloperoxydase*. C'est en effet la région N-terminale de MOZ qui est nécessaire à cette fonction (Kitabayashi *et al.,* 2001). MOZ et RUNX1 activent également la transcription de *MIP-1α* (*macrophage inflammatory protein-1 alpha*), un inhibiteur de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (Bristow et Shore 2003). La phosphorylation de MOZ et de RUNX1 par la kinase HIPK2 (*homeodomain-interacting protein kinase 2*) amplifie la coopération entre les deux protéines, suggérant ainsi un rôle important de la régulation post-traductionnelle dans la fonction de co-activateur transcriptionnel de MOZ (Aikawa *et al.,* 2006).

b. Spi-1/PU.1

Spi-1/PU.1 est un facteur de transcription de la famille ETS (*E-twenty six*), exclusivement exprimé dans les cellules hématopoïétiques. Les souris nullizygotes pour *Spi-1/Pu.1* montrent des défauts dans le développement des lignages lymphocytaires B et T, monocytaire et granulocytaire (Scott *et al.,* 1994; McKercher *et al.,* 1996). Il est également

essentiel au maintien et à l'expansion des CSH primitives (Kim *et al.,* 2004) et adultes (Iwasaki *et al.,* 2005).

Les défauts hématopoïétiques observés dans les souris comportant une interruption du gène *Moz* (qui seront détaillés plus loin dans ce manuscrit) sont proches de ceux observés dans les souris invalidées pour *Spi-1/Pu.1*, ce qui a suggéré aux auteurs de ces travaux une association possible entre ces deux protéines. Il s'avère que celles-ci interagissent. Moz est capable de co-activer *in vitro* la transcription du gène codant pour le récepteur au M-CSF (M-CSFR ou cfms (*Cellular-Feline McDonough sarcoma*)) en coopération avec Spi-1/Pu.1 (Katsumoto *et al.,* 2006).

c. P53

La protéine P53 est un facteur de transcription dont les fonctions cellulaires sont très bien étudiées. Parmi celles-ci, il est démontré que lors de dommages à l'ADN, elle active la transcription de différents gènes cibles, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire, permettant alors soit une réparation de l'ADN, soit une mort cellulaire, afin d'éviter la propagation de mutations. Ce sont ces mécanismes qui lui ont valu le surnom de **« gardienne du génome »** (Efeyan et Serrano 2007). Un de ses gènes cibles agissant sur le contrôle du cycle cellulaire est *p21*.

La recherche de nouveaux partenaires de MOZ a révélé son interaction avec P53. Cette association est amplifiée par les dommages à l'ADN induisant l'activation du gène *p21* (Rokudai *et al.,* 2009). PML (*Promyelocytic leukaemia*) fait office de co-facteur transcriptionnel dans l'interaction entre MOZ et p53. Ainsi, il promeut l'acétylation de p53 par MOZ, stimulant la transcription du gène *p21* (Rokudai *et al.,* 2013).

d. RUNX2

RUNX2 (anciennement AML3) est impliqué dans la formation des ostéoblastes. Le domaine SM de MOZ porte la fonction de co-activation de ce facteur de transcription (Pelletier *et al.,* 2002).

e. NF-kB

NF-kB, un facteur de transcription composé de différentes sous-unités, favorise la survie cellulaire. Dans les cellules souches leucémiques, il est souvent constitutivement activé (Guzman *et al.,* 2001). Le domaine HAT de MOZ est capable de stimuler l'activité transcriptionnelle de NF-kB (Chan *et al.,* 2007).

f. Nrf2/MafK

MOZ serait impliqué dans la carcinogenèse hépatique en augmentant l'activité de l'hétérodimère Nrf2/MafK (Ohta *et al.,* 2007).

g. ETV6

ETV6 ((*ETS* (*E-twenty six*) *variant gene 6*) anciennement nommée TEL (*translocation ETS leukemia (translocation ETS leukemia*)) est un facteur de transcription réarrangé dans des translocations chromosomiques responsables de différents cas de leucémies. MOZ serait un de ses co-activateurs (Putnik *et al.,* 2007).

h. c-JUN

Chez le Rat, la protéine Moz comprend 89% d'identité avec son homologue humain et interagit *in vitro* avec le facteur de transcription c-jun, connu pour son rôle dans la prolifération, l'apoptose, la survie cellulaire et le développement tumoral (Ohta *et al.,* 2005). Il serait intéressant de vérifier si dans l'espèce humaine MOZ interagit également avec c-JUN.

i. Rôle des activités HAT dans la co-activation transcriptionnelle

Il s'avère que l'activité HAT de MOZ n'est pas nécessaire pour son rôle de co-activateur avec RUNX1 (Kitabayashi *et al.,* 2001), alors qu'elle l'est pour la co-activation dépendante de NF-KB (Chan *et al.,* 2007). D'autres protéines ont une fonction HAT qui est facultative selon le contexte étudié. Ainsi, les activités de Cbp et de p300 sont nécessaires à leur co-activation transcriptionnelle en association avec le facteur de transcription c-Maf (Chen *et al.,* 2002). Néanmoins, dans les modèles murins d'invalidation de *Cbp* et de *p300* dans le rhombencéphale, il a été observé une réduction des marques d'acétylation des histones réalisées

par ces enzymes au niveau de nombreux promoteurs, ce qui n'est pas forcément corrélé à une baisse du niveau d'expression des gènes ciblés (Valor *et al.,* 2011; Bedford et Brindle 2012). Par conséquent, la fonction de l'activité HAT des différents co-facteurs semble être dépendante du promoteur ciblé, et donc du facteur de transcription associé. Nous pouvons supposer que la présence de plusieurs protéines à activité HAT au sein d'un même complexe pourrait rendre leur activité redondante dans leur effet sur la chromatine. PCAF, P300 et CBP sont connues pour être intégrées dans le même complexe co-activateur des récepteurs aux œstrogènes (Moggs et Orphanides 2001). Dans ce cas, le rôle principal des HAT serait par exemple de recruter d'autres protéines nécessaires à l'activation trancriptionnelle.

5. Rôle de MOZ dans l'embryogenèse

Que ce soit chez le Poisson-Zèbre, la Drosophile ou les Mammifères, les gènes *HOX* sont responsables de la mise en place et de la détermination des différentes structures au cours du développement. L'analyse d'une banque de mutants de Poisson-Zèbre a permis de mettre en évidence que **la mutation de *moz* provoque des anomalies homéotiques**, associées à une perte du maintien de l'expression des gènes *hox* des *clusters* 1 à 4 (Miller *et al.,* 2004; Crump *et al.,* 2006). Lors du développement du Poisson-Zèbre, brpf1 est requis pour l'acétylation des histones et le maintien du niveau d'expression des gènes *hox*. Il s'avère que brpf1 interagit avec moz, comme chez les Mammifères, ce qui conduit à l'acétylation des histones. En sus, à l'opposé de moz, brpf1 reste associé à la chromatine au cours des divisions cellulaires, maintenant la conservation du patron d'expression des gènes *hox* lors des mitoses successives qui se déroulent durant le développement (Laue *et al.,* 2008). Les anomalies du développement associées aux mutations de *moz* ou de *brpf1* sont contenues dans les régions de la tête.

L'étude des souris mutantes de *Moz* de l'équipe de Tim Thomas et d'Anne Voss, révèle aussi des défauts du développement corrélés à un défaut global de l'expression des gènes *Hox*. **Les anomalies homéotiques liées à une perte d'expression de *Moz* s'étendent de la nuque au thorax**, alors que chez le Poisson-Zèbre, elles sont limitées à la région de la tête. Ces défauts sont partiellement compensés par le traitement des embryons avec de l'acide rétinoïque, démontrant ainsi que le mode d'action de cette hormone dans l'activation de l'expression des gènes *Hox* est indépendante de Moz (Voss *et al.,* 2009). Les souris mutantes de l'équipe d'Issay Kitabayashi sont également déficientes au niveau du développement. Elles arborent des

malformations au niveau du squelette antérieur, associées à une baisse de l'expression des gènes *Hox* (Katsumoto *et al.,* 2006).

L'ensemble de ces résultats indique que MOZ, une enzyme impliquée dans les mécanismes épigénétiques, est responsable du maintien du niveau d'expression de certains gènes *HOX* au cours du développement, ce qui révèle des caractéristiques des gènes du groupe Trithorax.

6. Rôle de MOZ dans l'hématopoïèse

Vu les circonstances de la découverte du gène *MOZ* et son rôle de co-activateur de facteurs de transcription importants dans l'hématopoïèse, il était logique d'envisager un rôle majeur au cour de la différenciation hématopoïétique, ce qu'a confirmé l'étude des différents modèles murins mutants de *Moz*.

Les deux types de souris invalidées pour *Moz* affichent un phénotype hématopoïétique très voisin. Une baisse du nombre de cellules composant les organes hématopoïétiques primitifs dont le foie fœtal est observée. Parmi elles, **le nombre de CSH et de précurseurs des différents lignages est diminué** bien que ces cellules conservent leur potentiel de différenciation. Les CSH primitives perdent leur capacité à reconstituer une hématopoïèse normale après transplantation dans des souris irradiées. Dans les cellules matures, une réduction des lignages érythroïde et lymphoïde est mise en évidence, et *a contrario* les monocytes et les granulocytes sont augmentés. Ces altérations, particulièrement celles concernant les CSH, s'expliquent par une baisse du taux d'expression des gènes *Hoxa9*, *c-Kit* et *c-MPL*, gènes clefs dans le maintien des CSH.

Dans les souris dont l'activité HAT de Moz est abolie, des anomalies similaires sont notées, notamment une baisse du nombre des CSH et de leur fonction lors d'une reconstitution de l'hématopoïèse à long terme, ainsi qu'un amenuisement du nombre de lymphocytes T.

L'ensemble de ces souris présentent des phénotypes atténués comparés aux souris nullizygotes pour les facteurs de transcription Runx1 ou Spi-1/Pu.1 (Growney *et al.,* 2005; Kastner et Chan 2008), soulignant le fait que ces facteurs de transcription ne sont pas totalement inactifs en absence de Moz.

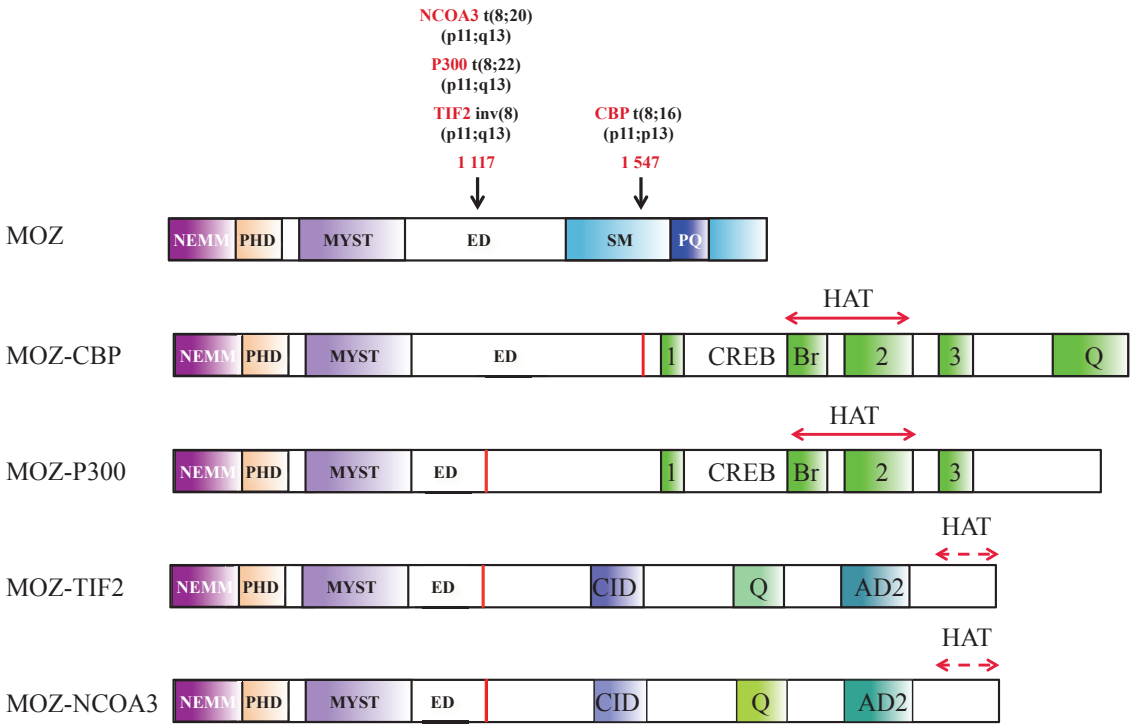


Figure 26 : Représentation schématique de la protéine MOZ humaine et des protéines de fusion de MOZ.

NEMM : *N-terminal part of Enok, MOZ or MORF*
PHD : *Plant homology domain*
ED : Domaine acide, riche en glutamate et aspartate
1, 2, 3 : Domaines riches en cytidine et histidine
Br : Bromodomaines
CREB : Domaine de liaison à l'AMP cyclique
CID : *CBP interacting domain*
AD : Domaine d'activation
Q : Région riche en glutamine
HAT : Domaine histone acétyl-transférase, flèche pleine : validé, flèche en pointillé : supposé

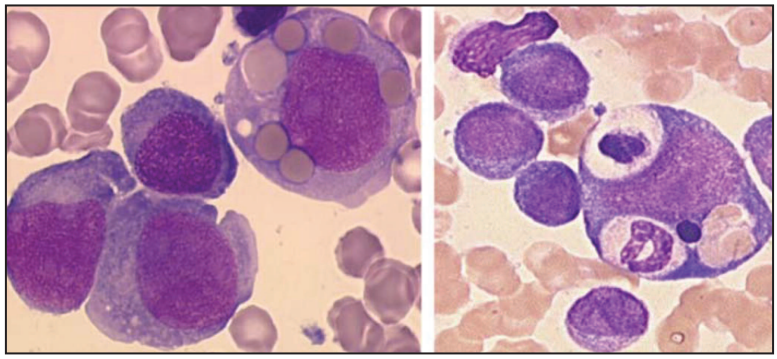


Figure 27 : Photographies d'hémophagocytose par des blastes porteurs d'une translocation de MOZ. Coloration d'un myélogramme au May-Grünwald-Giemsa.

7. Rôle de MOZ dans la leucémogenèse

a. Réarrangements chromosomiques associés à MOZ

Quatre partenaires de fusion de *MOZ* lors de réarangements chromosomiques ont été identifiés jusqu'ici (Figure 26). Les anomalies chromosomiques t(8;16)(p11;p13) (Borrow *et al.,* 1996b), t(8;22)(p11;q13) (Chaffanet *et al.,* 2000), t(8;20)(p11;q13) (Esteyries *et al.,* 2008), inv(8)(p11;q13) (Carapeti *et al.,* 1998) fusionnent respectivement *MOZ* à ***CBP***, ***P300***, ***NCOA3*** et ***TIF2***. Les partenaires de fusion de MOZ inventoriés sont de façon originale des HAT reconnues ou présumées. Ces anomalies sont retrouvées dans moins de 1% des cas de LAM. Il a été également rapporté, dans un cas de syndrome myélodysplasique secondaire à un traitement, la fusion de *MOZ* avec un partenaire non identifié au sein de la translocation (2;8)(p23;p11) (Imamura *et al.,* 2003). Dans tous ces réarrangements chromosomiques, le point de cassure se produit au niveau du domaine ED de MOZ, qui conserve ainsi son extrémité N-terminale avec les domaines PHD et MYST, ceux-ci étant importants pour la transformation leucémique (Deguchi *et al.,* 2003). Les LAM arborant des translocations de *MOZ* peuvent être *de novo* ou secondaires (dans 32% des cas) à des traitements chimiothérapeutiques (anthracyclines, inhibiteurs de la topoisomérase II ou agents alkylants) (Murati *et al.,* 2012). Elles touchent principalement des sujets jeunes, 50% des patients ayant moins de 30 ans. Une atteinte extramédullaire avec une infiltration cutanée ou viscérale et une coagulation intravasculaire disséminée sont fréquemment décrites. Le pronostic est en général défavorable. Ces LAM ont une composante monocytaire et ont la particularité de présenter dans 80% des cas une hémophagocytose (essentiellement une érythrophagocytose) par les blastes, une anomalie rare dans les LAM (Figure 27). Le seul traitement efficace à l'heure actuelle consiste en une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques après obtention de la rémission complète par chimiothérapie cytotoxique.

b. Mode d'action des protéines de fusion de MOZ

L'action des protéines oncogéniques n'est pas encore bien comprise. Il existe cependant des informations sur le fonctionnement de MOZ-CBP et de MOZ-TIF2, alors que les protéines de fusion MOZ-P300 et MOZ-NCOA3 ne sont pas encore étudiées.

- Effets moléculaires sur le contrôle transcriptionnel

CBP est une HAT, connue principalement en tant que co-activateur transcriptionnel (Kalkhoven 2004). Bien que MOZ et CBP soient des co-activateurs transcriptionnels de RUNX1, la protéine de fusion **MOZ-CBP réprime la transcription de ses gènes cibles** (Kitabayashi *et al.,* 2001). *A contrario*, **MOZ-CBP active la transcription des gènes ciblés par NF-KB** (Chan *et al.,* 2007).

La protéine TIF2 est un co-activateur des récepteurs nucléaires de la famille p160 (Leo et Chen 2000) dont l'interaction avec CBP est primordiale à son activité (Demarest *et al.,* 2002). La transformation tumorale induite par MOZ-TIF2 est liée à l'interaction entre TIF2 et CBP (Deguchi *et al.,* 2003). **MOZ-TIF2 agit en tant que répresseur de la transcription de P53**, qui est dépendante de CBP. Ceci s'expliquerait par une délocalisation de CBP au sein du noyau en présence de MOZ-TIF2 (Kindle *et al.,* 2005). A l'inverse, **MOZ-TIF2 active la transcription des gènes ciblés par RUNX1** (Collins *et al.,* 2006) ou par Spi-1/PU.1 (Aikawa *et al.,* 2010).

Ces différents travaux montrent que l'activité transcriptionnelle des protéines de fusion impliquant MOZ semble être dépendante des promoteurs ciblés et des facteurs de transcription interagissant avec elles.

- Effets biologiques

La protéine de fusion **MOZ-CBP inhibe *in vitro* la différenciation monocyto-macrophagique** de la lignée myéloïde murine M1 induite par l'IL-6 (Kitabayashi *et al.,* 2001). Ces cellules continuent de proliférer au lieu de se différencier puis d'entrer en apoptose. Cet effet est dépendant du domaine HAT de CBP. MOZ-CBP est donc capable de bloquer *in vitro* la différenciation myéloïde et de favoriser la prolifération comme dans le cas des LAM porteuses de la translocation (8;16).

La transplantation de progéniteurs myéloïdes ou granulo-monocytaires surexprimant MOZ-TIF2 dans des souris létalement irradiées, provoque la survenue de LAM. Les progéniteurs acquièrent alors des caractéristiques de cellules souches leucémiques. BCR-ABL, l'oncogène caractéristique des leucémies myéloïdes chroniques, est incapable de

transformer des progéniteurs en cellules souches leucémiques, mettant ainsi en lumière divers mécanismes de transformation leucémique (Deguchi *et al.,* 2003; Huntly *et al.,* 2004). En outre, notre équipe a montré en 2008 que l'expression de MOZ-TIF2 chez le Poisson-Zèbre induit des LAM (Zhuravleva *et al.,* 2008).

c. Profils d'expression génique dans les LAM impliquant MOZ

L'étude du patron d'expression génique dans des échantillons de patients atteints de LAM comportant la protéine de fusion MOZ-CBP, a révélé une signature moléculaire particulière, cumulant une forte expression des gènes *HOXA9*, *HOXA10* et *MEIS1*, ainsi qu'une chute des autres gènes *HOX* étudiés (Camos *et al.,* 2006).

II. MLL, Mixed Lignage Leukemia

1. Organisation de MLL

Le gène MLL (*mixed lineage leukemia*) présent sur la bande 23 du chromosome 11 est couramment associé à différentes formes de leucémies incluant des LAL et des LAM, une majorité de type myélo-monocytaire ou monoblastique, mais également des leucémies touchant en même temps les lignages lymphoïde et myéloïde. Ce gène est localisé sur le bras long du chromosome 11 en position 23 et s'étend sur 90 335 (pb). Il est composé de 37 exons. Son transcrit, constitué de 16 608 pb dont 11 900 pb codantes, génère une protéine de 3 972 acides aminés (AA) de masse moléculaire proche de 430 kDa. La protéine MLL est également connue sous le nom d'ALL1 ou HRX.

Des analyses bio-informatiques ont révélé que MLL possédait des paralogues qui forment la famille MLL. Cette famille est composée de MLL, MLL2, MLL3, MLL4, SET1A et SET1B (Ansari et Mandal 2010). Tous possèdent une activité HMT spécifique de la lysine 4 de l'histone H3, mais comme l'indiquent les modèles murins d'invalidation des gènes codant pour ces protéines, leurs fonctions ne sont pas redondantes.

MLL est l'homologue de la protéine Trithorax de Drosophile, membre fondateur du groupe Trithorax, régulateur de l'expression des gènes *Hox* au cours du développement (Hess 2004).

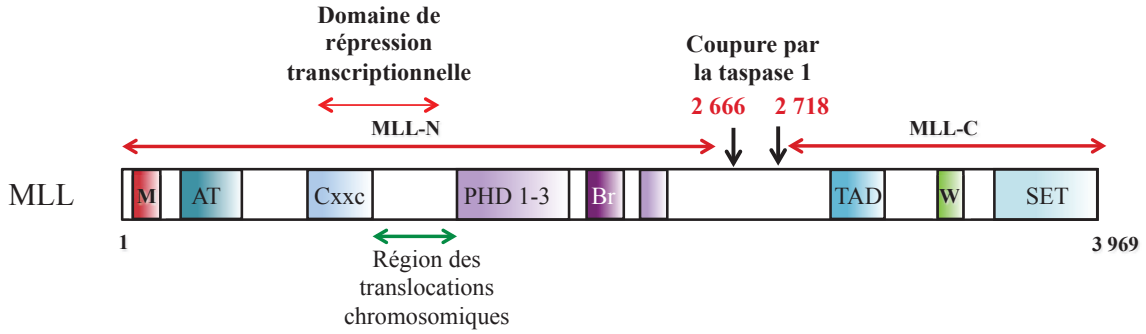


Figure 28 : Représentation schématique de la protéine MLL.

M : MIM (Motif d'interaction avec Menin)
AT : Crochets AT
CxxC : Domaine de liaison à l'ADN
PHD : *Plant homology domain*
Br : Bromodomaine
TAD : Domaine de transactivation
W : Win (*WDRP interacting domain*)
SET : Domaine histone méthyl-transférase

La protéine MLL est composée de différents domaines protéiques (Figure 28) :

- Les crochets A-T (*AT Hooks*) : **Ces structures sont capables de se fixer au petit sillon de l'ADN** au niveau de séquences riches en Adénine et Thymine.

- La région CxxC : Elle est riche en cystéine et peut **se lier sur des îlots CpG non méthylés de l'ADN** (Birke *et al.,* 2002). Elle prend part au domaine de répression transcriptionnelle du fait d'interaction avec des co-répresseurs (Xia *et al.,* 2003). Le fait que MLL puisse se fixer au niveau de l'ADN lui vaut souvent d'être qualifié de facteur de transcription. Or, un facteur de transcription reconnaissant une séquence consensus, ce qui n'est pas le cas de MLL, elle fait donc partie de la famille des co-régulateurs transcriptionnels.

- Les 4 domaines PHD : Ils sont capables **de se fixer au niveau des histones tri-méthylées sur la lysine 4 de l'histone H3**. Ils ne seraient pour autant pas responsables du recrutement optimal de MLL au niveau du promoteur de ses gènes cibles (Chang *et al.,* 2010).

- Le Bromodomaine : Ce domaine a la propriété **de se lier sur des histones acétylées**.

- Le domaine de transactivation : **Il interagit avec les HAT CBP et P300** (Ernst *et al.,* 2001). L'interaction avec CBP augmente son affinité pour d'autres partenaires, participant ainsi au recrutement des différents complexes nécessaires à l'activation transcriptionnelle (Goto *et al.,* 2002).

- Le domaine SET qui porte l'activité HMT : Il est composé de 3 régions, SET-N, SET-I et SET-C. D'un point de vue structurel, il forme un tunnel qui permet de diriger la lysine ciblée en position adéquate pour effectuer la réaction enzymatique. Les protéines interagissant avec MLL sont responsables de changements de conformation au niveau de ce domaine qui influencent l'activité HMT. Il peut aussi recruter des protéines des complexes SWI/SNF (Rozenblatt-Rosen *et al.,* 1998).

La protéine est synthétisée sous forme entière, mais est rapidement clivée par la taspase 1, ce qui génère deux fragments, un de petite taille, MLL-C de 180 kDa et un de grande taille, MLL-N de 320 kDa (Hsieh *et al.,* 2003). Les deux sous-unités obtenues s'associent en hétérodimères.

2. MLL est une histone méthyl-transférase nécessitant son complexe «cœur»

Du fait de son homologie avec Trithorax dont l'activité HMT a été démontrée, MLL a rapidement été rangée dans la classe des HMT, ce qui a été confirmé par la suite. Par des tests

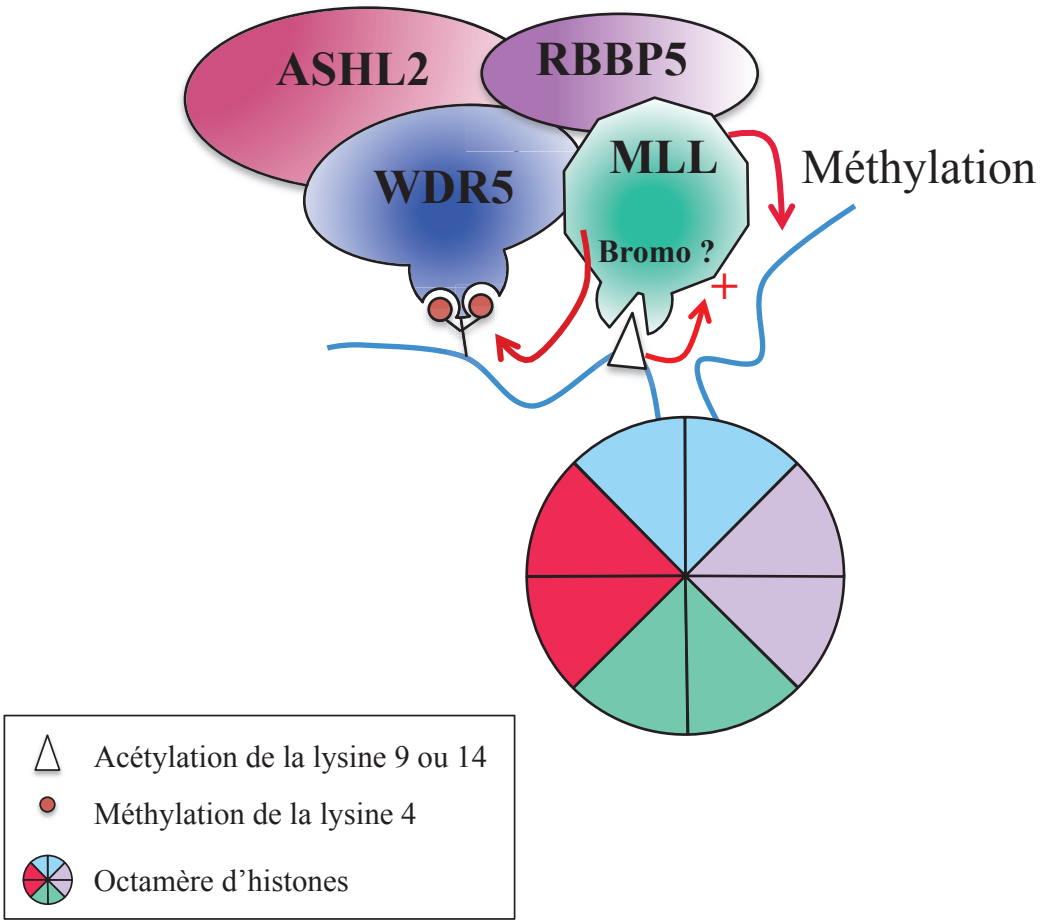


Figure 29 : Représentation schématique du complexe « cœur » de MLL.

WDR5 se fixe sur les lysines di-méthylées de H3. MLL reconnaît l'acétylation de la lysine 9 ou 14, ce qui active son activité. MLL méthyle ainsi la lysine 4 des histones H3 se trouvant à proximité.

(D'après Dou et al., 2006)

in vitro, il a été montré que MLL est capable de méthyler la lysine 4 de l'histone H3 (Nakamura *et al.,* 2002). La délétion de son domaine SET serait responsable de la perte de la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 dans les fibroblastes embryonnaires murins (Milne *et al.,* 2002). Chez la Drosophile, la protéine Trithorax, homologue de MLL, se lie à l'histone H3 acétylée sur les lysines 9 ou 14 (Katsani *et al.,* 2001). De plus, l'activité histone méthyl-transférase de MLL est favorisée lorsque l'histone H3 est acétylée sur les lysines 9 ou 14 (Milne *et al.,* 2002). Le Bromodomaine de MLL pourrait être impliqué dans cette reconnaissance de l'acétylation de l'histone H3.

Les HMT peuvent être responsables de mono-, di- ou tri-méthylation des lysines selon le type de domaine SET. Cette spécificité de produit serait déterminée par la présence d'une phénylalanine ou d'une tyrosine au niveau du site actif de SET. Les domaines contenant une phénylalanine ont un site actif plus grand, qui permet l'addition de plusieurs groupes méthyle, alors que ceux possédant une tyrosine sont plus petits, et ne supportent l'ajout que d'un groupement méthyle. Cependant, les protéines de la famille SET1 contredisent cette règle, puisqu'ils possèdent une tyrosine au niveau du domaine SET et sont capables de mono-, di- et tri-méthyler les résidus lysine. Cette contradiction s'explique par des changements de conformation de MLL lorsqu'elle interagit avec 4 protéines, formant ainsi le complexe « cœur » de MLL (Dou *et al.,* 2006; Patel *et al.,* 2009).

Ce complexe «cœur» multi-protéique composé de **WDR5** (*WD repeat protein-5*), RBBP5 (*retinoblastoma-binding protein-5*), **ASH2L** (*absent-small-homeotic-2-like protein*), et **DPY-30** (*dumpy-30*), est commun à tous les membres de la famille SET1 (Figure 29). Les protéines contenant des répétitions de type WD40 sont des partenaires majeurs des protéines à domaine SET (Wysocka *et al.,* 2005). L'inhibition de MLL provoquant la perte de certaines méthylations au niveau de promoteurs précis, tandis que celle de WDR5 induisant une disparition globale des méthylations (Wysocka *et al.,* 2005), montrent ainsi l'importance des protéines associées aux HMT. WDR5 est essentielle à la méthylation par MLL, de par sa capacité à fixer la lysine 4 méthylée de l'histone H3, favorisant ainsi la tri-méthylation. MLL interagit avec son complexe cœur *via* son motif d'interaction aux protéines WDR (Win : *WDR interaction*). Comme indiqué précédemment dans ce manuscrit, la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est une marque d'activation transcriptionnelle majeure lorsqu'elle est trouvée dans les régions promotrices.

3. Autres partenaires protéiques de MLL

MLL est actif dans son complexe «cœur», mais il interagit avec d'autres protéines.

a. Menin et LEDGF

La protéine Menin, codée par le gène *MEN1* (*Multiple endocrine neoplasia-type 1*) a été identifiée dans des cancers des glandes parathyroïdes ou du pancréas (Trump *et al.,* 1996). Il s'agit d'**un suppresseur de tumeur** qui peut se lier à l'ADN (La *et al.,* 2004). Elle contribuerait au recrutement de MLL au niveau de ses gènes cibles (Yokoyama *et al.,* 2004). Menin est elle-même recrutée sur les gènes cibles de MLL. **L'interaction entre ces deux protéines est essentielle pour l'activité HMT de MLL** (Hughes *et al.,* 2004) et pour le maintien de l'expression du gène *HOXA9* (Popovic et Zeleznik-Le 2005; Slany 2005). Le motif d'interaction avec Menin (MBM : *Menin binding motif*) est localisé sur l'extrémité N-terminale de MLL.

La purification du complexe MLL/Menin a permis l'identification de LEDGF (*lens epithelium-derived growth factor*) (Yokoyama et Cleary 2008). Il s'agit d'un co-activateur transcriptionnel co-recruté avec MLL au niveau de différents gènes cibles dont *HOXA9* (Yokoyama et Cleary 2008). Certaines hypothèses suggèrent que Menin représenterait uniquement un lien entre MLL et LEDGF, ce qui permettrait à MLL d'être recrutée au niveau de sites spécifiques.

Menin contrôle la fonction d'autres protéines. Elle interagit avec JunD (Agarwal *et al.,* 1999), NF-κB (Heppner *et al.,* 2001), Smad3 (Canaff, 2004) et des récepteurs nucléaires aux hormones (Dreijerink *et al.,* 2006).

b. Association avec des HAT

MLL peut s'associer avec des HAT telles que MOF ou CBP. MLL contenant un bromodomaine, il a été postulé que le complexe de MLL était recruté au niveau des promoteurs qui sont dans un premier temps acétylés par des HAT (Dou *et al.,* 2005). CBP se fixe au domaine de transactivation de MLL, et cette interaction est essentielle à l'activité de MLL (Ernst *et al.,* 2001).

c. Association avec des facteurs de transcription

En ce qui concerne l'interaction de MLL avec des facteurs de transcription, peu d'informations ont été rapportées jusqu'ici. **MLL interagit avec RUNX1 et leur interaction est indispensable pour la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3** au niveau de promoteurs de gènes ciblés par RUNX1. De plus, cette interaction protège RUNX1 de la dégradation par le protéasome. Par ailleurs, les mutations de RUNX1 retrouvées dans des syndromes myélodysplasiques annihilent son interaction avec MLL, conduisant à une baisse de la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 sur le promoteur de *SPI-1/PU.1* (Huang *et al.,* 2011).

Il a été aussi montré que Mll s'associe avec les récepteurs aux œstrogènes afin d'activer la transcription de Hoxc13 (Ansari *et al.,* 2009).

d. Association avec des répresseurs transcriptionnels

Le domaine de répression transcriptionnelle agit grâce à son association avec diverses protéines répressives. Ainsi, MLL interagit avec des histones désacétylases, les protéines HDAC1 et 2 et des membres du groupes Polycomb tels que Bmi-1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*) et HPC2 (*Human polycomb protein 2*) (Xia *et al.,* 2003).

e. Association avec Cyp_{33}

Cyp_{33} (*$Cyclophilin_{33}$*), une peptidyl-prolyl isomérase-*cis-trans*, se lie à un des domaines PHD de MLL. Cette fixation conduirait à la répression des gènes *HOX* soit par le biais de recrutement d'HDAC, soit en bloquant la fixation de MLL au niveau de ses gènes cibles, notamment *HOXA9* (Park *et al.,* 2010; Wang *et al.,* 2010).

4. Rôle de MLL dans le développement, l'hématopoïèse et l'activation transcriptionnelle des gènes *Hox*

a. Modèles murins d'invalidation totale ou partielle de Mll

De nombreux modèles murins d'invalidation du gène *Mll* ont été créés.

Le premier modèle est issu de **l'invalidation totale du gène** qui entraîne le décès *in utéro* des embryons homozygotes (Yu *et al.,* 1995; Yagi *et al.,* 1998). Elles affichent des altérations majeures au niveau du squelette et de l'hématopoïèse du fait de la faible expression des gènes *Hox*, en particulier ceux du groupe de gènes A. Dans ces souris, l'initiation de l'expression des gènes *Hox* a lieu, mais leur expression n'est pas maintenue (Yu *et al.,* 1995; Yu *et al.,* 1998). Les souris invalidées pour *Mll* montrent également des défauts de l'hématopoïèse, avec une diminution du nombre de CSH fœtales et de leur capacité de différenciation, particulièrement dans la voie myéloïde (Hess *et al.,* 1997; Yagi *et al.,* 1998).

Afin de déterminer le rôle de Mll dans les tissus adultes, **un modèle de souris chimérique** a été généré. Ces souris obtenues à partir de l'injection dans un embryon sauvage de cellules souches embryonnaires n'exprimant pas Mll, ont été testées sur leur contribution au développement des différents tissus dans les souris adultes (Ernst *et al.,* 2004). Les cellules déficientes en *Mll* ne forment pas de CSH fœtales et sont incapables de donner des cellules myéloïdes et lymphoïdes chez l'adulte.

Un modèle murin **d'invalidation du domaine SET** de Mll a également été produit (Terranova *et al.,* 2006). Cette invalidation n'est pas létale. Ces souris présentent des anomalies dans la mise en place du squelette, accompagnées d'une diminution du niveau d'expression des gènes *Hox*.

Afin de caractériser le rôle de Mll plus spécifiquement dans l'hématopoïèse, en s'affranchissant de la mortalité embryonnaire observée dans les modèles de délétion globales et de l'influence des cellules non hématopoïétiques, **deux spécimens d'invalidation conditionnelle de type « Cre-*LoxP* »** ont été mis au point. Ils correspondent au croisement d'une souris comportant des séquences « *Flox* » qui entourent le gène *Mll* avec une souris exprimant la recombinase Cre (capable de reconnaître et d'exciser les séquences « *Flox* »), placée sous le contrôle d'un promoteur spécifique des cellules hématopoïétiques, *Vav*. Ainsi, les souris résultantes subissent une délétion de *Mll* de manière circonscrite à l'hématopoïèse adulte (McMahon *et al.,* 2007; Gan *et al.,* 2010). Les CSH de ces souris montrent une sortie de la quiescence, accompagnée d'un amoindrissement de leur capacité à donner une hématopoïèse après greffe dans un organisme irradié de manière létale.

Enfin, le dernier modèle, **conditionnel et inductible**, est issu d'une délétion spécifique du système hématopoïétique, le gène codant pour la recombinase Cre étant sous le contrôle du promoteur hématopoïétique *Mx*, qui est activé après injection d'un dérivé de l'Interféron (α et β) (Jude *et al.,* 2007). L'étude de ces souris a mis en évidence l'importance de Mll dans le maintien de la quiescence des CSH adultes. En outre, les progéniteurs les plus immatures de ces souris possèdent des capacités de prolifération réduites et des défauts de réponse aux cytokines. Il s'avère que Mll n'est pas indispensable pour les progéniteurs déjà avancés dans les différentes voies de différenciation.

L'ensemble de ces résultats a démontré que Mll est crucial au développement, à la stabilité de l'expression des gènes *Hox* et à l'hématopoïèse primitive et définitive, notamment à travers l'auto-renouvellement des CSH, leur maintien en quiescence et la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques.

b. Démonstration du rôle de MLL sur l'expression des gènes HOX par l'utilisation d'autres modèles

MLL active l'expression des gènes *HOX*, particulièrement en tri-méthylant la lysine 4 de l'histone H3 au niveau de leur promoteur (Milne *et al.,* 2002). Dans les cellules K562, une lignée hématopoïétique humaine, **MLL est fixé sur le promoteur du gène *HOXA9***, et l'inhibition de *Mll* par une stratégie d'interférence à l'ARN provoque une baisse de son expression (Milne *et al.,* 2002; Nakamura *et al.,* 2002). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivies de séquençage dans des cellules de la lignée hématopoïétique humaine U-937 ont mis en évidence le recrutement de MLL sur de nombreux promoteurs, sa fixation correspondant à celle de l'ARN polymérase II. En ce qui concerne les gènes *HOX*, MLL arbore une distribution plus large pour les gènes « postérieurs » du *cluster* A, soulignant le rôle particulier de MLL sur ces gènes (Guenther *et al.,* 2005). L'inhibition de *Mll* par interférence à l'ARN dans des fibroblastes murins conduit à une méthylation de l'ADN au niveau du locus du gène *Hoxa9*, provoquant rapidement la répression de son expression. En effet, MLL se fixe au niveau des ilôts CpG de ce gène, les protégeant des enzymes de méthylation de l'ADN (Erfurth *et al.,* 2008).

En outre, **ASH1**, responsable de la méthylation de la lysine 36 de l'histone H3, interagit avec MLL. **Les deux protéines activent la transcription du gène *HOXA9* de manière**

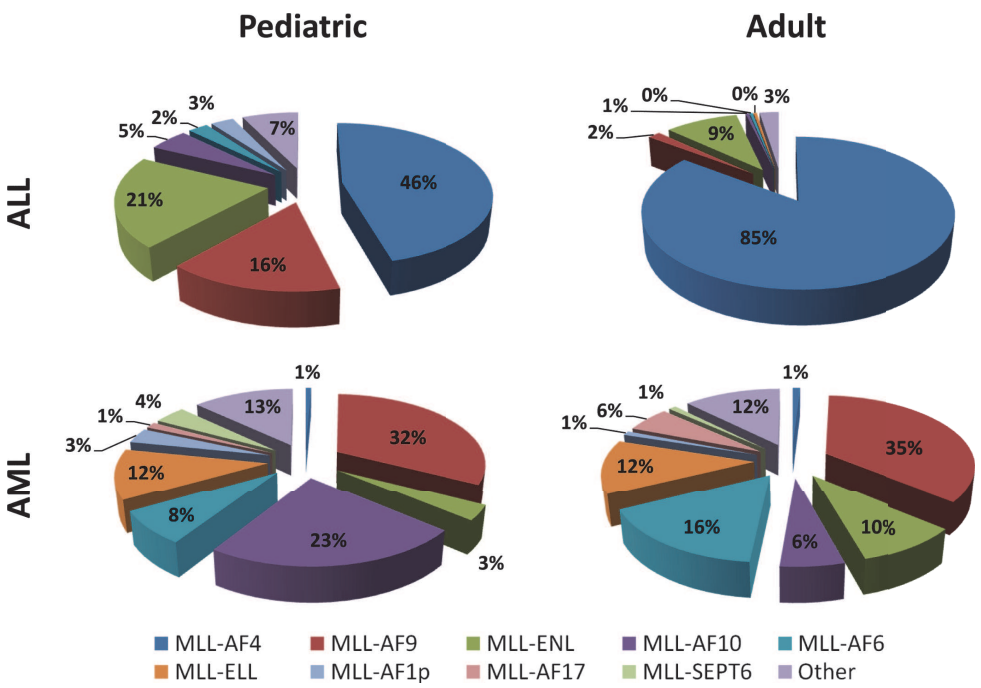


Figure 30 : Fréquence des différentes translocations de MLL.

(Mutean et Hess, 2012)

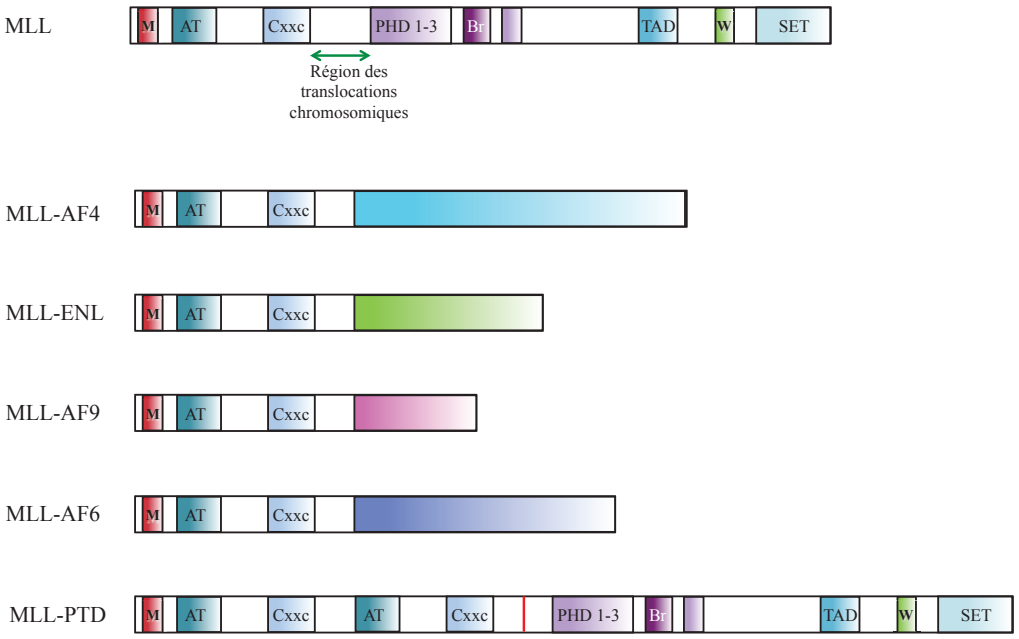


Figure 31 : Exemples de structures des protéines de fusion impliquant MLL.

synergique (Tanaka *et al.,* 2011). Un autre exemple de mécanisme du contrôle de *HOXA9* par MLL correspond à sa dégradation du fait de son interaction avec ECS^{ASB2} (*elongin B/C-Cullin-SOCS box protein*), une E3 ubiquitine ligase. Au cours de la différenciation hématopoïétique, l'augmentation du niveau d'ESC^{ASB2} induit une dégradation accrue de MLL, d'où une baisse d'expression des gènes cibles de MLL, dont *HOXA9* (Wang *et al.,* 2012).

De façon similaire aux souris nullizygotes pour le gène *Mll*, les souris invalidées pour la taspase 1 présentent des anomalies du développement du fait d'un défaut d'expression des gènes *Hox*, indiquant l'importance de la prise en charge de Mll par cette enzyme dans l'activation des gènes *Hox* (Takeda *et al.,* 2006b).

MLL contrôle l'expression d'autres gènes que les HOX, comme les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines p27 et p18 (en coopération avec Menin) (Milne *et al.,* 2005).

5. Rôle de MLL dans la leucémogenèse

a. Généralités

Comme évoqué précédemment, le gène *MLL* est très fréquemment retrouvé réarrangé, dans environ 10% des leucémies aiguës, avec des variations d'incidence en fonction de l'âge et du type de leucémie aiguë (Figure 30). **Plus de 100 translocations ont été décrites jusqu'ici, avec plus de 60 partenaires de fusion différents identifiés** (Meyer *et al.,* 2009; Mohan *et al.,* 2010). Les plus fréquents sont AF4 (*ALL-1 fused gene from chromosome 4*), AF6, AF9, AF10, AF17, AF1p, ENL (*eleven-nineteen-leukemia*), ELL (*eleven-nineteen lysine-rich leukemia*) et SEPT6 (*Septin 6*) (Krivtsov et Armstrong 2007; Muntean et Hess 2012). Des duplications partielles en tandem (PTD, *partial tandem duplication*) peuvent également toucher *MLL* (Figure 31). Malgré la diversité des translocations affectant *MLL*, la région où se produit la cassure chromosomique est conservée dans ces anomalies et s'étend sur environ 8 000 paires de bases (Thirman *et al.,* 1993). Ainsi, dans toutes les translocations impliquant *MLL*, les protéines de fusion générées contiennent une partie du fragment N-terminal de MLL (de l'extrémité N-terminale au domaine de répression inclus), fusionné au partenaire de translocation. En ce qui concerne les PTD, la même partie de *MLL* que celle retrouvée dans les translocations est insérée au niveau du point de cassure, produisant ainsi une protéine MLL

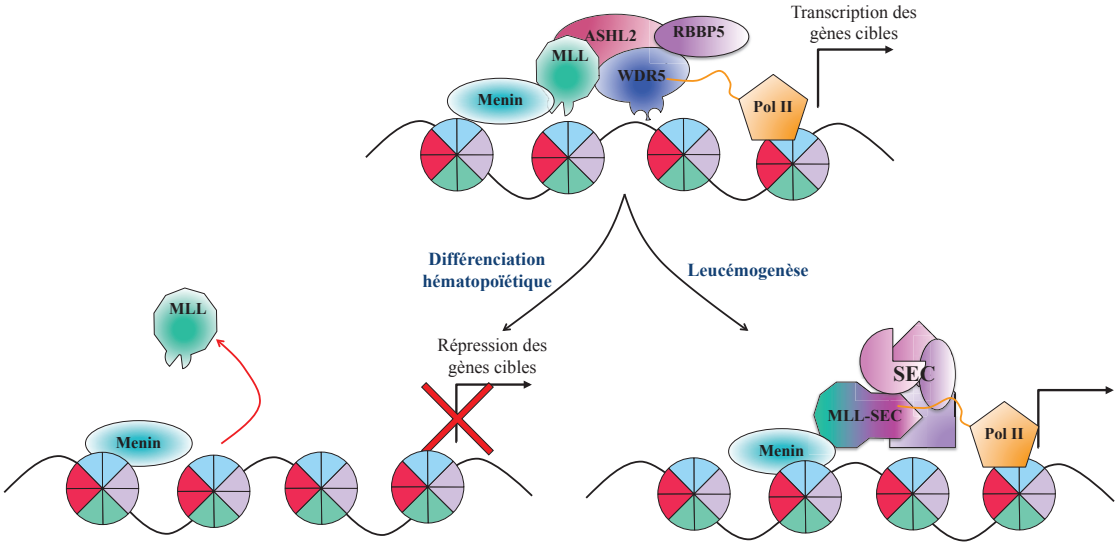


Figure 32 : Mécanisme de leucémogenèse des protéines de fusion impliquant MLL et des membres du complexe de super-élongation.

Lors de la différenciation hématopoïétique, les gènes ciblés par MLL sont réprimés. Dans les cellules leucémiques, les protéines fusionnant MLL à des membres du complexe de super-élongation sont recrutées au niveau des promoteurs *via* l'interaction entre MLL et Menin. Ainsi, le reste du complexe de super-élongation est recruté, ce qui active ainsi la transcription.

anormale présentant deux fois à la suite l'extrémité N-terminale (jusqu'au domaine de répression inclus).

b. Activité moléculaire des protéines de fusion impliquant MLL

Les protéines de fusion de MLL ne comprennent plus le domaine SET mais conservent l'extrémité N-terminale permettant l'interaction avec les nucléosomes. Ainsi, le mécanisme d'activation des gènes *HOX* par celles-ci doit diverger de celui de la protéine MLL normale puisque son activité méthyl-transférase est absente. Leur mécanisme d'action n'est toutefois pas complètement élucidé. Pour certaines d'entre elles, cette sur-activation pourrait résulter du recrutement, grâce à la partie MLL de la protéine de fusion au niveau des gènes *HOX*, du partenaire de translocation possédant une activité transcriptionnelle (directe ou indirecte selon le recrutement d'autres facteurs). Par ailleurs, il semble que pour certaines protéines de fusion de MLL, le partenaire de fusion permette **la dimérisation de la partie MLL**, celle-ci étant importante pour la transformation (Daser et Rabbitts 2005; Krivtsov et Armstrong 2007).

Certains des partenaires de fusion de MLL, dont les plus fréquents, font partie du **complexe de super-élongation (*Super elongation complex* : SEC)**. Ce complexe permet d'activer l'élongation de la transcription réalisée par l'ARN polymérase II. Il est composé des protéines **ELL1** à **3** (*eleven-nineteen Lys-rich leukaemia*), **AF4** (*ALL1-fused gene from chromosome 4*), **AF9**, **ENL** (*eleven-nineteen leukaemia*), **EAF1** et **2**, **AFF4** et **P-TEFB** (*positive transcription elongation factor*) (Smith *et al.,* 2011). Les protéines de fusion contenant MLL et un membre du SEC sont recrutées sur des gènes cibles de MLL, puisque le domaine d'interaction avec Menin se trouve dans ces protéines. Ainsi, la partie contenant un membre du SEC attire les autres membres de ce complexe, ce qui active l'élongation de la transcription au niveau de gènes qui ne devraient pas être transcrits, tels que les gènes *HOX* (Figure 32) (Luo *et al.,* 2012).

D'autres mécanismes d'action des protéines de fusion de MLL ont été décrits. Par exemple, MLL-AF9, MLL-AF10, et MLL-ENL **se lient à P53 et répriment la transcription de ce facteur de transcription** en bloquant son acétylation par P300 (Wiederschain *et al.,* 2005).

MLL permet la transcription de **mir-196b**, qui est localisé dans le *cluster* des gènes *HOX*. La protéine de fusion MLL-AF4 active la transcription ce miARN. De plus, il est surexprimé

dans la majorité des échantillons de patients atteints d'une leucémie avec des anomalies de MLL. Mir196b serait nécessaire à la prolifération cellulaire (Popovic *et al.,* 2009).

PAFc (*polymerase-associated factor complex*) est une ubiquitine-transférase, qui mono-ubiquitinyle la lysine 20 de l'histone H2B. Cette modification est nécessaire à la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 par MLL. PAFc interagit avec MLL, et cette association est conservée dans les protéines de fusion comprenant MLL. Elle est essentielle au recrutement de MLL et des protéines chimériques au niveau des promoteurs cibles (Muntean et Hess 2012).

Les membres du complexe Polycomb 2 (PCR2) répriment la transcription des gènes *HOX* en réalisant la tri-méthylation de la lysine 27 au niveau de l'histone H3. Les complexes Polycomb et Trithorax ont des rôles opposés. Malgré cela, le complexe PCR2 est crucial pour la progression des leucémies MLL-AF9 (Neff *et al.,* 2012).

c. Fonctions biologiques des protéines de fusion contenant MLL

Les protéines de fusion de MLL induisent des leucémies aiguës (lymphoblastiques ou myéloblastiques) chez la Souris à travers différents modèles (Daser et Rabbitts 2004; Daser et Rabbitts 2005). **Les premiers ont été obtenus grâce à des transplantations de cellules de moelle osseuse exprimant ces protéines de fusion** par insertion rétrovirale dans des souris irradiées de façon létale (Krivtsov *et al.,* 2006).

Des modèles plus physiologiques ont ensuite été générés grâce à l'établissement de souris transgéniques dans lesquelles un allèle codant pour MLL a été remplacé par celui codant pour une protéine de fusion, ce qui permet d'une part son expression sous le contrôle d'un promoteur endogène et d'autre part de garder intact un allèle codant MLL (Corral *et al.,* 1996; Dobson *et al.,* 1999). Nonobstant le fait que les protéines de fusion soient exprimées dans toutes les cellules où s'exprime MLL et non pas seulement dans les cellules hématopoïétiques, seules des leucémies sont observées dans ces souris, prouvant ainsi le rôle circonscrit à l'hématopoïèse des protéines de fusion de MLL. Afin d'annihiler l'incidence possible d'une protéine de fusion arborant MLL dans des cellules non hématopoïétiques, des souris nullizygotes conditionnelles ont été produites grâce au système « Cre-*LoxP* » (Collins *et al.,* 2000; Forster *et al.,* 2003). Dans ces souris, les translocations de *MLL* sont recréées *de novo*

durant le développement, et spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques. Ces souris qui représentent le modèle le plus physiologique élaboré jusqu'ici, développent également des leucémies aiguës, ce qui confirme le pouvoir leucémogène des protéines chimériques impliquant MLL.

La duplication partielle de MLL, MLL-PTD, diminue le nombre de CSH en favorisant l'apoptose et provoque un blocage de la différenciation myéloïde (Zhang *et al.,* 2012).

d. Les gènes HOX et leurs co-facteurs sont des gènes clefs de la leucémogenèse impliquant des anomalies de MLL

Il a été démontré dans ces différents modèles que les gènes *HOX*, surtout *HOXA9*, et leurs co-facteurs, principalement *MEIS1,* sont des acteurs clefs de la transformation leucémique. La surexpression des gènes *Hox*, essentiellement ceux du *cluster* A, et du co-facteur Meis1, sont observées dans les cellules blastiques induites. De plus, l'inhibition de *Hoxa9* ou *Hoxa7* engendre une perte des capacités transformantes des protéines de fusion avec MLL, soulignant ainsi le rôle central des gènes *Hox* dans le développement leucémique associé à MLL (Ayton et Cleary 2003). En sus, l'étude de profils d'expression génique effectuée chez certains patients atteints d'une leucémie associée à des anomalies de MLL, démontre que le taux de transcription des gènes *HOXA9*, *MEIS1* et parfois *HOXA5* est augmenté, **établissant ainsi une signature génique de ces leucémies** (Kawagoe *et al.,* 1999; Rozovskaia *et al.,* 2001; Armstrong *et al.,* 2002). Ce profil particulier se rapproche de celui observé dans les leucémies impliquant MOZ (Camos *et al.,* 2006).

RESULTATS

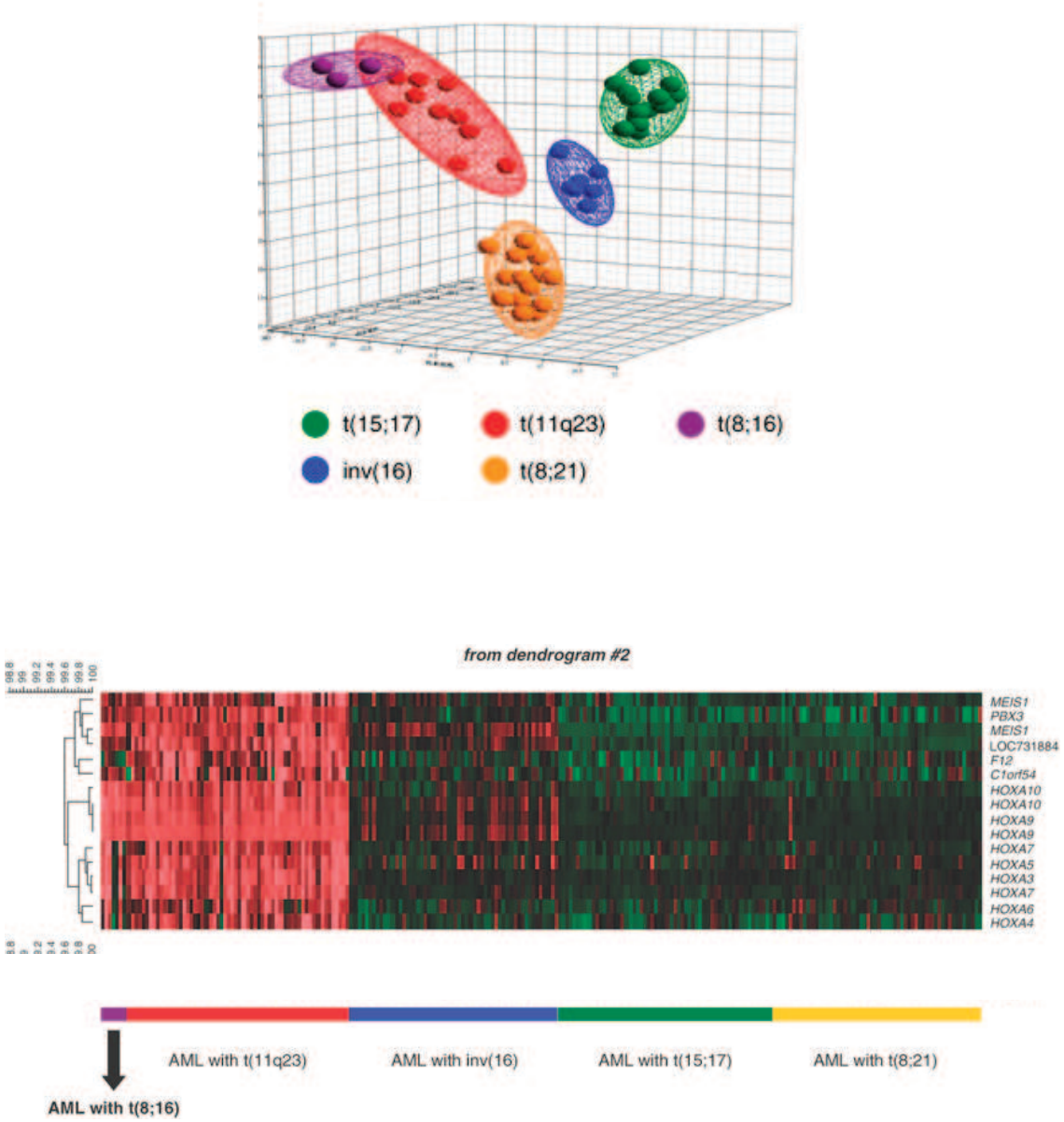


Figure 33 : Les patrons d'expression des leucémies impliquant MOZ et MLL sont proches.

(Haferlach et al., 2009)

A. Identification d'une association fonctionnelle entre les deux onco-protéines MOZ et MLL activant la transcription des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9* dans les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques humaines

Article

Crosstalk between leukemia-associated proteins MOZ and MLL regulates HOX gene expression in human cord blood CD34+ cells.

Paggetti J*, Largeot A*, Aucagne R, Jacquel A, Lagrange B, Yang XJ, Solary E, Bastie JN, Delva L. * Equal contribution

Oncogene. 2010 Sep 9;29(36):5019-31

Résumé

MOZ est une histone acétyl-transférase ciblée par des réarrangements chromosomiques dans certains cas de leucémies aiguës myéloblastiques. L'étude de l'expression génique de ces leucémies a mis en évidence un patron d'expression spécifique, incluant une surexpression de certains gènes *HOX* et de leurs co-facteurs tels que *HOXA9* et *MEIS1* (Camos *et al.,* 2006). Ce profil est non sans rappeler celui trouvé de leucémies impliquant MLL (Armstrong *et al.,* 2002). Une étude a d'ailleurs comparé, en utilisant des puces, l'expression génique dans des leucémies arborant les translocations RUNX1-ETO, PML-RARα, CBF-MYH11, MOZ-CBP avec celles comprenant MLL. Il apparut alors clairement une similarité des profils d'expression des leucémies impliquant MOZ et MLL comparés aux autres leucémies (Haferlach *et al.,* 2009) (Figure 33). Il a été également montré que MLL pouvait coopérer avec l'histone acétyl-transférase MOF de la famille MYST, responsable de l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4. Dans le complexe purifié identifiant MLL avec MOF, une activité HAT sur l'histone H4, imputable à MOF, a été détectée. Une autre au niveau des histone H3 et H2A fut aussi décelée, ce qui laissait envisager la présence d'autres HAT dans ce complexe (Dou *et al.,* 2005).

L'ensemble de ces observations nous a poussé à émettre l'hypothèse d'une possible coopération entre MOZ et MLL, particulièrement au niveau du contrôle de l'expression de certains gènes *HOX*.

Dans un premier temps, nous avons déterminé par immuno-cytofluorescence que MOZ et MLL sont co-localisées dans le noyau des cellules HEK293T (*Human embryonic kidney 293T*), K562 (lignée humaine provenant d'un patient atteint d'une leucémie érythromyéloblastique) et dans les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques humaines isolées à partir de sang de cordon, portant le marqueur CD34 (cellules $CD34^+$). Des immunoprécipitations (IP) de MOZ et de MLL dans les mêmes cellules indiquent que les deux protéines endogènes interagissent. La transfection de vecteurs codant pour c-Myc-MOZ et HA-MLL dans les cellules HEK293T nous a permis de réaliser des IP avec les protéines exogènes et de confirmer l'interaction.

Afin de déterminer les domaines de MOZ responsables de l'interaction avec MLL, nous avons utilisé des vecteurs d'expression codant pour différents mutants de MOZ. Il s'avère que MLL n'interagit pas avec les mutants ne contenant pas le domaine MYST de MOZ, ce qui suggère que le domaine HAT de MOZ soit essentiel à l'interaction entre MOZ et MLL.

MOZ et MLL sont des co-activateurs transcriptionnels connus, particulièrement des gènes *HOX*. Nous nous sommes donc interrogés sur la fonction de cette association lors de l'activation transcriptionnelle *via* ces deux co-facteurs. A cette fin, les promoteurs des gènes *Hoxa7* ou *MIP1-α* (activé par MOZ en association avec RUNX1) clonés en amont du gène codant pour la luciférase, ont été transfectés dans les cellules U-937 (lignée caractéristique d'une LAM) afin de réaliser des tests de transactivation. La surexpression de MOZ ou de MLL seule induit une augmentation de l'activité luciférase, qui est accrue de manière synergique lorsque les cellules sont co-transfectées avec MOZ et MLL, démontrant ainsi une coopération de MOZ avec MLL dans l'activation transcriptionnelle des gènes *Hoxa7* et *MIP1-α*.

Des immunoprécipitations de la chromatine (ChIP) utilisant des anticorps ciblant MOZ, MLL ou diverses modifications post-traductionnelles des histones catalysées par ces enzymes, à savoir l'acétylation des lysines 9 et 14 de l'histone H3 ou de la lysine 16 de l'histone H4 et la di- ou tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (respectivement AcH3K9K14, AcH4K16, Me_2H3K4, Me_3H3K4) ont été réalisées. Il s'avère que MOZ et MLL sont recrutées au niveau des promoteurs des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9* dans les cellules HEK293T et $CD34^+$. Les différentes modifications des histones sont également retrouvées au niveau de ces promoteurs.

WDR5 représente un des partenaires protéiques de MLL, nécessaire à son activité d'histone méthyl-transférase. Des expériences d'immuno-cytofluorescence montrent que MOZ est co-localisée avec WDR5 dans le noyau des cellules K562. Nous avons aussi mis en évidence par IP que MOZ est capable d'interagir avec WDR5. L'utilisation des mutants de MOZ indique que la partie N-terminale de MOZ est importante dans cette interaction.

MOZ possède un domaine PHD. Ces domaines fixent des lysines d'histones méthylées. Nous avons testé la capacité de MOZ à lier l'histone H3 méthylée sur la lysine 4 par des techniques de précipitations protéiques (*pull-down*). La protéine c-Myc-MOZ, immunoprécipitée ou produite *in vitro*, interagit avec l'histone H3 tri-méthylée sur la lysine 4.

L'inhibition de *MOZ* ou de *MLL* par transfection de siRNA spécifiques, conduit à la baisse du niveau d'expression des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9* dans les cellules $CD34^+$. De manière intéressante, nous avons également mis en évidence que **l'inhibition de *MOZ* induit une baisse du recrutement de MLL au niveau des promoteurs des trois gènes *HOX* étudiés et à l'inverse,** l'inhibition de MLL diminue le recrutement de MOZ. Les modifications des histones catalysées par MOZ et MLL sont retrouvées de manière plus faible après une inhibition de *MOZ* ou de *MLL*.

Enfin, par des tests de différenciation *in vitro* des cellules hématopoïétiques humaines $CD34^+$, nous avons examiné les capacités de différenciation de ces cellules lorsque *MOZ* ou *MLL* sont inhibés. Nous avons constaté une amenuisement des capacités des CD34+ à former des colonies myéloïdes, soulignant ainsi l'importance de MOZ et de MLL dans la différenciation hématopoïétique.

En conclusion, nous avons démontré une coopération fonctionnelle entre l'histone acétyl-transférase MOZ et l'histone méthyl-transférase MLL dans le contexte de la régulation des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9*, dans les cellules hématopoïétiques immatures humaines.

Oncogene (2010) 29, 5019–5031
© 2010 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0950-9232/10
www.nature.com/onc

ORIGINAL ARTICLE

Crosstalk between leukemia-associated proteins MOZ and MLL regulates *HOX* gene expression in human cord blood CD34+ cells

J Paggetti[1,5,6], A Largeot[1,5], R Aucagne[1], A Jacquel[1], B Lagrange[1], X-J Yang[2], E Solary[3], J-N Bastie[1,4] and L Delva[1]

[1]*Inserm UMR 866, Faculty of Medicine, University of Burgundy, Dijon, France;* [2]*Department of Medicine, McGill University Health Centre, Montréal, Québec, Canada;* [3]*Inserm UMR 1009, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France and* [4]*Clinical Hematology Department, University Hospital (CHU), Dijon, France*

***MOZ* and *MLL*, encoding a histone acetyltransferase (HAT) and a histone methyltransferase, respectively, are targets for recurrent chromosomal translocations found in acute myeloblastic or lymphoblastic leukemia. In MOZ (MOnocytic leukemia Zinc-finger protein)/CBP- or mixed lineage leukemia (MLL)-rearranged leukemias, abnormal levels of HOX transcription factors have been found to be critical for leukemogenesis. We show that MOZ and MLL cooperate to regulate these key genes in human cord blood CD34+ cells. These chromatin-modifying enzymes interact, colocalize and functionally cooperate, and both are recruited to multiple *HOX* promoters. We also found that WDR5, an adaptor protein essential for lysine 4 trimethylation of histone H3 (H3K4me3) by MLL, colocalizes and interacts with MOZ. We detected the binding of the HAT MOZ to H3K4me3, thus linking histone methylation to acetylation. In CD34+ cells, depletion of MLL causes release of MOZ from *HOX* promoters, which is correlated to defective histone activation marks, leading to repression of *HOX* gene expression and alteration of commitment of CD34+ cells into myeloid progenitors. Thus, our results unveil the role of the interaction between MOZ and MLL in CD34+ cells in which both proteins have a critical role in hematopoietic cell-fate decision, suggesting a new molecular mechanism by which MOZ or MLL deregulation leads to leukemogenesis.**
Oncogene (2010) **29,** 5019–5031; doi:10.1038/onc.2010.254; published online 28 June 2010

Keywords: MOZ; MLL; *HOX* genes; human CD34+ cells

Correspondence: Dr L Delva, Inserm UMR 866, Centre de Recherche Inserm, IFR 'Santé/STIC, Faculté de Médecine, Université de Bourgogne, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, Dijon 21000, France.
E-mail: Laurent.Delva@u-bourgogne.fr
[5]These authors contributed equally to this work.
[6]Current address: Laboratory of Experimental Hemato-Oncology Public Research Center for Health (CRP-Santé), Luxembourg, Luxembourg.
Received 6 November 2009; revised 31 March 2010; accepted 26 May 2010; published online 28 June 2010

Introduction

MOZ (MOnocytic leukemia Zinc-finger protein) (also called MYST3 or KAT6A) is a histone acetyltransferase (HAT) of the MYST (MOZ/YBF2/SAS2/TIP60 homology domain) family (Borrow *et al*., 1996b; Yang, 2004). In acute myeloblastic leukemia (AML), a chromosomal translocation fuses *MOZ* to a partner gene that can be *CBP*, *p300*, *TIF2*, *NCOA3*, or an unidentified one (Yang, 2004; Esteyries *et al*., 2008). MOZ is a coactivator of various transcription factors particularly with hematopoietic specificity, such as RUNX1 (AML1) or Spi-1/PU.1 (Kitabayashi *et al*., 2001; Katsumoto *et al*., 2006). Analysis of *Moz* knockout mice suggested its important role in the maintenance of hematopoietic stem cells and differentiation of myeloid cells (Katsumoto *et al*., 2006; Thomas *et al*., 2006; Perez-Campo *et al*., 2009).

Mixed lineage leukemia (MLL) (called KMT2A) is a histone methyltransferase (Hess, 2004). After post-translational cleavage, the resulting MLL-N and MLL-C parts become incorporated into a high-molecular-weight protein complex that activates transcription. Rearrangements of the *MLL* gene occur in several human leukemias, including acute lymphoblastic leukemia and AML (Hess, 2004).

MOZ acetylates *in vitro* lysine 16 of histone H4 (H4K16ac) and histone H3 similar to other HATs of the MYST family (Champagne *et al*., 2001; Kitabayashi *et al*., 2001; Carrozza *et al*., 2003). MLL catalyzes di- (H3K4me2) and trimethylation of lysine 4 of histone H3 (H3K4me3) (Hess, 2004). These histone modifications as well as acetylation of histone H3 (H3K9K14ac) and H4K16ac are associated with transcriptionally active regions (Eberharter and Becker, 2002; Santos-Rosa *et al*., 2002; Dion *et al*., 2005). Conversely, trimethylation of lysine 9 of histone H3 (H3K9me3) and trimethylation of lysine 27 of histone H3 (H3K27me3) are repressive marks. These modifications regulate one another, providing regulatory crosstalks. For instance, MLL cooperates with the H4K16 acetyltransferase MOF (Dou *et al*., 2005) to activate transcription. Moreover, H3K4 methylation catalyzed by MLL prevents repression of transcription by antagonizing H3R2 methylation mediated by the histone arginine methyltransferase PRMT6 (Guccione *et al*., 2007).

Abnormal activity of epigenetic modifying enzymes can contribute to cell transformation (Hake *et al*., 2004). Leukemic cells that express *MLL* gene fusions harbor a gene expression profile that distinguishes them from acute lymphoblastic or myeloblastic leukemia without *MLL* gene rearrangements. The genes most differentially expressed are *HOXA5*, *HOXA7* and *HOXA9*, pivotal *HOX* genes in MLL-driven transformation (Hess, 2004; Kohlmann *et al*., 2005). MLL was reported to regulate directly HOX gene expression (Yu *et al*., 1995; Milne *et al*., 2002, 2005; Hsieh *et al*., 2003; Ernst *et al*., 2004; Dou *et al*., 2005).

HOX genes, which encode transcription factors, were first identified for their role in embryogenesis and morphogenesis (McGinnis and Krumlauf, 1992). Later on, it was demonstrated that *HOX* genes exerted a crucial function in normal hematopoiesis (van Oostveen *et al*., 1999). The highly dynamic pattern of their expression characterizes blood lineage specificity and maturation stages (Shen *et al*., 1989; Sauvageau *et al*., 1994). *Hoxa9* is normally expressed in primitive hematopoietic cells, becomes downregulated as cells differentiate and promotes hematopoietic stem cell self-renewal (Argiropoulos and Humphries, 2007). In mice, expression of MLL chimeric proteins such as MLL/ENL or MLL/CBP leads to overexpression of *Hoxa7*, *Hoxa9* and *Meis1* genes essential for leukemic transformation (Ayton and Cleary, 2003).

MOZ/CBP-associated leukemias are also associated with abnormal levels of *Hox* transcripts (Camos *et al*., 2006). Altogether, these observations prompted us to investigate a putative crosstalk of MOZ with MLL through their potential association on specific *HOXA5*, *HOXA7* and *HOXA9* promoters to act on their transcriptional regulation in human hematopoietic multipotent cells.

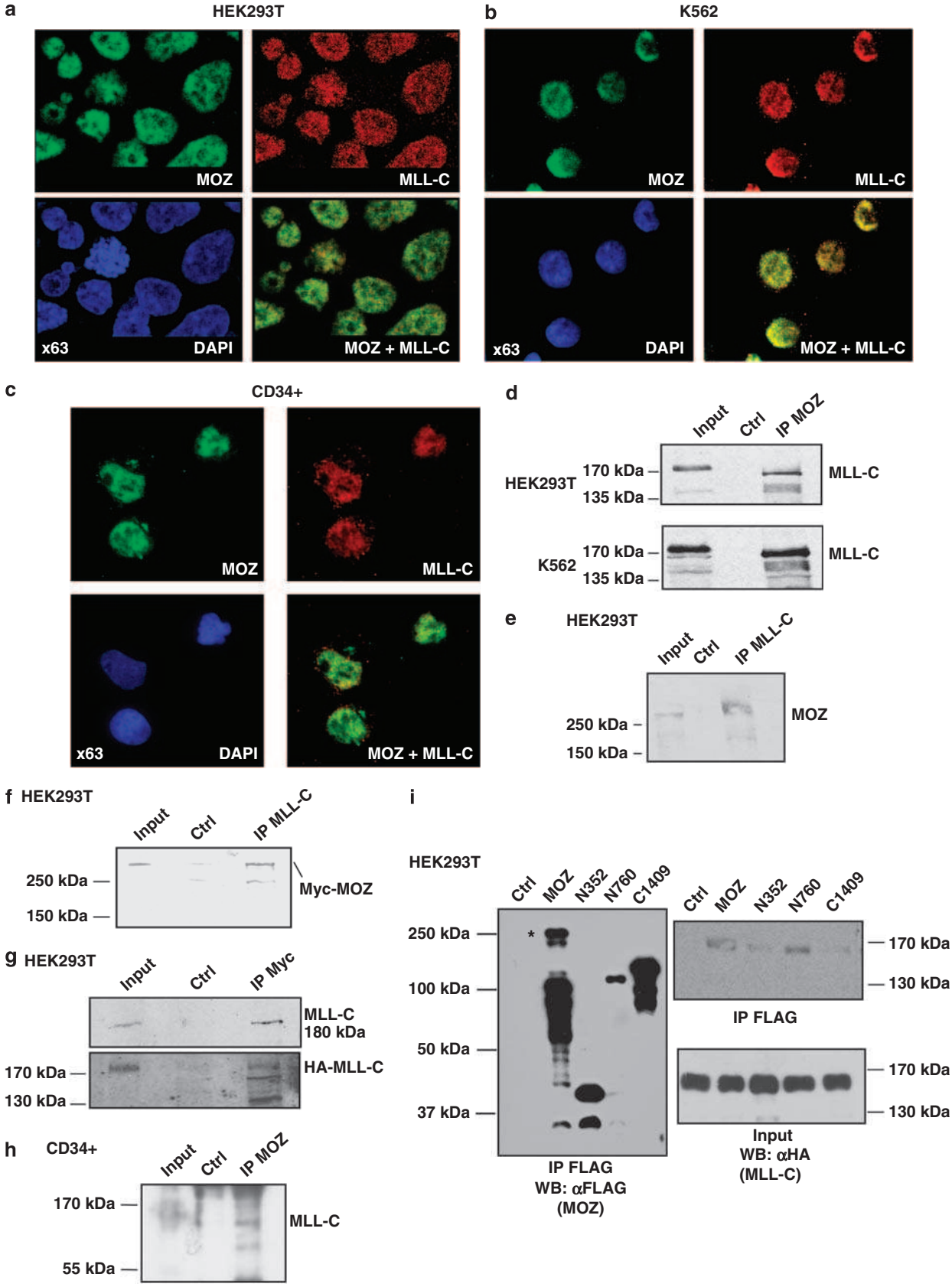
In this study, we demonstrate that MOZ cooperates with MLL to regulate *HOX* gene expression in human cord blood CD34+ cells. Both proteins physically interact, colocalize in the nucleus, cooperate functionally to regulate *HOX* gene expression and are recruited on *HOX* promoters. Furthermore, MOZ associates with the adaptor protein WDR5, which is essential for recognizing trimethylation of H3K4, the specific epigenetic mark of MLL. Interestingly, MOZ also binds to trimethylated lysine 4 of histone H3 (H3H4me3), thus coupling histone acetylation to histone methylation. In CD34+ cells, downregulation of MLL causes release of MOZ from *HOX* promoters, which is correlated to defective histone activation marks and a decrease of *HOX* gene expression. On the other hand, myeloid colony formation is altered in small interfering RNA (siRNA)-MLL or -MOZ targeted CD34+ cells. Therefore, this study unravels a crucial partnership between MOZ and MLL in the epigenetic control of *HOX* promoter genes and in HOX expression, in human multipotent CD34+ cells. Alteration of the MOZ/MLL crosstalk involving a deregulation of hematopoietic transcription factors could affect the differentiation process and increase the capacity to create leukemogenic abnormalities in hematopoietic cells.

Results

MOZ colocalizes and interacts with MLL in vivo

MOZ has been previously described as a nuclear protein in hematopoietic and nonhematopoietic cell lines (Kindle *et al*., 2005). This cellular localization was confirmed by indirect immunofluorescence microscopy (Figures 1a–c) in the human embryonic kidney cell line HEK293T, the myeloid leukemia cell line K562 and the human cord blood CD34+ cells. The cellular localization of MLL was tested simultaneously and the nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in HEK293T (Figure 1a), K562 (Figure 1b) and CD34+ cells (Figure 1c). MOZ displayed a predominantly nuclear diffuse localization pattern and was also localized into discrete subnuclear speckles (Figures 1a–c). Likewise, MLL appeared to be localized in the nucleus (Figures 1a–c) and the overlay suggested colocalization of MOZ and MLL in this compartment as a mixed (yellow) color was observed (Figures 1a–c).

Figure 1 MOZ colocalizes and interacts with MLL *in vivo*. (**a**–**c**) Immunofluorescence microscopy to detect endogenous MOZ and MLL proteins in HEK293T (**a**), K562 (**b**) and CD34+ cells (**c**). MOZ proteins were identified with an anti-MOZ antibody (green) and MLL with an anti-MLL-C antibody (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Overlay of the previous images shows colocalization (yellow) of both proteins in the nucleus after fluorescence confocal microscopic analysis (**a**) or epifluorescence microscopic analysis followed by deconvolution (**b**, **c**). (**d**) Coimmunoprecipitation of MOZ with MLL from HEK293T or K562 cell extracts. Whole-cell extracts were used for immunoprecipitation with an anti-MOZ antibody, then immunoprobed with an anti-MLL-C antibody. Input: unprecipitated extracts; ctrl: control IP. (**e**) Coimmunoprecipitation of MLL with MOZ in HEK293T cells. Whole-cell extracts were immunoprecipitated with an anti-MLL-C antibody, then immunoprobed with an anti-MOZ antibody. Input: unprecipitated extracts; ctrl: control IP. (**f**) Coimmunoprecipitation of Myc-MOZ with MLL-C. Expression plasmids for HA-MLL and Myc-MOZ were transfected into HEK293T cells. Whole-cell soluble extracts were immunoprecipitated with the anti-MLL-C antibody and then immunoprobed with an anti-Myc antibody. Input: unprecipitated extracts; ctrl: control IP. (**g**) Coimmunoprecipitation of HA-MLL-C with Myc-MOZ. Expression plasmids for HA-MLL and Myc-MOZ were transfected into HEK293T cells. Whole-cell soluble extracts were immunoprecipitated with an anti-MLL-C antibody and then immunoprobed either with anti-MLL-C (upper panel) or anti-HA (lower panel) antibodies. Input: unprecipitated extracts; ctrl: control IP. (**h**) Coimmunoprecipitation of MLL with MOZ in CD34+ cells. Whole-cell extracts were immunoprecipitated with an anti-MOZ antibody, then immunoprobed with an anti-MLL-C antibody. Input: unprecipitated extracts; ctrl: control IP. (**i**) Coimmunoprecipitation of HA-MLL-C with FLAG-MOZ (or its deletion mutants). The expression plasmids for HA-MLL was transfected into HEK293T cells alone (Ctrl) and with FLAG-MOZ (MOZ) or its deletion mutants (N352, N760, C1409) as indicated. Left panel: whole-cell soluble extracts were immunoprecipitated with the anti-FLAG M2 affinity gel and then immunoprobed with the anti-FLAG M2 antibody. Full-length MOZ is marked by an asterisk. Lower bands correspond to degradation products of full-length MOZ. Right panel: whole-cell soluble extracts immunoprecipitated with the anti-FLAG M2 affinity gel (top) or whole-cell soluble extracts (bottom) were immunoprobed with the anti-HA antibody.


a
HEK293T
MOZ
MLL-C
x63
DAPI
MOZ + MLL-C
b
K562
MOZ
MLL-C
x63
DAPI
MOZ + MLL-C
c
CD34+
MOZ
MLL-C
x63
DAPI
MOZ + MLL-C
d
Input
Ctrl
IP MOZ
HEK293T
170 kDa
135 kDa
MLL-C
K562
170 kDa
135 kDa
MLL-C
e
HEK293T
Input
Ctrl
IP MLL-C
250 kDa
150 kDa
MOZ
f HEK293T
Input
Ctrl
IP MLL-C
250 kDa
150 kDa
Myc-MOZ
g HEK293T
Input
Ctrl
IP Myc
MLL-C
180 kDa
HA-MLL-C
170 kDa
130 kDa
h CD34+
Input
Ctrl
IP MOZ
170 kDa
55 kDa
MLL-C
i
HEK293T
Ctrl
MOZ
N352
N760
C1409
250 kDa
100 kDa
50 kDa
37 kDa
*
IP FLAG
WB: αFLAG
(MOZ)
Ctrl
MOZ
N352
N760
C1409
170 kDa
130 kDa
IP FLAG
170 kDa
130 kDa
Input
WB: αHA
(MLL-C)

To establish whether this colocalization was corroborated with a biochemical *in vivo* interaction, we performed endogenous coimmunoprecipitation assays. We generated a monoclonal antibody against residues 856–870 of MOZ. This antibody was used to immunoprecipitate the protein from HEK293T or hematopoietic K562 cell lysates (Figure 1d). In the MOZ immunoprecipitate, a mouse monoclonal antibody specific to MLL-C identified a single band. In addition, MOZ was detected after immunoprecipitation with the MLL-C antibody (Figure 1e), indicating that endogenous MLL and MOZ proteins interact with each other. We confirmed this interaction with exogenous epitope-tagged proteins. The anti-MLL-C antibody coimmunoprecipitated the Myc-tagged MOZ from extracts of HEK293T cells cotransfected with the corresponding expression vectors (Figure 1f). Likewise, anti-Myc or anti-FLAG antibodies coimmunoprecipitated exogenous HA-MLL-C corresponding to the same band as the one detected with the anti-MLL-C antibody (Figures 1g and i). In the human cord blood CD34+ cells, MLL-C was detected after immunoprecipitation with the MOZ antibody (Figure 1h), indicating that both endogenous MLL and MOZ interact in hematopoietic stem/progenitor cells. We also studied the putative interaction of MOZ with MLL-N. In HEK293T cells, MLL-N was coimmunoprecipitated by an anti-MOZ (Supplementary Figure 1a).

To identify the region(s) of MOZ essential for interaction with MLL-C, extracts from HEK293T cells transiently transfected with both HA-MLL-C and FLAG-MOZ (or the three FLAG-tagged MOZ deletion mutants N352, N760 and C1409 (Supplementary Figure 1b) (Ullah *et al*., 2008) were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. The presence of MOZ proteins or MLL-C in the immunoprecipitates was assessed by immunoblotting with anti-FLAG or anti-HA antibodies, respectively (Figure 1i). MLL-C coimmunoprecipitated with mutant N760 (containing the N-terminal 760 residues) (Ullah *et al*., 2008). By contrast, mutants N352 (containing the N-terminal 352 residues) and C1409 (containing the C-terminal 595 residues) interacted very weakly with MLL-C, although the amount of proteins immunoprecipitated was much higher than that observed for mutant N760 (Figure 1i). Altogether, these results indicate that MOZ interacts with MLL.

MOZ and MLL synergistically stimulate the HoxA7 promoter activity

HOXA5, *HOXA7* and *HOXA9* are downstream targets of MLL (Hess, 2004). To examine the potential cooperative effect of MOZ and MLL on *HOX* gene activation, we asked first whether exogenous MOZ would enhance the activity of the murine *HoxA7* promoter (cloned directly in front of a luciferase gene without the presence of a minimal promoter), which is conserved between human and mouse (Knittel *et al*., 1995). The luciferase vector harboring the *HoxA7* promoter was co-transfected with various amounts of MOZ expression plasmid or control empty vector into human HEK293T cells before measuring luciferase activity. MOZ demonstrated a dose-dependent enhancement of *HoxA7* promoter activity (Figure 2a). The ability of MOZ to increase *Hox* gene transcription was further established by studying *Hoxa5*, *Hoxa7* and *Hoxa9* mRNA after transfection of HEK293T cells with a Myc-tagged MOZ (approximately twofold increase, data not shown). MLL also transactivated the *HoxA7* promoter in a dose-dependent manner (Figure 2b). Interestingly, when MOZ was co-transfected with MLL in the monoblastic cell line U-937, the expression of the reporter gene luciferase was synergistically increased in comparison with MOZ and MLL tested separately (Figure 2c). The synergistic effect of MOZ and MLL was confirmed by using the *MIP1-α* gene promoter, a previously described target of MOZ (Figure 2d) (Bristow and Shore, 2003).

Both MOZ and MLL are recruited to the same HOX *loci* in vivo

To determine whether MOZ and MLL were recruited to the same region of *HOX* genes promoters (Figure 3a), we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments. Chromatin was prepared from HEK293T cells (Figure 3b), then immunoprecipitated with an anti-MLL or an anti-MOZ (lanes 3 and 4) antibody. Serial dilutions of the chromatin from HEK293T or CD34+ cells were used to demonstrate the linearity of PCR (Supplementary Figure 2). These experiments demonstrate that MOZ and MLL are recruited to the same *HOXA7* promoter sequence, which correlates with the MOZ- and MLL-dependent transactivation of *HOXA7*. MLL and MOZ are also recruited to *HOXA5* and to *HOXA9* promoters in HEK293T cells (Figure 3b). Epigenetic activating marks corresponding to acetylated and methylated forms of histones H3 (H3K9K14ac) and H4 (H4K16ac) (Figure 3b) as well as the di- and trimethylated forms of H3K4 were detected (Figure 3b).

The recruitment of MOZ and MLL on *HOX* genes promoters was then explored in human cord blood CD34+ cells as *HOX* genes exert crucial functions in these cells (van Oostveen *et al*., 1999). ChIP assays performed in lysates from $CD34^+$ cells indicated that MLL and MOZ were both recruited to *HOXA5*, *HOXA7* and *HOXA9* promoters, which correlated with the presence of H3K9K14ac, H4K16ac, H3K4me2 and H3K4me3 as in tested cell lines (Figure 3c). These results suggest that MOZ and MLL are recruited to the same *HOX* loci *in vivo*, and this recruitment is associated with activating epigenetic marks.

MOZ interacts with WDR5 and recognizes trimethyl lysine 4 of histone H3

Several proteins have been reported recently to selectively bind methylated K4 of histone H3, such as CHD1 and JMJD2A (Sims *et al*., 2005; Huang *et al*., 2006), as well as the WD40-repeat protein WDR5 (Wysocka *et al*., 2005). WDR5 is a major H3K4-methyl-associated protein and a common component of mammalian H3K4 methyltransferase complexes (Wysocka *et al*., 2005).

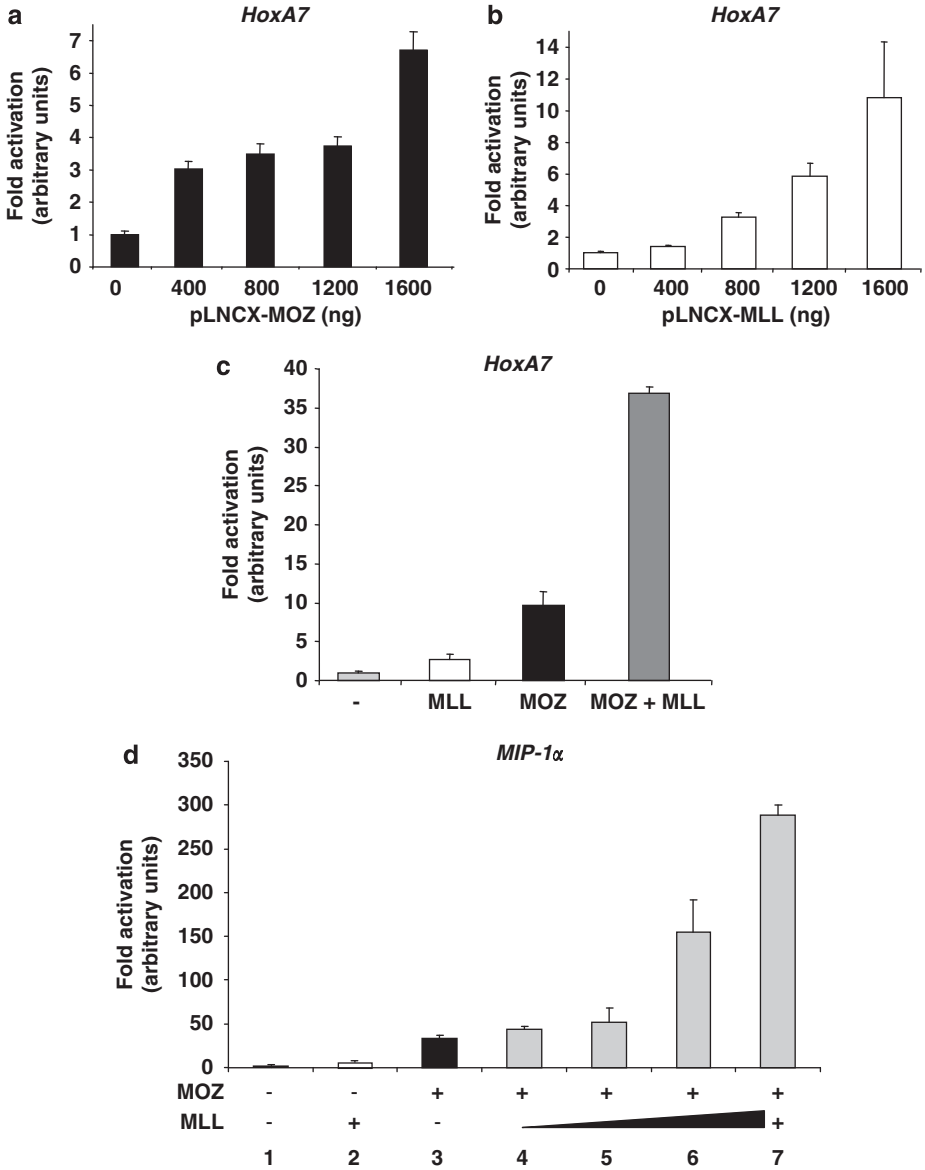


Figure 2 MOZ enhances MLL-dependent *HoxA7* promoter activity. (**a**) MOZ potentiates *HoxA7* transactivation. HEK293T cells were transiently transfected with the luciferase reporter construct *HoxA7*-Luc (100 ng), the β-galactosidase internal control plasmid TK-β-Gal (50 ng) and the MOZ expression plasmid (400, 800, 1200 or 1600 ng) as indicated. (**b**) MLL enhances *HoxA7* transactivation. HEK293T cells were transiently transfected with *HoxA7*-Luc (100 ng), TK-β-Gal (50 ng) and the MLL expression plasmid (200, 400, 800 or 1600 ng) as indicated. (**c**) MOZ and MLL synergistically activate the *HoxA7* promoter. U-937 cells were transiently transfected with *HoxA7*-Luc (100 ng), TK-β-Gal (50 ng), along with the MOZ (1000 ng) and/or MLL (1000 ng) expression plasmid as indicated. (**d**) MLL enhances MOZ-dependent *MIP-1α* promoter activity. U-937 cells were transiently transfected with the luciferase reporter construct *MIP-1α*-Luc (700 ng), TK-β-Gal (100 ng), along with MOZ (600 ng) and/or MLL (lane 4, 100 ng; lane 5, 300 ng; lane 6, 600 ng; lanes 2 and 7, 900 ng) expression plasmids. (**a**–**d**) All transfection points were equalized for the total amount of transfected plasmids with a CMV empty vector. At 48 h after transfection, cells were collected, and luciferase activities were measured. All luciferase values were adjusted for transfection efficiency using the TK-β-Gal internal control. Results are expressed as fold induction compared to the activity of the reporter gene construct alone. The graph represents the luciferase activity from a representative independent experiment out of three. Mean ± s.d. of triplicates.

This protein is not essential for the recruitment of MLL complexes to chromatin (Huang *et al*., 2006), but its interaction with histone H3 may stabilize or enhance the assembly of MLL complexes at promoters, thereby facilitating trimethylation of K4 and stimulating transcriptional activation at specific gene loci. Indeed, we confirmed the interaction of MLL with WDR5 in HEK293T (Figure 4b) or K562 cells (Figure 4c). With regard to the localization of MOZ with WDR5, we identified in K562 cells that WDR5 partially colocalized with MOZ into the nuclear compartment (Figure 4a). In addition, coimmunoprecipitation experiments identified an interaction between endogenous MOZ and WDR5 in both HEK293T (Figure 4b) and K562 cells (Figure 4c).

To identify the region(s) of MOZ essential for interaction with WDR5, extracts from HEK293T cells

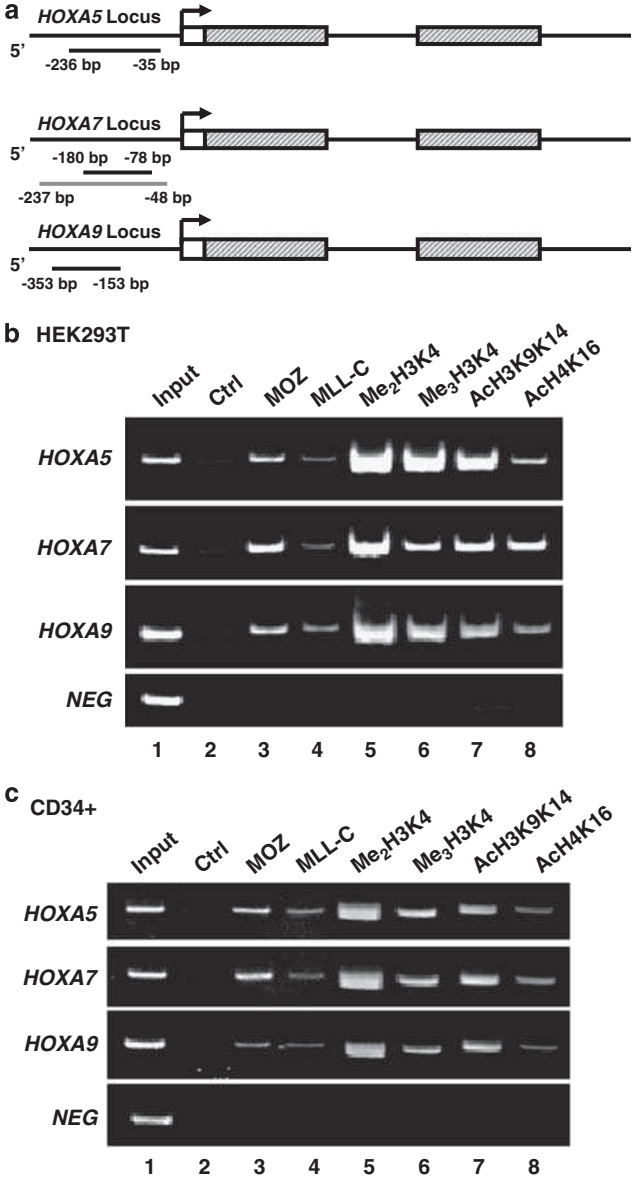


Figure 3 MOZ and MLL bind to the *HOXA5*, *HOXA7* and *HOXA9* proximal promoter regions, concomitantly with specific epigenetic modifications. (**a**) Schematic representation of parts of the *HOXA5*, *HOXA7* and *HOXA9* loci (not to scale). The positions of the primers used to reveal the ChIPs by PCR are indicated, relative to the *HOXA5*, *HOXA7* and *HOXA9* transcription start site (arrow). For *HOXA7*, the primers used for real-time qPCR (black) are different from those used for PCR (gray). MOZ and MLL are recruited onto the *HOX* promoter regions in HEK293T (**b**) and CD34+ cells (**c**). ChIP analysis examining the recruitment of MOZ and MLL to the *HOXA5*, *HOXA7* and *HOXA9* promoters, or to a negative (NEG) nonrelated region (lanes 3 and 4). Lanes were loaded with products of PCR amplification using template prepared from either 1% sheared chromatin (input control) (lane 1) or immunoprecipitated chromatin using IgG (lane 2) or specific antibodies directed against MOZ (lane 3) or MLL (lane 4). ChIP analysis examining the status of histone modifications on *HOXA5*, *HOXA7* and *HOXA9* promoters, or on a negative (NEG) region (lanes 5–8). Lanes were loaded with products of PCR amplification using template prepared from immunoprecipitated chromatin using specific antibodies directed against dimethylated H3K4 (lane 5), trimethylated H3K4 (lane 6), acetylated histone H3 (lane 7) or acetylated histone H4K16 (lane 8).

transiently transfected with FLAG-MOZ (or the three FLAG-tagged MOZ deletion mutants N352, N760 and C1409) (Ullah *et al*., 2008) were immunoprecipitated with anti-WDR5 antibody. The presence of WDR5 in the immunoprecipitates was assessed by immunoblotting with anti-WDR5 antibody (Figure 4d). WDR5 coimmunoprecipitated with mutant N352 as well as mutant N760. In contrast, mutant C1409 did not interact (Figure 1d). These results indicate that the WDR5-interaction domain is located within the N-terminal domain of MOZ. Hence, MOZ interacts with MLL as well as with WDR5.

As MOZ harbors PHD fingers similar to those that are able to bind methyl-lysine-containing motifs, we examined whether MOZ could selectively bind to methylated H3K4. To this end, we performed histone tail peptide assays. Lysates from HEK293T cells transfected with a Myc-tagged-MOZ construct were incubated with biotinylated synthetic histone H3 peptides (from the tail of H3) that were either unmodified or methylated on K4. These lysates were then mixed with neutravidin-coated agarose beads and, after washing, the proteins that remained bound to the peptides were dissolved in SDS loading buffer, resolved by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with an anti-Myc antibody. As expected, WDR5 was recruited to the trimethyl K4 of histone H3 (Figure 4g) (Wysocka *et al*., 2005). Interestingly, MOZ is also able to bind this trimethyl K4 of histone H3 (Figure 4e). To determine a direct interaction, we carried out *in vitro* histone tail peptide assays by using *in vitro*-translated Myc-MOZ, and observed that synthesized Myc-MOZ binds to trimethyl K4 of histone H3 (Figure 4f). Therefore, our results identify the ability for this HAT to bind directly to the trimethyl K4 of histone H3.

MOZ or MLL knockdown alters HOX promoter recruitment, epigenetic modifications and HOX gene expression

Knockdown of MLL (Supplementary Figure 3a) or MOZ (Supplementary Figure 3b) in CD34+ cells using siRNA caused a strong and specific decrease in the corresponding RNA and protein levels. MLL or MOZ siRNA did not affect the expression of MOZ or MLL, respectively (Supplementary Figures 3a and b). ChIP experiments followed by quantitative PCR on *HOXA5*, *HOXA7* and *HOXA9* regions (Figure 5a) indicated that binding of MOZ to the *HOX* promoters was decreased after MOZ or MLL siRNA knockdown, suggesting that MOZ and MLL cooperate on *HOX* promoters *in vivo*. Semiquantitative PCR also suggested that MLL was less recruited onto the *HOX* regions when CD34+ cells were co-transfected with MOZ siRNA (Supplementary Figure 4a). In addition, it has been recently reported that the absence of Moz in mice results in reduced association of Mll1 with *Hox* gene loci and reduced *Hox* gene expression, suggesting that Moz may recruit Mll1 to *Hox* gene loci (Voss *et al*., 2009).

To examine whether MLL and MOZ control histone post-translational modifications, CD34+ cells were

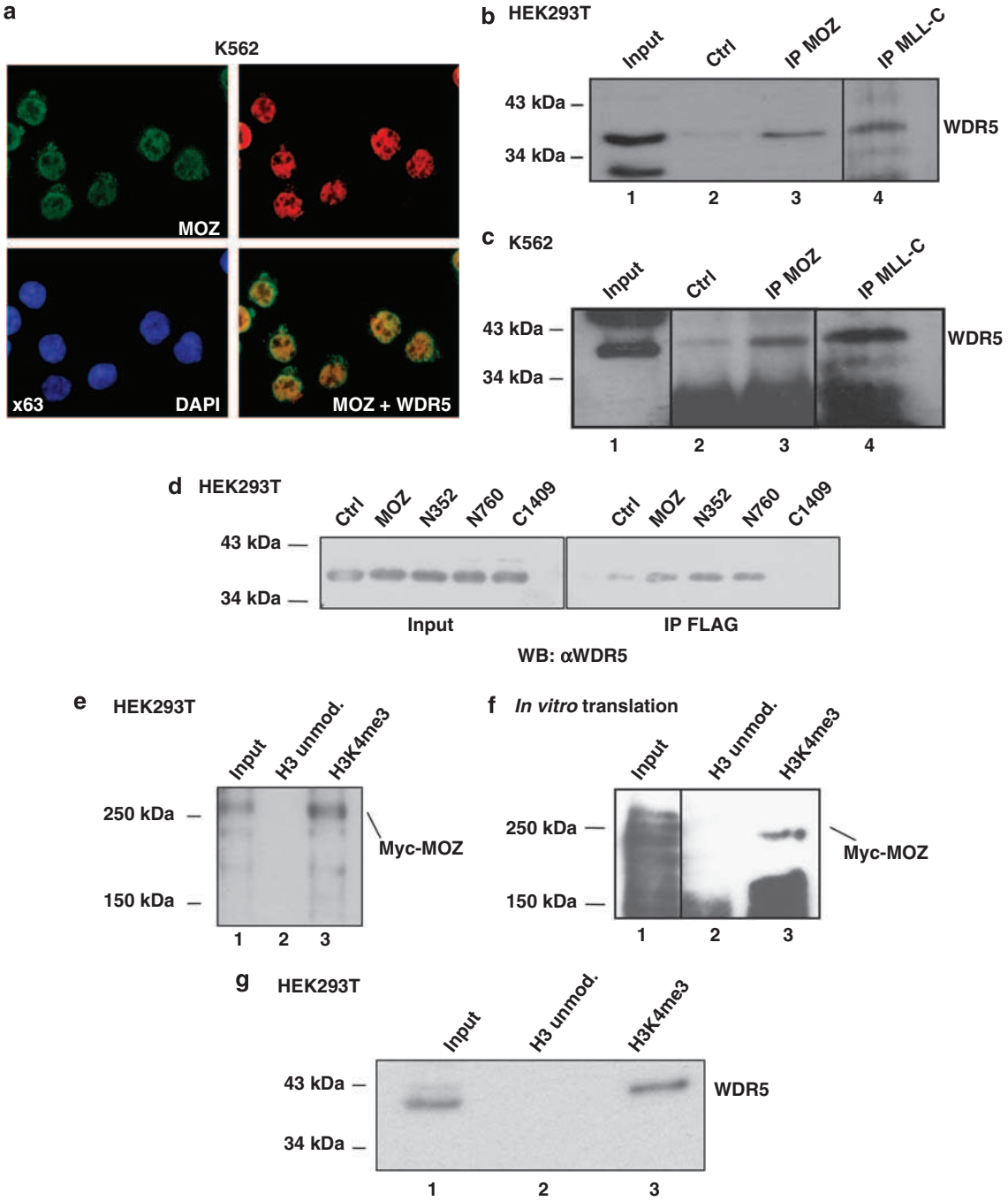
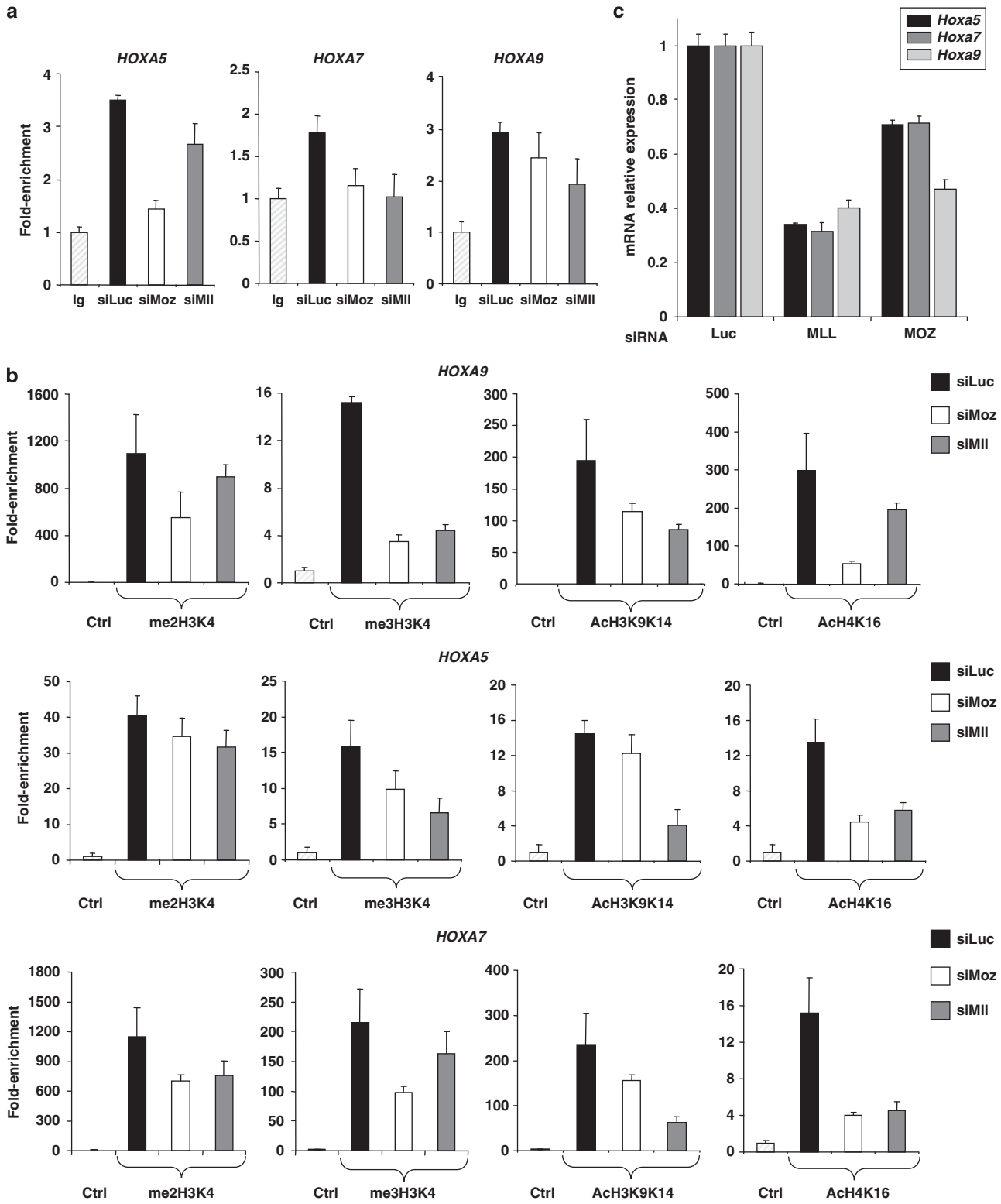


Figure 4 MOZ colocalizes and interacts with WDR5, and MOZ binds to H3K4me3. (**a**) Endogenous MOZ and WDR5 colocalize in the nucleus. Epifluorescence microscopic images after deconvolution analysis of endogenous MOZ and WDR5 proteins in K562 cells. MOZ proteins were detected with anti-MOZ (green) and WDR5 with anti-WDR5 (red) antibodies in K562 cells. The nuclei are counterstained with DAPI (blue). Overlay of the previous images shows colocalization (yellow) of both proteins in the nucleus. (**b**, **c**) MOZ and MLL interact *in vivo* with WDR5 in HEK293T (**b**) and K562 (**c**) cells. Whole-cell extracts from cells were used for immunoprecipitation with the anti-MOZ antibody (lane 3) or the anti-MLL-C antibody (lane 4), and then immunoprobed with an anti-WDR5 antibody (lanes 1–4). Lane 1 corresponds to unprecipitated extracts (input) and lane 2 to control IP. (**d**) Coimmunoprecipitation of WDR5 with FLAG-MOZ (or its deletion mutants). The expression plasmids for FLAG-MOZ (MOZ) or its deletion mutants (N352, N760, C1409) were transfected into HEK293T cells as indicated. Left panel: whole-cell soluble extracts were immunoprobed with the anti-WDR5 antibody. Right panel: whole-cell soluble extracts immunoprecipitated with the anti-FLAG M2 affinity gel were immunoprobed with the anti-WDR5 antibody. (**e**, **g**) MOZ interacts *in vivo* with trimethyl K4 of H3. HEK293T cells were transiently transfected with the Myc-MOZ expression plasmid. Histone tail peptide assays were performed with HEK293T cell extracts and unmodified (unmod.) (lane 2) or trimethyl H3K4 peptides (lane 3). Bound polypeptides were analyzed by SDS–PAGE and immunoblotted with anti-Myc (**e**) or anti-WDR5 (**g**) (lanes 1–3). Lane 1 corresponds to the input. (**f**) MOZ interacts directly with trimethyl K4 of H3 *in vitro*. Histone peptide assays were performed with Myc-MOZ produced by *in vitro* translation in reticulocytes lysates, and unmodified (unmod.) (lane 2) or trimethyl H3K4 peptides (lane 3). Bound polypeptides were analyzed by SDS–PAGE and immunoblotted with anti-Myc (lanes 1–3). Lane 1 corresponds to the input.

transfected either with MLL siRNA or MOZ siRNA followed by ChIP analysis of the *HOX* promoters (Figure 5b). As expected, MLL knockdown caused a decrease in H3K4me2 and H3K4me3 levels. H3K4me2 and -me3 levels were also affected negatively by MOZ knockdown, suggesting a functional cooperation between MOZ and MLL at the level of the studied promoters. Moreover, both MLL and MOZ knockdowns provoked a partial decrease of H3K9K14ac and H4K16ac levels indicating the involvement of MOZ in



these epigenetic modifications *in vivo*. As a control, we also carried out a PCR analysis on GAPDH promoter, after ChIP experiments in siRNA-transfected CD34+ cells. We did not observe any binding of either MOZ or MLL in control and siRNA-treated CD34+ cells and no variations with regard to the post-translational histone modifications (Supplementary Figure 4b). *Hox* gene expression decreased to ~60% in MLL siRNA-treated CD34+ cells and ~40% in MOZ siRNA-treated CD34+ cells (Figure 5c). Hence, MOZ and MLL may be associated *in vivo* to regulate HOX expression in these cells.

Knockdown of MOZ or MLL inhibits myeloid colony formation from CD34+ cells

To investigate whether reduction in MOZ or MLL expression in CD34+ cells could affect their ability to form myeloid colonies, we transfected MOZ or MLL siRNA duplex in these cells, and performed myeloid colony assays. We observed that a decrease in MOZ expression affected the number of myeloid colony, that is, provoked a decrease in the number of monocyte colony-forming units and granulocyte colony-forming units after 14 days of culture (Figure 6). A similar effect was identified in MLL siRNA-treated CD34+ cells.

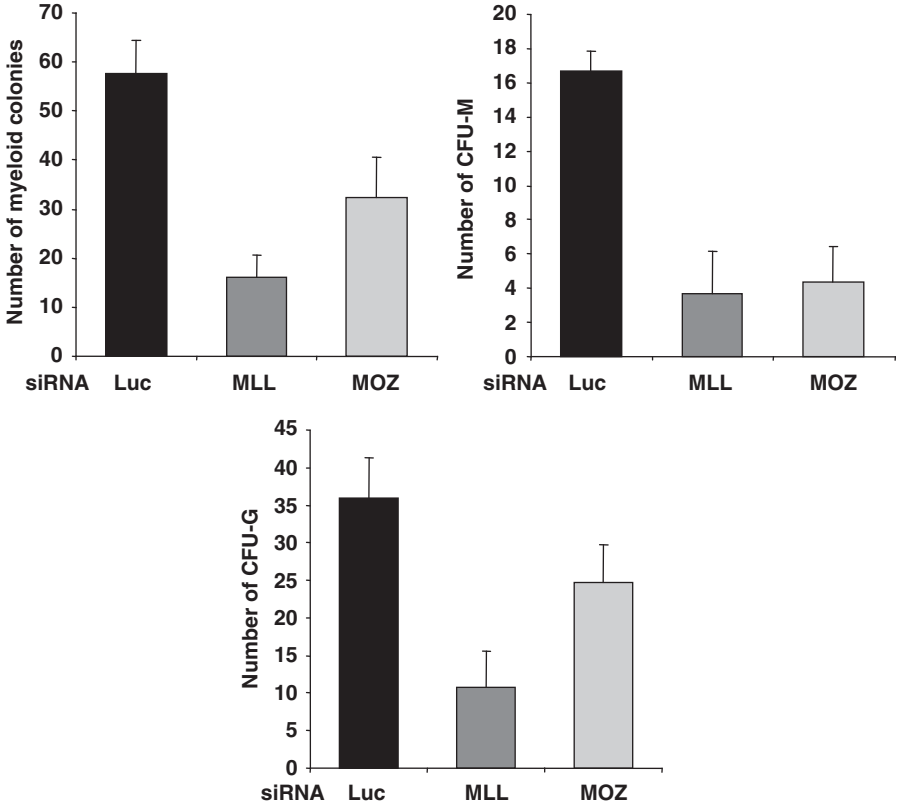


Figure 6 Altered myeloid colony formations from siRNA MOZ- or MLL-treated CD34+ cells. siRNA-transfected CD34+ cells were plated 2 days after transfection in appropriate methyl-cellulose medium, and colonies were scored 14 days later. The three graphs correspond to the number of myeloid progenitors, the number of monocyte colony-forming units progenitors, and the number of granulocyte colony-forming units progenitors, respectively.

Figure 5 Cooperation of MOZ with MLL on *HOX* gene promoters. (**a**) The recruitment of MOZ is altered in the absence of MLL. Purified CD34+ cells were transfected once with 500 pmol of Luc siRNA, MOZ siRNA or MLL siRNA. Then, a ChIP analysis examining the recruitment of MOZ on *HOXA5*, *HOXA7* and *HOXA9* promoters in CD34+ cells was carried out 24 h later. MOZ enrichment at the *HOXA5*, *HOXA7* and *HOXA9* promoters was measured by real-time qPCR. The fold enrichment corresponds to the calculated ratio between the recruitment of MOZ (values obtained by the standard curve method) and the input, normalized by the result obtained with the IgG (Ig = 1). Error bars (s.d.) correspond to the average of triplicates. Each ChIP experiment was performed twice independently. (**b**) Post-translational modifications of histones are altered in the absence of MLL or MOZ. Purified CD34+ cells were transfected once with 500 pmol of Luc siRNA, MOZ siRNA or MLL siRNA. Then, a ChIP analysis examining the status of histone modifications on *HOXA5*, *HOXA7* and *HOXA9* promoters in CD34+ cells was performed 24 h later. The enrichment of post-translational modifications of histones (dimethylated H3K4 (me2H3K4), trimethylated H3K4 (me3H3K4), acetylated histone H3 (AcH3K9K14) or acetylated H4K16 (AcH4K16) was measured by real-time qPCR. The fold enrichment corresponds to the calculated ratio between the recruitment of the different modifications (values obtained by the standard curve method) and the input, normalized by the result obtained with the IgG (Ig = 1). Error bars (s.d.) correspond to the average of triplicates. Each ChIP experiment was performed twice independently. (**c**) MOZ or MLL siRNA treatment decreased the *Hox* mRNA levels. Purified CD34+ cells were transfected once with 500 pmol of Luc siRNA, MLL siRNA or MOZ siRNA. Total RNA obtained from these cells was analyzed for Hoxa5, Hoxa7 or Hoxa9 mRNA level using real-time RT–PCR 24 h later. Data were normalized to the endogenous Hprt mRNA control. Data: mean ± s.d. of triplicates. Four independent experiments were performed.

Therefore, depleted MOZ and MLL CD34+ cells are impaired in their ability to differentiate into myeloid progenitors, suggesting a role of both modifying enzymes in myelopoiesis.

Discussion

This study demonstrates that the MYST family HAT MOZ and the histone methyltransferase MLL interact and cooperate with each other in epigenetic modifications of *HOX* gene promoters, particularly in human cord blood CD34+ cells. These two associated proteins act on H3K4 methylation and H4K16 acetylation, respectively, interact potentially with DNA-binding transcription factors and stimulate transcription of MLL target genes, that is, expression of several *HOX* genes.

The role of histone modifications in regulating gene activation and repression was described several years ago (Jenuwein and Allis, 2001). Histone acetylation and histone H3K4 methylation are predominant modifications associated with gene activation, whereas histone H3K9 methylation is correlated with gene repression. The H3K4 methyltransferase MLL was found to interact with the HAT CBP (Ernst *et al*., 2001), as well as the SWI/SNF chromatin-remodeling complex (Rozenblatt-Rosen *et al*., 1998), to activate the transcription of targets genes. An MLL supercomplex appears to function at the level of promoters. This evolutionarily conserved histone post-translational modification complex could recruit other proteins that are either activators or repressors of transcription (Milne *et al*., 2002; Nakamura *et al*., 2002).

MOZ and MLL colocalize and interact *in vivo*. Both proteins cooperate to enhance the expression of MLL-regulated *HOX* genes, which may affect hematopoietic progenitor cell formation. MLL is able to modify histones at the promoters of certain *HOX* genes, maintaining gene transcription through its SET domain as it harbors histone H3K4 methyltransferase activity (Milne *et al*., 2002; Nakamura *et al*., 2002). One important function of MLL is the maintenance of *HOX* genes expression during embryonic development.

Homeodomain genes (*HOX*) encode transcription factors regulating pattern formation, differentiation and proliferation. There is considerable evidence correlating deregulated *HOX* expression with human acute leukemia, including translocations targeting specific *HOX* genes such as *HOXA9* (Borrow *et al*., 1996a) or MLL, which normally acts as a direct regulator of *HOX* expressions (Hanson *et al*., 1999). Abnormal expression of murine *Hoxa7* and *Hoxa9* cause AML (Nakamura *et al*., 1996). *HOXA9* is the single most informative gene discriminating AML from acute lymphoblastic leukemia (Golub *et al*., 1999). Furthermore, overexpression of HOXA5 acts on myeloid proliferation and differentiation (Crooks *et al*., 1999). MLL was shown to regulate directly HOX gene expression (Yu *et al*., 1995; Milne *et al*., 2002, 2005; Hsieh *et al*., 2003; Ernst *et al*., 2004; Dou *et al*., 2005). In our present study, ChIP experiments in CD34+ cells indicate that both MLL and MOZ are recruited to *HOXA5*, *HOXA7* and *HOXA9* promoters, which correlates with the detection of activation epigenetic marks, such as H3K9K14ac, H4K16ac, H3K4me2 and H3K4me3. Knockdown of MLL or MOZ inhibits MOZ recruitment and the epigenetic marks from *HOX* promoters due to the enzymatic activities of MOZ or MLL. Furthermore, it was recently shown a possible functional link between Moz and Mll1 in mouse embryos (Voss *et al*., 2009). In mice, Moz seems to be required for normal *Hox* gene expression and body segment identity specification, like TrxG proteins, but Moz is also required for the association of Mll1 with *Hox* gene loci *in vivo*. These results suggest that MLL and MOZ functionally cooperate to modulate *HOX* gene expression through specific epigenetic modifications, likely also in human CD34+ cells.

However, we have to take into account that MLL or MOZ does not function as single enzymes. Indeed, it has emerged as a common theme that noncatalytic subunits regulate the acetyltransferase activity and substrate specificity of the MYST family of HATs. Furthermore, similar to most histone-modifying enzymes, the MLL-family methyltransferases exist in multiprotein complexes. As MOZ is the catalytic subunit of a tetrameric complex (Ullah *et al*., 2008) and MLL is a methyltransferase belonging to different multisubunit complexes (Ruthenburg *et al*., 2007), it will be interesting to investigate how the noncatalytic subunits of the complexes are involved in the cooperation between MOZ and MLL to act on *HOX* gene expression.

Association of MOZ with hematopoietic transcription factors such as AML1 or Spi-1/PU.1 (Kitabayashi *et al*., 2001; Katsumoto *et al*., 2006) could take place within an MLL complex. Indeed, it was recently shown that interactions between AML1/RUNX1 and MLL provide epigenetic regulation of gene expression in normal hematopoiesis and in leukemia (Huang G, personal communication) (Huang *et al*., 2008). MOZ is also associated with other transcription factors such as RUNX2, C/EBPα, C/EBPβ, c-Jun, NF-κB, Nrf2/MafK and p53 (Pelletier *et al*., 2002; Ohta *et al*., 2005, 2007; Katsumoto *et al*., 2006; Chan *et al*., 2007; Rokudai *et al*., 2009). In addition, it was reported that MLL is a protein partner of p53 (Dou *et al*., 2005) and HCF-1 in a cell cycle-dependent manner (Tyagi *et al*., 2007).

Our results also demonstrate that MOZ is a partner of both MLL and WDR5. The tandem PHD fingers of MOZ, which are similar to those identified in Requiem and homologs (Borrow *et al*., 1996b; Nabirochkina *et al*., 2002), could recognize methyl-lysine-containing motifs (Kouzarides, 2007). WDR5 was shown to cooperate with the nucleosome-remodeling factor NURF (Wysocka *et al*., 2006). Furthermore, the MLL–WDR5 complex was proposed to be essential in regulating the establishment and spreading of K4 methylation, in conjunction with H4 K16 acetylation, in transcriptionally active chromatin (Dou *et al*., 2005). In this study, we show that MOZ interacts directly with the lysine 4 of histone H3. MLL, WDR5 and MOZ may be associated to trigger trimethylation of H3K4. Hence, MOZ may couple

histone acetylation to histone methylation throughout its recruitment on lysine methylated by MLL.

MLL was also found to be associated with MOF, a histone H4 K16 specific HAT (Dou *et al*., 2005). Although MLL is expressed throughout hematopoiesis, the MLL target gene *HOXA9* is downregulated. One possibility may correspond to the fact that MLL could be continually associated with target genes, but the recruitment of coregulators such as MOZ, MOF (Dou *et al*., 2005), CBP (Ernst *et al*., 2001) or the SWI/SNF complex (Rozenblatt-Rosen *et al*., 1998) is inhibited. Alternatively, MLL could be regulated by modulating its binding. As reported by Milne *et al*. (2005), MLL is associated with actively transcribed target genes, but does not remain bound after transcriptional downregulation.

MLL and *MOZ* genes can be rearranged as a consequence of a chromosomal translocation in human acute leukemias (Krivtsov and Armstrong, 2007; Yang and Ullah, 2007). We mapped the MLL-binding domain also to the MYST domain of MOZ. This domain remains intact in fusion proteins from chromosome translocations in related leukemia (Yang and Ullah, 2007), suggesting that MLL may also interact with the leukemic fusion proteins. In addition, depletion of MOZ as well as depletion of MLL affect CD34+ cells commitment to myeloid progenitors, suggesting a role of each of these proteins in myelopoiesis and thus corroborating the observations made with *Moz* knockout mice (Katsumoto *et al*., 2006; Thomas *et al*., 2006; Perez-Campo *et al*., 2009). Additional studies will be needed to determine whether the cooperation between MOZ and MLL may explain the partially common leukemogenic pathway observed in *MOZ*- and *MLL*-rearranged leukemias (Camos *et al*., 2006). This pathway may possibly involve altered *Hox* genes expression and the associated deficiencies observed in hematopoietic stem cells from *Mll* or *Moz* knockout cells (Katsumoto *et al*., 2006; Terranova *et al*., 2006; Thomas *et al*., 2006; Jude *et al*., 2007; McMahon *et al*., 2007; Perez-Campo *et al*., 2009).

In conclusion, this study identifies an intimate association between two different histone-modifying enzymes. The interaction between MOZ and MLL facilitates the epigenetic modification and may lead to subsequent chromatin remodeling. It is tempting to hypothesize that these epigenetic modifications may act in order to dictate the myeloid commitment of human cord blood CD34+ cells through *HOX* gene regulation. MOZ and MLL may belong to some common protein complexes. In a leukemic context, owing to the fact that the other partner of fusion proteins involving MOZ or MLL are HATs that interact with many transcription factors, it is tempting to suggest that steric obstructions could occur, modifying the interactions between MOZ, MLL and WDR5.

Materials and methods

Reagents
The mouse *HoxA7* and the human *MIP-1a* luciferase reporter genes were provided by Robert Slany (University of Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany) and Paul Shore (University of Manchester, Manchester, UK), respectively. The HA-MOZ and the Myc-MOZ were provided by Issai Kitabayashi (NCCRI, Tokyo, Japan) and Edward Chan (Indiana University Cancer Center, Indianapolis, IN, USA), respectively, whereas FLAG-MOZ and FLAG-MOZ mutants were previously described (Ullah *et al*., 2008). The HA-MLL expression vector was a gift from Michael Cleary (Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA). Antibodies and peptides are described in Supplementary Methods section.

Cell culture
The human U-937 and K562 lines were maintained in 10% fetal calf serum (FCS) in RPMI 1640 Glutamax (Bio Whittaker, Santa Monica, CA, USA) with 1% penicillin, streptomycin and amphotericin B. The human HEK293T cells were maintained in 10% FCS (Bio Whittaker) in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with $4.5\,g\,l^{-1}$ glucose (Bio Whittaker).

Human cord blood CD34+ cells
CD34+ cells were prepared from human umbilical cord blood obtained ethically and with informed consent of donors with no history of hematological disorders, and supplied by the Etablissement Français du Sang (Bourgogne Franche-Comté, France). Culture of CD34+ cells is described in Supplementary Methods section.

Myeloid colony-forming assays
For myeloid culture, a total of 1×10^3 CD34+ cells or CD34+ siRNA-treated cells (48 h after transfection) were added to methyl-cellulose supplemented with other compounds (Supplementary Methods).

Reporter gene assays
Transfection of HEK293T cells was performed using the jetPEI (Polyplus transfection, Illkirch, France), according to the manufacturer's instructions. Transient transfection of U-937 cells was carried out using the SuperFect transfection reagent (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. After 48 h, luciferase activity was analyzed in cell lysates using the Luciferase Reporter and β-galactosidase Assays systems (Promega, Madison, WI, USA). Other details are described in Supplementary Methods section.

Immunofluorescence microscopy
Adherent HEK293T and cytospun K562 or CD34+ cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized in 0.1% Triton X-100 and saturated in 1 × phosphate-buffered saline, and in 4% bovine serum albumin. Then, immunofluorescence assays were performed as described in Supplementary Methods.

SDS–polyacrylamide gel electrophoresis, immunoprecipitation and western blotting
Immunoprecipitation, SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting were carried out as described in Supplementary Methods.

ChIP procedure
Briefly, 2×10^6 of HEK293T or CD34+ cells were fixed with 1% formaldehyde to crosslink DNA with proteins, then lysed and sonicated. ChIP procedure was carried out with modifica-

tions according to the manufacturer's instructions (Upstate Biotechnology, Temecula, CA, USA) and as described in Supplementary Methods.

siRNA knockdown
For siRNA-mediated gene knockdown, 10×10^6 CD34+ cells were transfected by nucleoporation according to the manufacturer's protocol (Amaxa, Köln, Germany) using siRNAs described in Supplementary Methods.

Real-time reverse transcriptase–PCR
Real-time reverse transcriptase–PCR is described in Supplementary Methods section.

Histone tail peptide-binding assays
HEK293T were transfected with the MOZ expression plasmid (Supplementary Methods). Cell extracts were prepared as indicated for immunoprecipitation assays. For direct *in vitro* histone tail peptide pull-down assays, *in vitro* translation of Myc-MOZ was carried out in rabbit reticulocyte lysates (T7 Quick coupled transcription/translation system, Promega, Madison, WI, USA). Histone tail peptide-binding assays were carried out as described in Supplementary Methods.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Amandine Bataille, Amandine Chlemaire and Franck Ménétrier for immunocytofluorescence assays; André Bouchot for epifluorescence microscopy; and Christine Arnould for confocal analysis (SERCOBIO, Université de Bourgogne), and the Etablissement Français du Sang (EFS) of Bourgogne Franche-Comté, which kindly supplied the cord blood buffy coats. We also thank Mustapha Oulad-Abdelghani for producing the anti-MOZ antibody. We thank Robert Slany, Issai Kitabayashi, Paul Shore, Michael Cleary and Edward Chan for providing plasmids. We appreciate the fine work performed by Magali Belt in correction of English text. This work was supported by funds from the Fondation de France (Leukemia Committee to LD), the Ligue contre le Cancer (Côte d'Or committee to LD), the Ligue contre le Cancer (Rhône committee to LD), the Conseil Régional de Bourgogne (FABER to LD), the Faculty of Medicine (to J-NB) in Dijon, the National Institute of Cancer (to ES), the Ligue Nationale contre le Cancer (Label to ES), the Agence Nationale de la Recherche of France (to ES and LD) and the Canadian Cancer Society (to XJY). JP was supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of France and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). AL was supported by fellowships from the Inserm and the Région Bourgogne. RA and AJ were supported by fellowships from the Ligue contre le Cancer, Saône-et-Loire committee and national committee, respectively. BL was supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of France.

References

Argiropoulos B, Humphries RK. (2007). Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* **26**: 6766–6776.
Ayton PM, Cleary ML. (2003). Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev* **17**: 2298–2307.
Borrow J, Shearman AM, Stanton Jr VP, Becher R, Collins T, Williams AJ *et al*. (1996a). The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat Genet* **12**: 159–167.
Borrow J, Stanton Jr VP, Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RS *et al*. (1996b). The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* **14**: 33–41.
Bristow CA, Shore P. (2003). Transcriptional regulation of the human MIP-1alpha promoter by RUNX1 and MOZ. *Nucleic Acids Res* **31**: 2735–2744.
Camos M, Esteve J, Jares P, Colomer D, Rozman M, Villamor N *et al*. (2006). Gene expression profiling of acute myeloid leukemia with translocation t(8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement reveals a distinctive signature with a specific pattern of HOX gene expression. *Cancer Res* **66**: 6947–6954.
Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Cote J. (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* **19**: 321–329.
Champagne N, Pelletier N, Yang XJ. (2001). The monocytic leukemia zinc finger protein MOZ is a histone acetyltransferase. *Oncogene* **20**: 404–409.
Chan EM, Chan RJ, Comer EM, Goulet III RJ, Crean CD, Brown ZD *et al*. (2007). MOZ and MOZ-CBP cooperate with NF-kappaB to activate transcription from NF-kappaB-dependent promoters. *Exp Hematol* **35**: 1782–1792.
Crooks GM, Fuller J, Petersen D, Izadi P, Malik P, Pattengale PK *et al*. (1999). Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. *Blood* **94**: 519–528.
Dion MF, Altschuler SJ, Wu LF, Rando OJ. (2005). Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 5501–5506.
Dou Y, Milne TA, Tackett AJ, Smith ER, Fukuda A, Wysocka J *et al*. (2005). Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* **121**: 873–885.
Eberharter A, Becker PB. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* **3**: 224–229.
Ernst P, Mabon M, Davidson AJ, Zon LI, Korsmeyer SJ. (2004). An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Curr Biol* **14**: 2063–2069.
Ernst P, Wang J, Huang M, Goodman RH, Korsmeyer SJ. (2001). MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein. *Mol Cell Biol* **21**: 2249–2258.
Esteyries S, Perot C, Adelaide J, Imbert M, Lagarde A, Pautas C *et al*. (2008). NCOA3, a new fusion partner for MOZ/MYST3 in M5 acute myeloid leukemia. *Leukemia* **22**: 663–665.
Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP *et al*. (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**: 531–537.
Guccione E, Bassi C, Casadio F, Martinato F, Cesaroni M, Schuchlautz H *et al*. (2007). Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* **449**: 933–937.
Hake SB, Xiao A, Allis CD. (2004). Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer* **90**: 761–769.
Hanson RD, Hess JL, Yu BD, Ernst P, van Lohuizen M, Berns A *et al*. (1999). Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14372–14377.

Hess JL. (2004). MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med* **10**: 500–507.
Hsieh JJ, Cheng EH, Korsmeyer SJ. (2003). Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* **115**: 293–303.
Huang G, Elf S, Yan X, Wang L, Liu Y, Sashida G *et al*. (2008). Previously unknown interactions between AML1 and MLL provide epigenetic regulation of gene expression in normal hematopoiesis and in leukemia. *Blood* **112**: 110.
Huang Y, Fang J, Bedford MT, Zhang Y, Xu RM. (2006). Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science* **312**: 748–751.
Jenuwein T, Allis CD. (2001). Translating the histone code. *Science* **293**: 1074–1080.
Jude CD, Climer L, Xu D, Artinger E, Fisher JK, Ernst P. (2007). Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell* **1**: 324–337.
Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T *et al*. (2006). MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev* **20**: 1321–1330.
Kindle KB, Troke PJ, Collins HM, Matsuda S, Bossi D, Bellodi C *et al*. (2005). MOZ-TIF2 inhibits transcription by nuclear receptors and p53 by impairment of CBP function. *Mol Cell Biol* **25**: 988–1002.
Kitabayashi I, Aikawa Y, Nguyen LA, Yokoyama A, Ohki M. (2001). Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein. *EMBO J* **20**: 7184–7196.
Knittel T, Kessel M, Kim MH, Gruss P. (1995). A conserved enhancer of the human and murine Hoxa-7 gene specifies the anterior boundary of expression during embryonal development. *Development* **121**: 1077–1088.
Kohlmann A, Schoch C, Dugas M, Schnittger S, Hiddemann W, Kern W *et al*. (2005). New insights into MLL gene rearranged acute leukemias using gene expression profiling: shared pathways, lineage commitment, and partner genes. *Leukemia* **19**: 953–964.
Kouzarides T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693–705.
Krivtsov AV, Armstrong SA. (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* **7**: 823–833.
McGinnis W, Krumlauf R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**: 283–302.
McMahon KA, Hiew SY, Hadjur S, Veiga-Fernandes H, Menzel U, Price AJ *et al*. (2007). Mll has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* **1**: 338–345.
Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD *et al*. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* **10**: 1107–1117.
Milne TA, Dou Y, Martin ME, Brock HW, Roeder RG, Hess JL. (2005). MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 14765–14770.
Nabirochkina E, Simonova OB, Mertsalov IB, Kulikova DA, Ladigina NG, Korochkin LI *et al*. (2002). Expression pattern of dd4, a sole member of the d4 family of transcription factors in drosophila melanogaster. *Mech Dev* **114**: 119–123.
Nakamura T, Largaespada DA, Shaughnessy Jr JD, Jenkins NA, Copeland NG. (1996). Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nat Genet* **12**: 149–153.
Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R *et al*. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* **10**: 1119–1128.
Ohta K, Ohigashi M, Naganawa A, Ikeda H, Sakai M, Nishikawa J *et al*. (2007). Histone acetyltransferase MOZ acts as a co-activator of Nrf2-MafK and induces tumour marker gene expression during hepatocarcinogenesis. *Biochem J* **402**: 559–566.
Ohta K, Osada S, Nishikawa JI, Nishihara T. (2005). *J Health Science* **51**: 253–256.
Pelletier N, Champagne N, Stifani S, Yang XJ. (2002). MOZ and MORF histone acetyltransferases interact with the Runt-domain transcription factor Runx2. *Oncogene* **21**: 2729–2740.
Perez-Campo FM, Borrow J, Kouskoff V, Lacaud G. (2009). The histone acetyl transferase activity of monocytic leukemia zinc finger is critical for the proliferation of hematopoietic precursors. *Blood* **113**: 4866–4874.
Rokudai S, Aikawa Y, Tagata Y, Tsuchida N, Taya Y, Kitabayashi I. (2009). Monocytic leukemia zinc finger (MOZ) interacts with p53 to induce p21 expression and cell-cycle arrest. *J Biol Chem* **284**: 237–244.
Rozenblatt-Rosen O, Rozovskaia T, Burakov D, Sedkov Y, Tillib S, Blechman J *et al*. (1998). The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4152–4157.
Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J. (2007). Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* **25**: 15–30.
Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC *et al*. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**: 407–411.
Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS *et al*. (1994). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12223–12227.
Shen WF, Largman C, Lowney P, Corral JC, Detmer K, Hauser CA *et al*. (1989). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8536–8540.
Sims III RJ, Chen CF, Santos-Rosa H, Kouzarides T, Patel SS, Reinberg D. (2005). Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J Biol Chem* **280**: 41789–41792.
Terranova R, Agherbi H, Boned A, Meresse S, Djabali M. (2006). Histone and DNA methylation defects at Hox genes in mice expressing a SET domain-truncated form of Mll. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 6629–6634.
Thomas T, Corcoran LM, Gugasyan R, Dixon MP, Brodnicki T, Nutt SL *et al*. (2006). Monocytic leukemia zinc finger protein is essential for the development of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Genes Dev* **20**: 1175–1186.
Tyagi S, Chabes AL, Wysocka J, Herr W. (2007). E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol Cell* **27**: 107–119.
Ullah M, Pelletier N, Xiao L, Zhao SP, Wang K, Degerny C *et al*. (2008). Molecular architecture of quartet MOZ/MORF histone acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol* **28**: 6828–6843.
van Oostveen J, Bijl J, Raaphorst F, Walboomers J, Meijer C. (1999). The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leukemia* **13**: 1675–1690.
Voss AK, Collin C, Dixon MP, Thomas T. (2009). Moz and retinoic acid coordinately regulate H3K9 acetylation, Hox gene expression, and segment identity. *Dev Cell* **17**: 674–686.
Wysocka J, Swigut T, Milne TA, Dou Y, Zhang X, Burlingame AL *et al*. (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* **121**: 859–872.
Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J *et al*. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* **442**: 86–90.
Yang XJ. (2004). The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res* **32**: 959–976.
Yang XJ, Ullah M. (2007). MOZ and MORF, two large MYSTic HATs in normal and cancer stem cells. *Oncogene* **26**: 5408–5419.
Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GA, Korsmeyer SJ. (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* **378**: 505–508.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (http://www.nature.com/onc)

Supplementary Information

A) Supplementary Figure Legends

Supplemental Figure 1 (**a**) MOZ interacts with MLL-N *in vivo*. Co-immunoprecipitation of MLL-N with MOZ from HEK293T cell extracts. Whole-cell extracts were used for immunoprecipitation with an anti-MOZ antibody, then immunoprobed with an anti-MLL-N antibody. Input: unprecipitated extracts; ctrl: control IP. (**b**) Schematic representation of MOZ and the deletion mutants. Domains are labeled as follows: NEMM, N-terminal part of Enok, MOZ, or MORF; PHD, PHD zinc finger; ED, glutamate/aspartate-rich region; SM, serine/methionine-rich region; and P, proline/glutamine stretch. The chromosomal translocations involving MOZ with other HATs are also indicated (arrows).

Supplemental Figure 2 Input samples corresponding to eluted DNA before immunoprecipitation were amplified with *HOXA5*, *HOXA7*, or *HOXA9* promoter specific primers. Serial dilutions of the chromatin from HEK293T or CD34+ cells were used to demonstrate linearity of the PCR reaction.

Supplemental Figure 3 Analysis of MLL and MOZ knockdown in CD34+ cells. (**a**) Left panel: MLL siRNA treatment decreased the MLL mRNA level. CD34+ cells were transfected with 500 pmol of Luc siRNA, MLL siRNA or MOZ siRNA. Total RNA obtained from CD34+ cells was analyzed for MLL mRNA by real time RT-PCR with MLL-specific primers. Data were normalized to the endogenous *Hprt* mRNA control. Data: Mean +/- SD of triplicates. Four independent experiments were performed. Right panel: MLL siRNA treatment reduced the MLL protein level. Extracts were prepared from cell treated as in right

panel for SDS-PAGE and immunoblotting with anti-MLL-C antibody (top). Ponceau R staining was also performed (bottom). (**b**) Left panel: MOZ siRNA treatment decreased the MOZ mRNA level. CD34+ cells were treated and total RNA was isolated as in (**a**) to determine the MOZ mRNA level by real time RT-PCR with MOZ-specific primers. Data were normalized to the endogenous *Hprt* mRNA control. Data: Mean +/- SD of triplicates. Four independent experiments were performed. Right panel: MOZ siRNA treatment reduced the MOZ protein level. Cell extracts were prepared and used for immunoblotting as in (**a**) except that an anti-MOZ antibody was used (top). Ponceau R staining was also performed (bottom).

Supplemental Figure 4 (**a**) The recruitment of MOZ is altered in absence of MLL and *vice versa*. Purified CD34+ cells were transfected once with 500 pmol of Luc siRNA, MOZ siRNA or MLL siRNA. Then, a ChIP analysis examining the recruitment of MOZ or MLL on *HOXA5*, *HOXA7*, and *HOXA9* promoters in CD34+ cells was carried out 24h later. Lanes were loaded with products of PCR amplification using template prepared from either 1% sheared chromatin (Input control) (lane 1) or immunoprecipitated chromatin using IgG (lane 2) or specific antibodies directed against MOZ (lane 3) or MLL (lane 4). (**b**) PCR analysis on *GAPDH* promoter after ChIP experiments in siRNA transfected CD34+ cells. Lanes were loaded with products of PCR amplification using template prepared from either 1% sheared chromatin (Input control) or immunoprecipitated chromatin using IgG (Ctrl), specific antibodies directed against MOZ, MLL, di-methylated H3K4, tri-methylated H3K4, acetylated histone H3, or acetylated histone H4K16.

B) Supplementary methods

Reagents

For ChIP and IP, a mouse monoclonal antibody against residues 856-870 of MOZ was produced by Mustapha Oulad-Abdelghani (IGBMC, Illkirch, France). The anti-MOZ (N19) antibody used in immunofluorescence assays was purchased from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). The anti-MOZ antibody for Western blotting was provided by Abcam (Cambridge, UK). The c-Myc (9E10) antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA), the anti-FLAG M2 antibody from SIGMA (Saint-Louis, MO, USA), and the anti-HA (3F10) antibody from Roche Applied Science (Mannheim, Germany). Antibodies directed against MLL-C, WDR5, acetyl-histone H3K9K14, acetyl-histone H4K16, dimethylated histone H3K4, and trimethylated histone H3K4 were provided by Upstate biotechnology (Lake Placid, NY, USA). The anti-MLL-N antibody (N4.4) for Western blotting was provided by Millipore. For FLAG immunoprecipitation assays, anti-FLAG M2 antibodies coupled to agarose beads were used (EZview Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel, SIGMA). For control in IP and ChIP, IgG were provided by Santa Cruz. Biotinylated histone H3 peptides (residues 1-21) (trimethylated on K4 or not) were purchased from Upstate Biotechnology.

Human cord blood CD34+ cells

Cells were layered over Ficoll-Paque (1.77 g/L) (Eurobio, Les Ulis, France), and the interface containing mononuclear cells was harvested after centrifugation. Then, the cells were washed, and CD34+ cells were purified using the CD34+ cells magnetic isolation kit and AutoMACS™ separator according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany). The isolated cells were cultured during seven days in

StemSpan™ H3000, supplemented with 100 ng/mL rhFlt-3 ligand, 100 ng/mL rhSCF, 20 ng/mL rhIL-3 and 20 ng/mL rhIL-6 (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) before RT-PCR assays, ChIP experiments or colony-forming assays.

Myeloid colony-forming assays

For myeloid culture, a total of 1×10^3 CD34+ cells or CD34+ siRNA-treated cells (48h after transfection) were added to 1 ml of methyl-cellulose (1%) (MethoCult M3434; StemCell Technologies) in IMDM with 30% fetal calf serum (Bio Whittaker), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 1% BSA, MTG (100 µM), hSCF (50 ng/ml), hGM-CSF (10 ng/ml) (StemCell Technologies) and hIL-3 (10 ng/ml) (StemCell Technologies). The culture plates were incubated at 37°C and in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air.

Real time RT-PCR

RNA was extracted from CD34+ cells using NucleoSpin®RNAII (Macherey-Nagel). cDNAs from total RNA were synthesized using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Real time PCR was performed in triplicates using TaqMan probes from Applied Biosystems (Foster City, CA) and analyzed in an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System. Values for each PCR were normalized with *Hprt* or *β2-microglobulin*. The TaqMan® assays were the following: Hs00430330_m1 (*Hoxa5*), Hs00600844_m1 (*Hoxa7*), Hs00365956_m1 (*Hoxa9*), Hs00198899_m1 (*Moz*), Hs00610538_m1(*Mll*).

SDS-PAGE, Immunoprecipitation and Western blotting

HEK293T (transiently transfected as indicated above or not), K562, CD34+ cells were harvested, washed with PBS, and *Dounce*-homogenized (10 strokes with a type B pestle) in a cold immunoprecipitation-lysis buffer (1% NP40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH8,

protease inhibitor cocktail). Samples were incubated on ice for 30 min. After centrifugation, 1 mg of total proteins was then precleared with protein G agarose beads (Upstate). MOZ, MLL-C or Myc-specific antibodies (or IgG as a control), associated with protein G agarose beads, were used for immunoprecipitating proteins with gentle shaking at 4°C overnight. As control, each extract was also immunoprecipitated with irrelevant IgG. For FLAG immunoprecipitations, protein extracts were immunoprecipitated with anti-FLAG M2 affinity gel. Immunoprecipitation complexes were washed five times in ice-cold immunoprecipitation-lysis buffer. Proteins were eluted by boiling in Laemmli buffer. Eluated proteins were then separated by SDS-PAGE and electroblotted to nitrocellulose membranes. Equivalent loading between lanes was confirmed by Ponceau R staining. Membranes were blocked in 1x PBS-T (0.1%) and fat-free dry milk or BSA (5%) (blocking buffer) during one hour at room temperature. Membranes were incubated with the primary antibodies diluted in the blocking buffer at 4°C overnight. Membranes were washed three times in 1x PBS-T (0.1%) during 10 min each. Secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase were added, and the membranes were incubated at room temperature during one hour. Membranes were washed three times in 1x PBS-T (0.1%) during 10 min each. ECL Western blotting reagent kit (Millipore, Billerica, MA, USA) was used for protein detection.

Immunofluorescence microscopy

Cells were incubated 1h at RT with the anti-MOZ (dilution 1:100), anti-MLL-C (dilution 1:100), anti-WDR5 (dilution 1:100) or no antibody as a control. Then, cells were incubated during 1 h with antibodies specific for mouse or goat immunoglobulin subclasses conjugated to fluorochromes (anti-goat-Alexa 488 or anti-mouse-Alexa 568) (dilution 1:1000). Nuclei were counterstained with DAPI. For cytospun cells, images were captured with a Cell Observer Station (Zeiss) with a 63x oil objective, then deconvulated with the deconvolution

module of the Axiovision software. Adherent cells were analyzed using a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP2). Images were processed with Adobe Photoshop (adjustment of brightness and contrast).

Reporter gene assays

All transfections contained 1 μg of reporter plasmid (p*HoxA7*-luciferase or p*MIP1α*-luciferase), as well as 100 ng of TK-β-galactosidase plasmid as an internal control to normalize transfection efficiency and MOZ or MLL expression vectors.

ChIP procedure and ChIP primers

After pre-clearing with salmon sperm DNA/protein A/G agarose beads, the samples underwent immunoprecipitation with antibodies specific for MOZ, MLL-C, di-, tri-methylated H3 K4, acetyl H3 K9 K14, acetyl-histone H4 K16, or IgG (Control ChIP) at 4°C overnight. Beads were washed, protein/DNA complexes eluted, then cross-links reversed by heating at 65°C overnight. After RNA and protein digestions, DNA was purified on a spin column (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Input corresponds to total sonicated DNA. DNA was amplified by PCR. PCR amplification was performed using *Taq* polymerase (Promega) and ChIP primers.

The ChIP primers used to amplify regions of the promoter locus of *HOXA5* were (5′-CTCCACCCAACTCCCCTATT-3' and 5′-CGGTCGTTTGTGCGTCTAT-3'), *HOXA7* were (5′-CAGGGCTCACTAGCAGGAGT-3’ and 5′-GGCAAGAGGCTCAAATATGC-3’), and *HOXA9* were (5′-GGGGAGACGGGAGAGTACAG-3’ and 5′-CGTCCAGCAGAACAATAACG-3’) (Invitrogen), and the negative region (*NEG*: region located between the *GAPDH* gene and the *CNAP1* gene) were (5′-ATGGTTGCCACTGGGGATCT-3’ and 5′-TGCCAAAGCCTAGGGGAAGA-3’) (Active

Motif, Rixensart, Belgium). The ChIP primers used to amplify a region of the promoter locus of *GAPDH* were provided by EZ ChIP (Upstate biotechnology).

Real-time qPCR analysis was analyzed in an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System. For real-time qPCR analysis, the ChIP primers used to amplify regions of the promoter locus of *HOXA5* were (5′-CTCCACCCAACTCCCCTATT-3' and 5′-CGGTCGTTTGTGCGTCTAT-3'), *HOXA7* were (5′-CCTGTGAGGACTGCTGAGATTG-3’ and 5′-CCCCCAGATTTACACCAAACC-3’), and *HOXA9* were (5′-GGGGAGACGGGAGAGTACAG-3’ and 5′-CGTCCAGCAGAACAATAACG-3’) (Invitrogen).

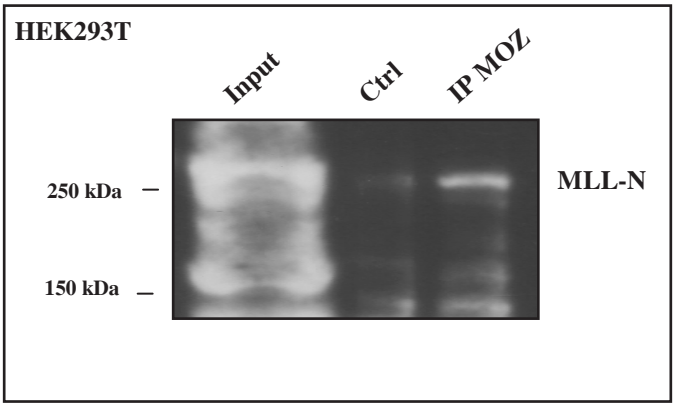
siRNA knockdown

siRNAs, synthesized by Invitrogen, target human MLL (Sense: 5’-*AGUGGUUCCUGAGAA UGGAUUUGAA*-3’) and MOZ (Sense: 5’-*UUAAUCUGCACUUCAGAGCCUCAGG*-3’). A luciferase siRNA was used as a negative control (Sense: 5’-*CUUACGCUGAGUACUUCG Att*-3’).

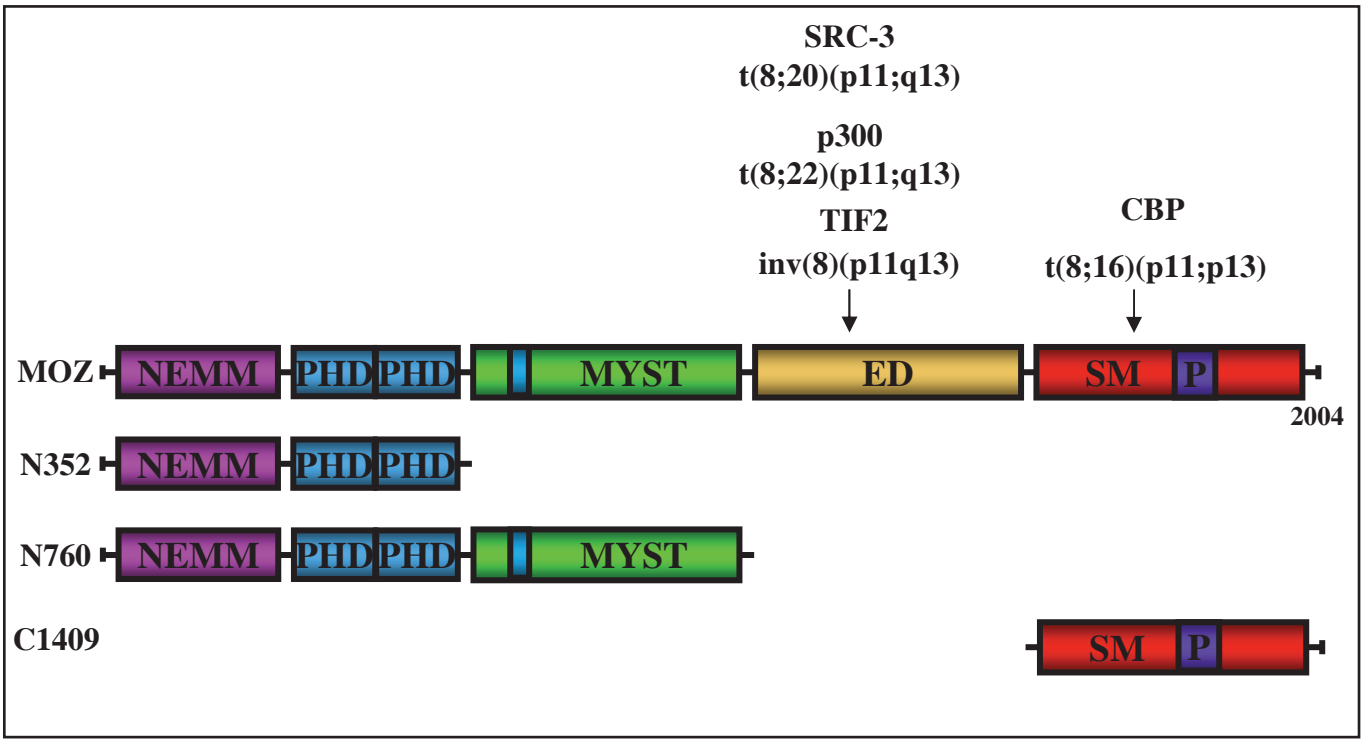
Histone tail peptide-binding assays

Cell extracts or *in vitro* translated products were then precleared with neutravidin-coated agarose beads (Pierce, Rockford, IL, USA). Biotinylated histone H3 tail peptides (trimethylated on K4 or not) were incubated overnight either with the cell extracts or the *in vitro* translated product, at 4°C. Then, the biotinylated histone H3 tail peptides were collected by incubation with neutravidin-coated agarose beads. The beads were washed ten times in the IP lysis buffer. Bound proteins were eluted by boiling in the SDS loading buffer, separated by SDS-PAGE, and analyzed by immunoblotting with anti-Myc or anti-WDR5 antibodies.

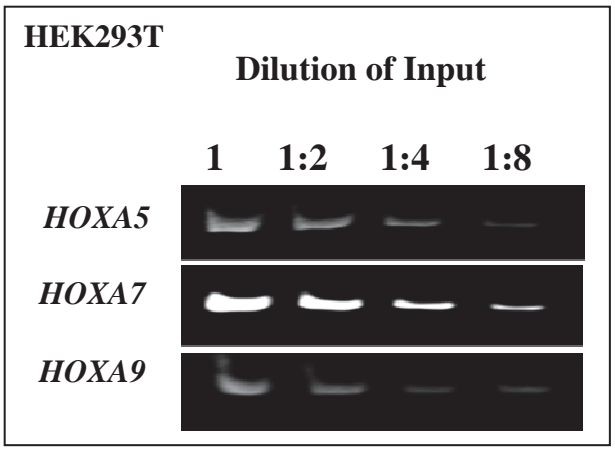
Supplemental Figure 1

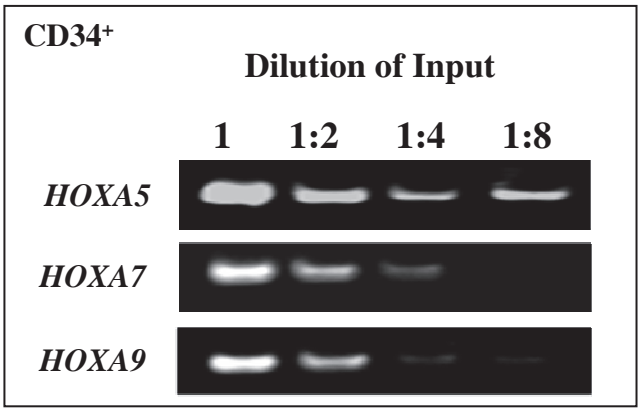


b

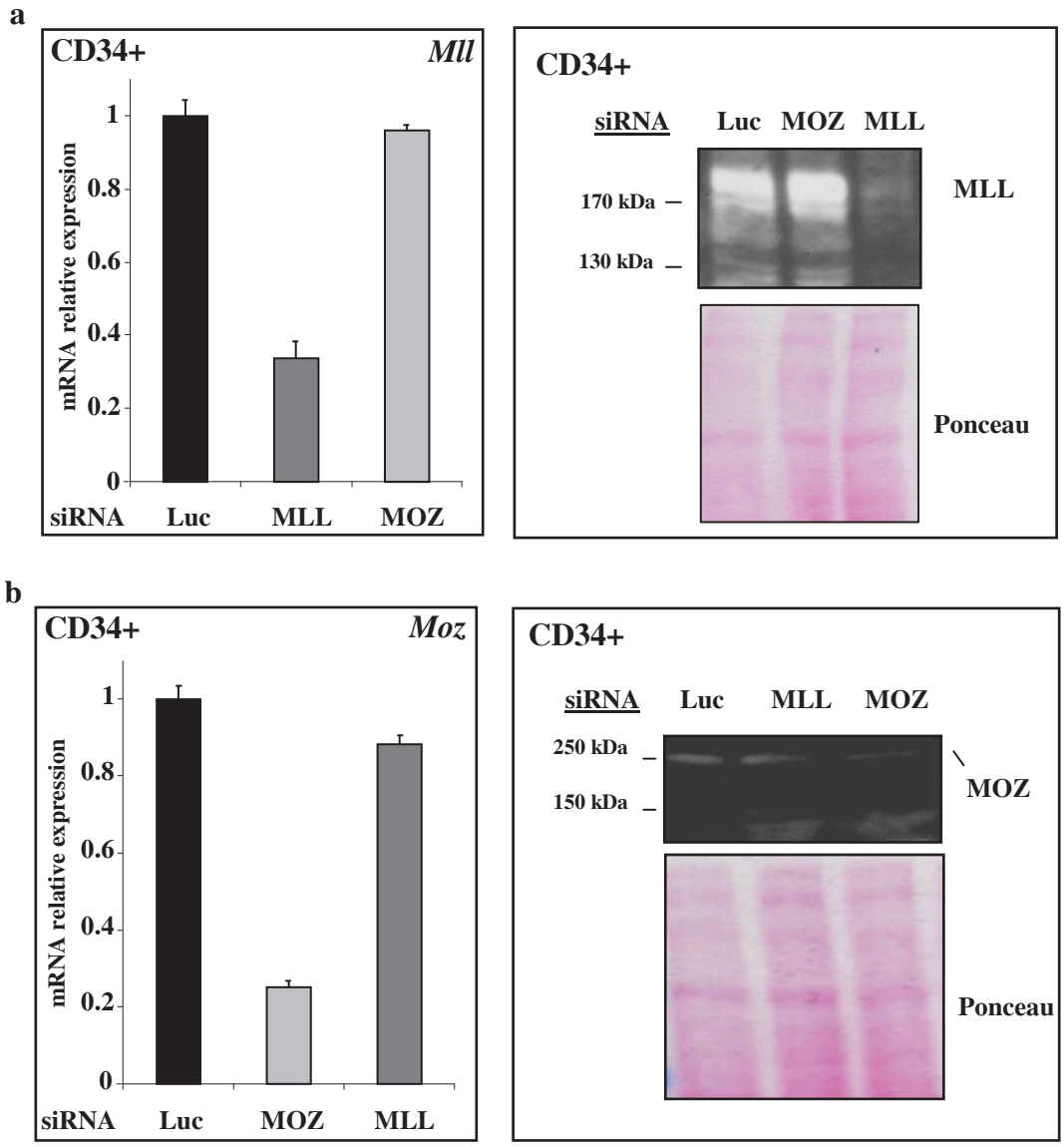


Supplemental Figure 2



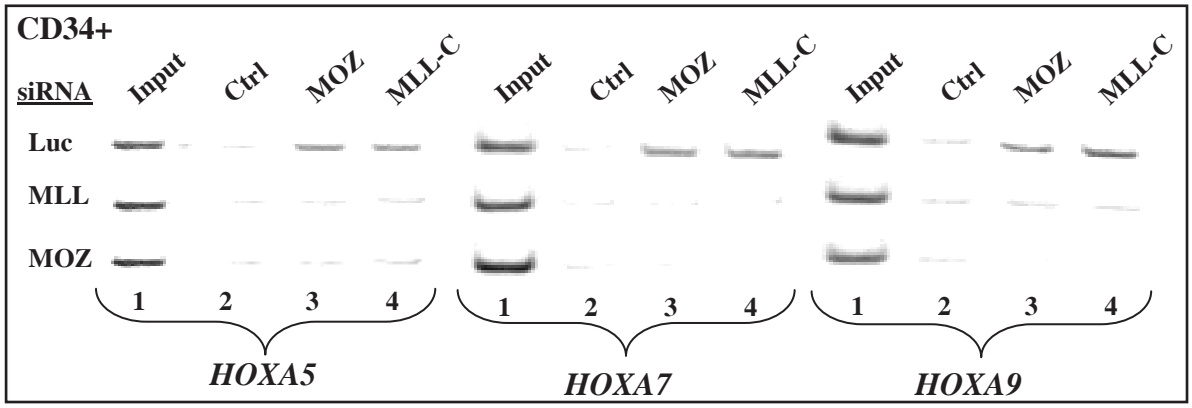


Supplemental Figure 3

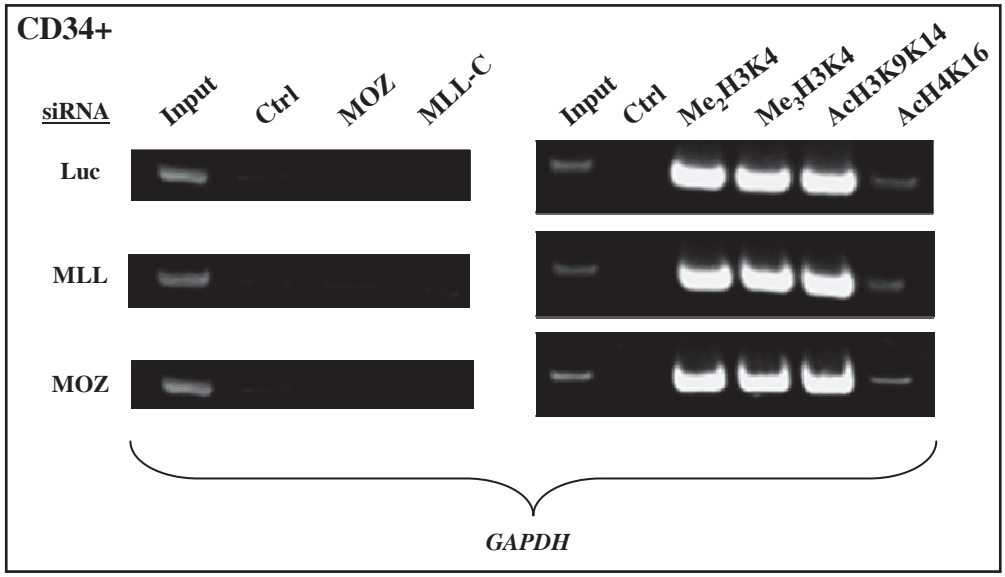


Supplemental Figure 4

a



b



B. La Symplekin, un membre de la machinerie de polyadénylation interagit avec MOZ et MLL, bloquant ainsi leur activité au niveau du promoteur du gène *HOXA9* dans les cellules hématopoïétiques humaines

Article

Symplekin, a polyadenylation factor, prevents MOZ and MLL activity on HOXA9 in hematopoietic cells

Largeot A, Paggetti J, Broséus J, Aucagne R, Lagrange B, Martin RZ, Quéré R, Berthelet J, Lucchi G, Ducoroy P, Bastie JN, Delva L

BBActa Mol. Cell Res., En attente d'une seconde soumission après révision

Introduction sur la Symplekin

Dans ces travaux, nous avons identifié la Symplekin comme un nouveau partenaire de MOZ et de MLL. C'est pourquoi le chapitre suivant introduit la Symplekin, membre du complexe de polyadénylation des ARN.

1. Généralités

La Symplekin a été identifiée au niveau des jonctions serrées, mais il avait été montré une localisation nucléaire selon le type cellulaire (Keon *et al.,* 1996). Les auteurs de ces travaux décidèrent de nommer cette protéine Symplekin, ce nom correspondant à la conjonction des mots grecs : συμπλξκειν (*sigma upsilon mu pi lambda epsilon kappa epsilon iota nu*) ce qui signifie « nouer, tisser, entremêler ». Le gène *Symplekin*, localisé sur le bras

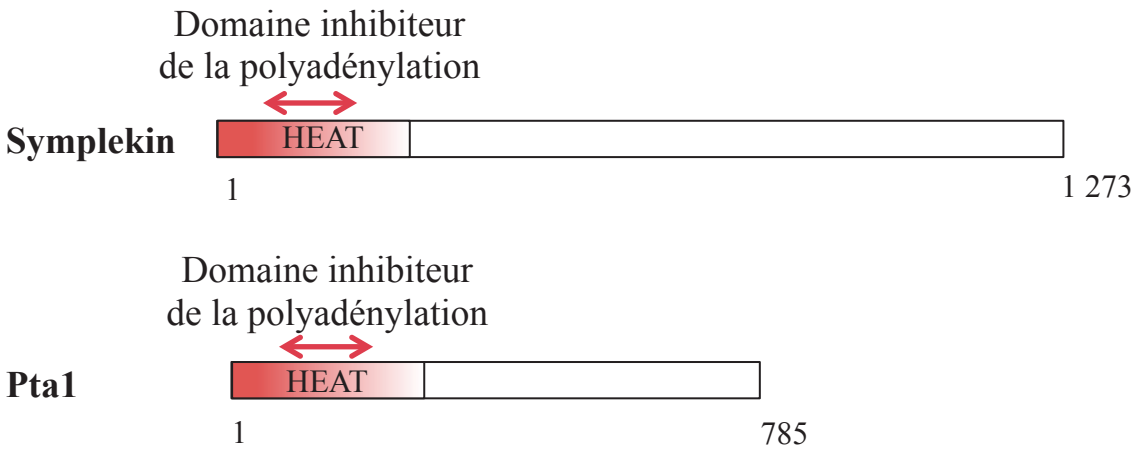


Figure 34 : Représentation schématique des protéines Symplekin et Pta1.

Un seul domaine fonctionnel de la Symplekin a été identifié jusqu'ici. Il s'agit du domaine HEAT, responsable d'interactions protéiques.

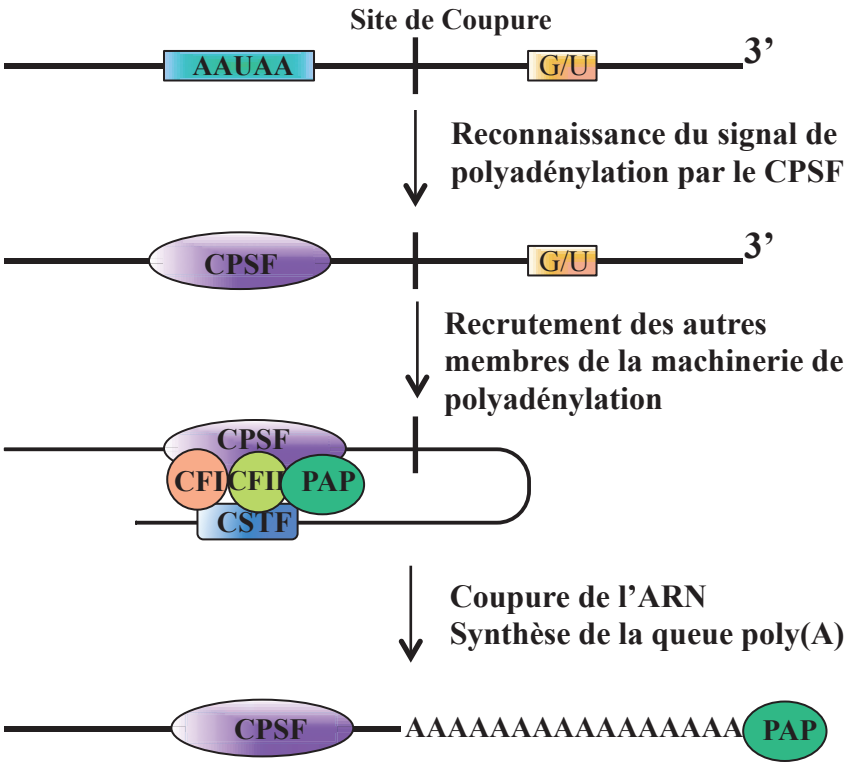


Figure 35 : Principales étapes de la polyadénylation chez les Mammifères.

La polyadénylation consiste en l'addition de plusieurs résidus adénosine au niveau de l'extrémité 3' de l'ARN. Le complexe CPSF se lie sur la séquence consensus de polyadénylation AAUAA. Il aide au recrutement des complexes CSTF au niveau de la séquence riche en G/U et des complexes CFI_m et II_m. La poly(A)-polymérase (PAP) se fixe à l'ensemble. L'extrémité 3' de l'ARN est alors coupée, puis la PAP synthétise la queue poly (A).

(D'après Chen et Krug, 2000)

long du chromosome 19 en position 13, est composé de 6 exons. L'ARNm de la *Symplekin*, constitué de 4 200 pb dont 3 700 pb codantes, génère une protéine de 1 132 acides aminés (AA) de masse moléculaire proche de 126 kDa. Chez la Drosophile, la structure de l'extrémité N-terminale a été déterminée par cristallographie et un domaine HEAT (*Huntingtin, EF3, A subunit of PP2A, TOR1*) a été identifié. Des analyses *in silico* prédisent la présence de ce domaine d'interaction protéique dans les homologues des autres espèces (Kennedy *et al.,* 2009) (Figure 34).

En 2000, Yoshio Takagaki et James Manley ont montré que la Symplekin faisait partie du complexe de polyadénylation (Takagaki et Manley 2000).

La polyadénylation, une des étapes de la maturation des ARN, consiste en l'addition de plusieurs résidus adénosine sur une longueur d'environ 250 pb au niveau de l'extrémité 3' de l'ARN. Il s'agit d'un processus qui se déroule en plusieurs étapes (Figure 35). Le complexe CPSF (*Cleavage and polyadenylation specificity factor*) se lie sur la séquence consensus de polyadénylation AAUAA. Il aide au recrutement des complexes CSTF (*Cleavage stimulating factor*) au niveau de la séquence riche en G/U, et des complexes CFI_m et II_m (*Mammalian Cleavage factor I et II*). La poly(A)-polymérase (PAP) se fixe à l'ensemble. L'extrémité 3' de l'ARN est alors clivée, 15 à 30 nucléotides situés en amont du signal de polyadénylation. Puis la PAP synthétise la queue poly(A). Les protéines PABP (*poly(A) binding proteins*) sont également nécessaires à l'ajout de la queue poly(A). Une fois l'ARN clivé, les complexes CSTF, CFI_m et $CFII_m$ sont relargués (Chen et Krug 2000).

La queue poly(A) est fixée par les protéines PABP qui vont alors avoir différentes fonctions. La première consiste en l'export de l'ARN *via* des interactions avec des nucléoporines. La deuxième réside sur la formation d'une boucle avec la coiffe de l'ARN qui se situe sur l'extrémité 3'. Cette étape est nécessaire à la traduction. Et troisièmement, la fixation des PABP empêche l'action des nucléases qui pourraient dégrader l'ARN. Lorsqu'un ARN est dégradé, la première étape observée correspond à un raccourcissement de la queue poly(A) (Kuhn et Wahle 2004).

Les mécanismes de polyadénylation observés chez la Levure et les Mammifères sont similaires. L'homologue de la Symplekin chez la Levure est Pta1 (*pre-tRNA accumulation 1*). Les deux protéines partagent environ 31% de similarité, et Pta1 représente environ 50% de la

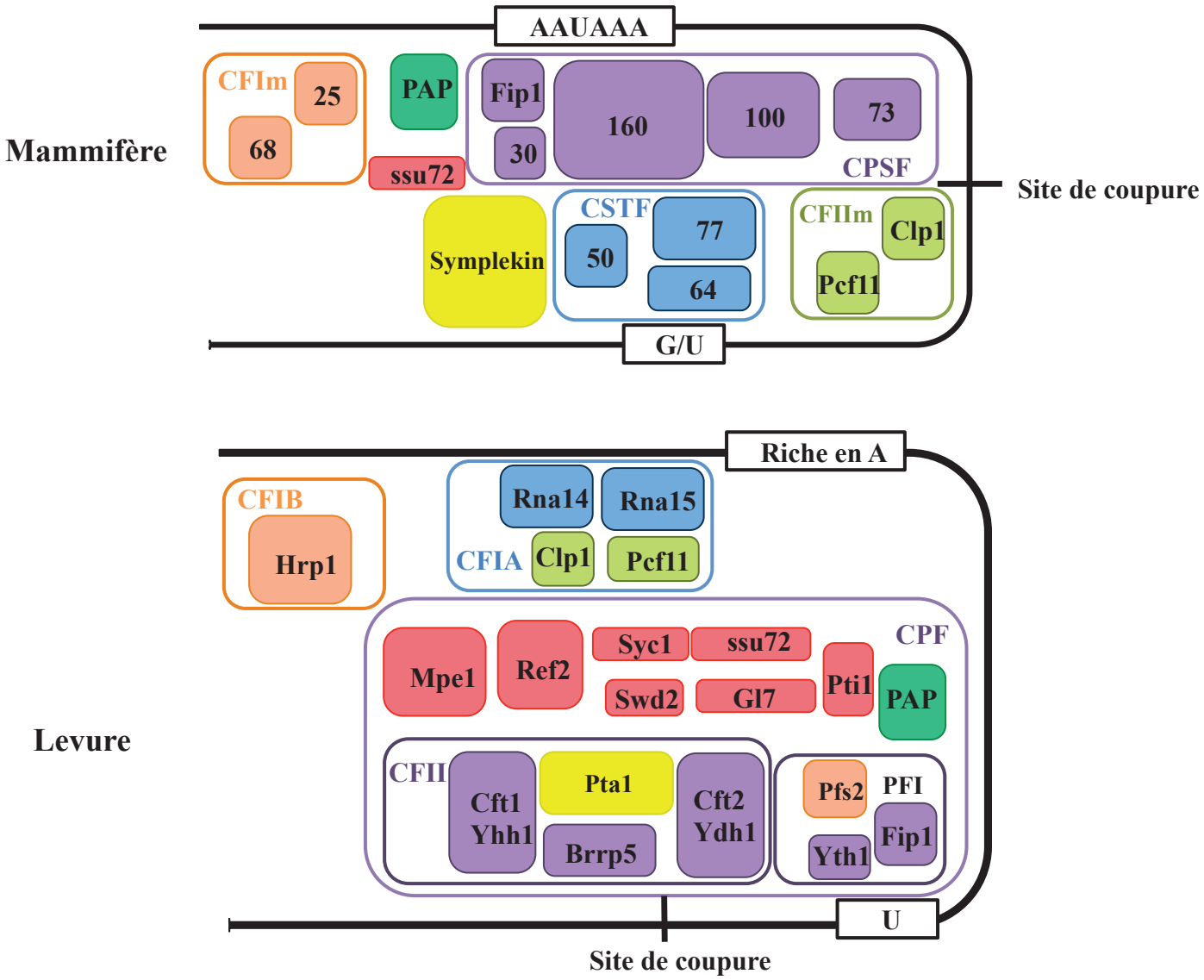


Figure 36 : Membres des complexes de polyadénylation chez le Mammifère et la Levure.

(D'après Mendel et Tong, 2008)

Symplekin en longueur (Figure 36).

2. Rôle de Pta1 dans la polyadénylation des ARN chez la Levure

Chez la Levure, la polyadénylation nécessite les complexes **CPF** (*cleavage and polyadenylation factor*) lui même composé de CFII (homologue de CPSF) et de PFI (*polyadenylation factor I*), **CFIA** (homologue de CSTF et CFIIm) et **CFIB**. De nombreuses similarités sont retrouvées entre les complexes chez les Mammifères et la Levure (Figure 37) (Mandel *et al.,* 2008).

La recherche de nouveaux membres de la machinerie de polyadénylation a mis en évidence l'appartenance de Pta1 au complexe PFI (Preker *et al.,* 1997). Pta1 avait été identifiée lors d'une étude de mutants de Levure défectueux au niveau de la maturation des ARN de transfert (O'Connor et Peebles 1992). Pta1 est également retrouvée dans le CFII, et elle interagit avec PAP. Elle s'avère nécessaire à la fois au clivage et à l'ajout de la queue poly(A). En sus, Elle semble porter l'assemblage des différents complexes de la machinerie de polyadénylation (Zhao *et al.,* 1999). Au sein de ces complexes, Pta1 est régulée de manière post-traductionnelle. Sa phosphorylation inhibe la polyadénylation. La phosphatase glc7 est nécessaire à sa déphosphorylation (He et Moore 2005).

Le domaine N-terminal de Pta1 inhibe la polyadénylation en abrogeant l'activité de la PAP. L'interaction entre Pta1 et ssu72, une phosphatase de l'ARN polymérase II, masque ce domaine et permet à Pta1 d'être un membre actif de la polyadénylation, sans inhiber PAP (Ghazy *et al.,* 2009; Ezeokonkwo *et al.,* 2012).

3. Rôle de la Symplekin dans la polyadénylation chez les Mammifères

La recherche de nouveaux partenaires de la sous-unité CSTF-64 du complexe CSTF a conduit à l'identification de la Symplekin. Les auteurs de ces travaux mirent alors en évidence l'homologie entre la Symplekin et Pta1, qui était déjà connue comme faisant partie de la machinerie de polyadénylation chez la Levure (Takagaki et Manley 2000). La Symplekin est aussi retrouvée dans d'autres complexes de polyadénylation. En effet, dans les ovocytes de Xénope, des complexes de **polyadénylation cytoplasmique** existent. Ils permettent la régulation de la taille de la queue poly(A) des ARN maternels, afin de contrôler le taux de

protéines traduites à partir de ces ARN. La Symplekin est un des composants de ce complexe (Barnard *et al.,* 2004). De surcroît, elle est retrouvée dans la machinerie de **maturation de l'extrémité 3' des ARN des histones**. Cette maturation fait intervenir des membres des complexes de polyadénylation, mais se réduit au clivage de l'extrémité 3', sans qu'il y ait un ajout d'une queue poly(A) (Kolev et Steitz 2005). Le fait que la Symplekin soit retrouvée dans différents complexes analogues lui a valu d'être décrite comme une protéine d'« échafaudage » (*scaffold*), ce qui laissait supposer un rôle limité à la formation des complexes.

Des études *in vitro* effectuées avec les protéines humaines Symplekin, SSU72 et le CTD de l'ARN polymérase II, indiquent que comme dans la Levure, le domaine N-terminal de la Symplekin inhibe la polyadénylation. Ce domaine est masqué par l'interaction avec SSU72. En outre, SSU72 est primordiale pour la polyadénylation lorsqu'elle est couplée à la transcription (Xiang *et al.,* 2010).

La Symplekin est aussi une cible de la sumoylation qui est essentielle à la formation du complexe de polyadénylation nucléaire (Vethantham *et al.,* 2007).

4. Coordination entre transcription et polyadénylation

La transcription des ARN messagers est réalisée par l'ARN polymérase II. Les différents facteurs de transcription généraux TFIID, B, E et H la recrutent sur des sites d'initiation de la transcription. Le complexe de pré-initiation de la transcription ou PIC (*Pre-initiation complex*) est alors formé. Il est nécessaire que le CTD de l'ARN polymérase II ne soit pas phosphorylé. Au moment de l'initiation de la transcription, le CTD est phosphorylé sur les lysines placées en cinquième position (lysines 5) au niveau de séquences répétées situées dans ce domaine. Pour que l'élongation se poursuive, les lysines 2 sont à leur tour phosphorylées. Lorsque se déroule la terminaison de la transcription, le CTD est déphosphorylé, ce qui permet le recrutement de l'ARN polymérase II sur de nouveaux sites d'initiation, et le cycle de la transcription peut recommencer (Sims *et al.,* 2004).

Le lien entre la transcription et la polyadénylation a été découvert à travers l'étude des conséquences de mutations dans le signal de poly(A), qui s'avèrent délétères non seulement pour la polyadénylation, mais également pour la transcription (Proudfoot *et al.,* 2002). **La maturation des ARN se fait de manière concomitante à leur synthèse**. En effet, le CTD de

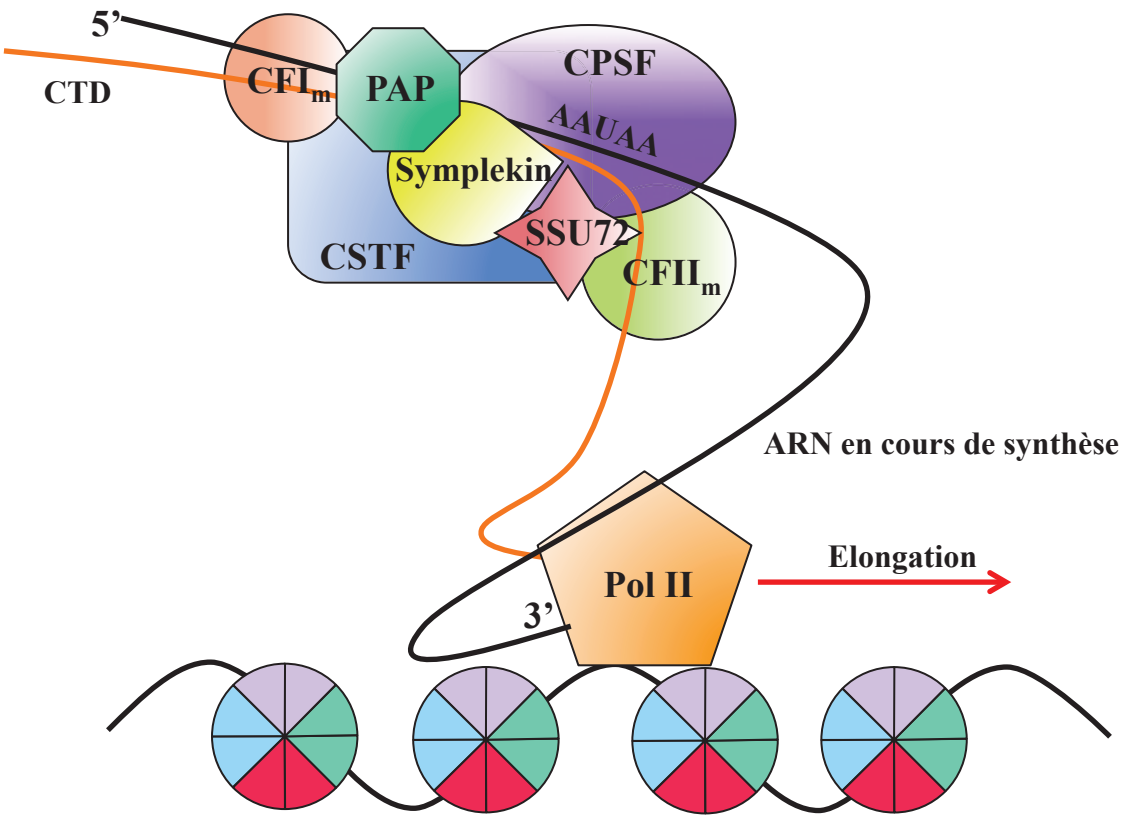


Figure 37 : Coordination entre la transcription et la polyadénylation.

Le CTD de l'ARN polymérase II interagit avec différents membres de la machinerie de polyadénylation et est essentielle à cette étape.

(D'après Mendel et Tong, 2008)

l'ARN polymérase II recrute les différents complexes de maturation des ARN au niveau des sites d'initiation de la transcription (Figure 37). Ceci a été démontré pour différents membres de la machinerie de poly(A), comme CPSF (Dantonel *et al.,* 1997) ou Pta1 (Rodriguez *et al.,* 2000). De manière surprenante, il a été observé que l'ARN polymérase II est elle-même nécessaire aux différentes étapes de la polyadénylation, même lorsque celle-ci est testée par des méthodes *in vitro*, indépendamment de la transcription. Ainsi, l'ARN polymérase II serait un membre à part entière de la machinerie de polyadénylation (Hirose et Manley 1998; Ryan *et al.,* 2002).

Ssu72 est une phosphatase du CTD de l'ARN polymérase II, cruciale pour la déphosphorylation du CTD lors de la terminaison de la transcription (Krishnamurthy *et al.,* 2004). Il s'agit d'un membre actif de la machinerie de polyadénylation, mais apparemment son activité de phosphatase n'est pas requise dans ce cadre. Pta1 interagit avec ssu72 (He *et al.,* 2003). Au moment de la transcription, une boucle d'ADN est formée au niveau du gène transcrit. Ce phénomène appelé « *gene looping* » permet de relier les régions d'initiation et de terminaison de la transcription, facilitant ainsi la réincorporation rapide de l'ARN polymérase II sur le site d'initiation dès la fin de la terminaison. Ssu72 et Pta1 sont toutes deux indispensables à la formation de cette boucle (Ansari et Hampsey 2005).

La Symplekin est capable d'interagir avec des facteurs de transcription dont HSF1 (*Heat shock factor 1*). HSF1 active la transcription de gènes codant pour les HSP (*Heat shock proteins*). Lors d'un stress cellulaire, la Symplekin s'associe avec HSF1 au niveau du promoteur du gène *HSP70*, ce qui favorise le recrutement des complexes de polyadénylation sur le locus. La maturation des ARN *Hsp70* devient plus efficace, ce qui aboutit à la traduction accélérée de HSP70 (Xing *et al.,* 2004). Ces travaux indiquent aussi que le rôle de la Symplekin se limite à la polyadénylation des ARN, puisque la quantité d'ARN ne varie pas.

L'ensemble de ces données montre que Pta1 et la Symplekin ont une action positive sur la coordination entre la polyadénylation et la transcription.

5. Possibilité pour la Symplekin d'agir en tant que co-régulateur transcriptionnel, indépendamment de la polyadénylation

Comme indiqué dans le paragraphe précédent, la Symplekin interagissant avec le facteur de transcription HSF1, relierait la transcription et la polyadénylation, sans qu'elle ne

soit un régulateur transcriptionnel.

La régulation transcriptionnelle de ZONAB (*ZO (Zonula occludens)-1-associated nucleic acid binding*) représente un autre exemple révélant le rôle de la Symplekin sur la transcription. ZONAB est un facteur de transcription répressif localisé dans les jonctions serrées lorsqu'il n'est pas dans le noyau. La Symplekin interagit avec lui et agit en tant que co-répresseur de la transcription (Kavanagh *et al.,* 2006). Dans les cellules intestinales, la Symplekin est fortement exprimée dans celles les moins différenciées. La Symplekin et ZONAB répriment le niveau d'expression du gène *RUNX1* dans ces cellules, ce qui empêche leur différenciation (Buchert *et al.,* 2009). Néanmoins, le rôle de la Symplekin dans la polyadénylation au niveau de ses gènes cibles n'a pas été étudié.

L'ensemble de ces travaux montre que la Symplekin est un facteur primordial de la polyadénylation et de la coordination entre la transcription et la maturation des ARN. La plupart des données récoltées indique qu'au sein des complexes moléculaires impliqués, la Symplekin a un effet positif sur la transcription et la polyadénylation, bien qu'un domaine inhibiteur de la polyadénylation masqué par l'interaction avec SSU72 ait été identifié.

Résumé de l'article

Dans la première partie des travaux, nous avons mis en évidence une coopération fonctionnelle entre MOZ et MLL dans l'activation de la transcription des gènes *HOXA9*, *HOXA5* et *HOXA7*. Dans la seconde partie du projet de thèse, il s'agissait d'identifier de nouveaux partenaires de MOZ et de MLL afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de cette coopération.

Nous avons réalisé des expériences d'immuno-affinité, à partir d'un anticorps ciblant MOZ, dans les cellules HEK293T, suivie d'un séquençage par analyse en spectrométrie de masse. La Symplekin a été isolée et identifiée en tant que partenaire potentiel de MOZ. Nous nous sommes focalisés sur cette protéine puisqu'en 2002 Nakamura et ses collaborateurs avaient montré que la Symplekin faisait partie des gros complexes contenant MLL (Nakamura et al., 2002).

La Symplekin est un membre essentiel du complexe de polyadénylation des ARNm. Ce mécanisme post-transcriptionnel consiste en l'ajout d'une queue constituée de plusieurs adénosines (queue poly(A)) à l'extrémité 3' de l'ARN. Alors que plusieurs complexes sont nécessaires à cette modification, il a été démontré que la Symplekin est importante pour leur formation et leur activité. La polyadénylation favorise la stabilité des ARNm et l'efficacité de traduction. La Symplekin agit également en tant que co-régulateur de la transcription, mais son rôle exact dans ce contexte n'a pas encore été démontré.

Nous avons décidé d'utiliser avec les cellules KG1, une lignée hématopoïétique humaine de cellules immatures exprimant le marqueur CD34. Nous nous sommes également concentrés sur le promoteur du gène *HOXA9*, qui est plus largement décrit que ses paralogues *HOXA5* et *HOXA7*.

Nous avons confirmé l'interaction de la Symplekin avec MOZ et MLL par des expériences d'immunoprécipitation dans les cellules KG1. En outre, MOZ interagit avec CPSF-100, un autre membre de la machinerie de polyadénylation. MOZ est une HAT qui est également capable d'acétyler d'autres substrats, tels que RUNX1, P53 ou BRPF1. Par des méthodes d'immunoprécipitation, nous avons mis en évidence l'acétylation de la Symplekin. Ces résultats suggèrent que MOZ pourrait acétyler la Symplekin dans le cadre de leur interaction.

La Symplekin a été mise en évidence comme appartenant aux jonctions serrées, et elle présente une localisation soit nucléaire soit cytoplasmique selon les types cellulaires. Des observations par immuno-cytofluorescence suivies d'une analyse en microscopie confocale ont démontré que la Symplekin est localisée de manière nucléaire et co-localisée avec MOZ dans les cellules KG1.

Par des expériences de ChIP, nous avons aussi constaté que la Symplekin est recrutée au niveau du promoteur du gène *HOXA9* dans les cellules de la lignée KG1. Ces cellules sont hétérogènes du fait d'une différenciation spontanée en cellules myéloïdes d'une fraction de ces cellules. Nous avons donc voulu nous assurer que le recrutement des trois protéines se déroulaient bien dans les mêmes cellules, et non dans des cellules indépendantes. Pour cela, nous avons effectué des ChIP séquentiels. Une première étape est réalisée avec les anticorps

dirigés contre MOZ, MLL ou la Symplekin, puis après élution, une deuxième étape de précipitation utilisant d'autres anticorps. Ainsi, nous avons montré que MOZ, MLL et la Symplekin sont recrutées au niveau du promoteur du gène *HOXA9* au sein des mêmes cellules. Le recrutement de la Symplekin au niveau du promoteur du gène *HOXA9* laisse présager que la Symplekin pourrait avoir une fonction dans la modulation de l'expression du gène *HOXA9*.

De façon surprenante, l'inhibition de la Symplekin dans les cellules KG1 n'induit pas de variation du niveau de l'ARNm *Hoxa9*, mais une baisse de son taux protéique.

Afin d'expliquer ces résultats, nous avons étudié la polyadénylation de l'ARNm *Hoxa9* après une inhibition de la Symplekin. Nous avons observé une baisse de la taille de la queue poly(A) de l'ARNm *Hoxa9*, pouvant être responsable de la diminution de la quantité de protéine HOXA9, la polyadénylation étant essentielle à la traduction. Puisque la queue poly(A) est cruciale pour la stabilité des ARN, nous avons testé la vitesse de dégradation de l'ARNm *Hoxa9*. L'inhibition de la Symplekin provoque sa dégradation plus rapide. Ce résultat semblait en contradiction avec l'absence de variation du niveau de l'ARNm après inhibition de la Symplekin.

Nous nous sommes donc intéressés au recrutement de MOZ et de MLL après inhibition de la Symplekin. Nous avons mis en évidence une augmentation du recrutement de MOZ et MLL sur le promoteur du gène *HOXA9*. Les modifications d'histones associées à MOZ (AcH3K9, AcH3K14) ou MLL (Me2H3K4, Me3H3K4) sont également accrues. En sus, la forme phosphorylée de l'ARN polymérase II (PolII) au niveau de la sérine 5 du domaine C-terminal (CTD) est recrutée de manière plus importante au niveau du promoteur *HOXA9* après inhibition de la Symplekin, ce qui prouve que la transcription du gène *HOXA9* est effectivement augmentée. Ainsi, la Symplekin s'oppose au recrutement de MOZ et de MLL au niveau du promoteur du gène *HOXA9*.

Par conséquent, il existe un équilibre entre un accroissement de la dégradation (due à la perte de l'efficacité de polyadénylation) et celle de la synthèse de l'ARN *Hoxa9* (*via* le recrutement accentué de MOZ et de MLL sur le promoteur du gène *HOXA9*) lorsque la Symplekin est inhibée. Cet équilibre explique l'absence de variation de l'ARNm *Hoxa9* alors que la protéine est plus faiblement produite.

En conclusion, nous avons mis en évidence l'association de la Symplekin avec MOZ et MLL, la Symplekin étant dans ce contexte un répresseur des activités transcriptionnelles de MOZ et de MLL.

Symplekin, a polyadenylation factor, prevents MOZ and MLL activity on HOXA9 in hematopoietic cells

Anne Largeot [a], Jérôme Paggetti [a,b], Julien Broséus [a], Romain Aucagne [a,1], Brice Lagrange [a,2], Romain Z. Martin [a], Ronan Quéré [a], Jean Berthelet [a], Géraldine Lucchi [c], Patrick Ducoroy [c], Jean-Noël Bastie [a,d], Laurent Delva [a,*]

[a] Inserm U866, Labex LipSTIC team, Faculté de Médecine, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France

[b] CRP-Santé Laboratoire d'Hémato-Cancérologie Expérimentale, 1526 Luxembourg, Luxembourg

[c] CLIPP (Clinical Innovation Proteomic Platform), 21000 Dijon, France

[d] Hôpital Universitaire, Service d'Hématologie Clinique, 21000 Dijon, France

[1] Present address: IRIC, Université de Montréal, Montréal H3C 3J7, QC, Canada

[2] Present address: Inserm UMR 851, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Université Lyon I, 69000 Lyon, France

[*] Corresponding author. Inserm U866, Faculté de Médecine, Université de Bourgogne, 7, boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France; tel.: +33 (0)380393440; fax: +33 (0)380393434.

E-mail address: Laurent.Delva@u-bourgogne.fr (L. Delva)

Abbreviations: AMLs, acute myeloid leukemias; BRPF, bromodomain and PHD finger-containing protein; CPSF100, cleavage and polyadenylation specificity factor 100; CTD-RNA-PolII, C-terminal domain of the RNA-polymerase II; EAF6, Esa1-associated factor 6 ortholog; HAT, histone acetyltransferase; HMT, histone methyltransferase; HOX, homeobox; HSF1, Heat shock factor 1; ING5, inhibitor of growth 5; MLL, Mixed Lineage Leukemia; MOZ, Monocytic leukemia zinc finger; MYST, MOZ/YBF2/SAS2/TIP60 homology domain; PHD, plant homeodomain; RUNX1, runt-related transcription factor 1; Spi-1/PU.1, Spleen Focus Forming Virus Proviral Integration Oncogene/purine-rich box-1

ABSTRACT

MOZ and MLL encoding a histone acetyltransferase and a histone methyltransferase, respectively, are targets for recurrent chromosomal translocations found in acute myeloblastic or lymphoblastic leukemia. We have previously shown that MOZ and MLL cooperate to activate *HOXA9* gene expression in hematopoietic stem/progenitors cells. To dissect the mechanism of action of this complex, we decided to identify new proteins interacting with MOZ. We found that the scaffold protein Symplekin that supports the assembly of polyadenylation machinery was identified by mass spectrometry. Symplekin interacts and co-localizes with both MOZ and MLL in immature hematopoietic cells. Its inhibition leads to a decrease of HOXA9 protein level but not of *Hoxa9* mRNA and to an over-recruitment of MOZ and MLL onto *HOXA9* promoter. Altogether, our results highlight the role of Symplekin in transcription repression involving a regulatory network between MOZ, MLL and Symplekin.

Key Words:

Symplekin

MOZ

MLL

HOXA9

Transcription regulation

1. Introduction

Acute myeloblastic leukemias (AMLs) are characterized by acquired somatic mutations and epigenetic alterations in genes that are essential during hematopoiesis, for cell proliferation and survival pathways. Gene expression patterns especially in AML-MLL (Mixed Lineage Leukemia) or -MOZ (Monocytic leukemia zinc finger protein) subtypes corroborate increased expression of a subset of HOX proteins including HOXA9 [1-3]. HOXA9 is necessary for the tumoral process in MLL leukemias [4]. Deciphering the mechanisms of *HOXA9* regulation is necessary to evaluate its function in normal and leukemic myelopoiesis. MOZ and MLL are recruited to target genes including *Hox* loci, as part of complexes enhancing transcription [5-10].

MOZ (also named MYST3 or KAT6A) is a MYST (MOZ/YBF2/SAS2/TIP60 homology domain) family histone acetyltransferase (HAT), which catalyzes the transfer of acetyl group from acetyl-CoA to the ε-amino group of specific lysine residues. MOZ forms a tetrameric complex with EAF6 (Esa1-associated factor 6 ortholog), the bromodomain PHD (plant homeodomain) finger proteins BRPF1, BRPF2 or BRPF3 (bromodomain and PHD finger-containing protein) and ING5 (inhibitor of growth 5) to execute its activities [11]. This enzyme is involved in developmental processes including hematopoiesis [12] and skeletogenesis [13, 14]. Reciprocal chromosomal translocations triggering the fusion of *MOZ* to various HATs [15, 16] are identified in acute myeloid leukemias (AMLs). Furthermore, analysis of *Moz* knock out mice suggests a crucial role in the maintenance of hematopoietic stem cells and differentiation of myeloid cells [12, 17, 18]. MOZ acts as a transcriptional co-activator of several hematopoietic transcription factors, *e.g.* Spi-1/PU.1 (Spleen Focus

Forming Virus Proviral Integration Oncogene/purine-rich box-1) or RUNX1 (runt-related transcription factor 1), *via* specific interactions [19, 20].

MLL (also known as KMT2A), a histone methyltransferase (HMT) [21], is also involved in hematopoiesis [22], and is one of the most frequently rearranged gene in acute leukemias [23]. While MOZ is required for normal status of acetylated lysine 9 and 14 on histone H3 (AcH3K9, AcH3K14) [9, 10], MLL catalyzes H3 lysine 4 di- and tri-methylation (Me2H3K4 and Me3H3K4) [21].

We have previously characterized a functional interaction between MOZ and MLL, leading to the transcriptional activation of the *HOXA9* transcription factor in human hematopoietic stem/progenitor cells [24].

To better understand the mechanism of action of *HOXA9* regulation, we decided to identify MOZ and MLL interacting partners. We have isolated and functionally characterized a novel MOZ- and MLL-associated protein, Symplekin. We show here that this polyadenylation factor can act as a repressor of the MOZ-MLL complex in human immature hematopoietic cells, suggesting a regulatory network between MOZ, MLL and Symplekin.

2. Material and methods

2.1. Cells and cell culture

The human myeloblastic KG1 cell line (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was grown in RPMI 1640 Glutamax medium (BioWhittaker) supplemented with 20% fetal calf serum (FCS) (BioWhittaker), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), and amphotericin B (0.25 µg/mL) (BioWhittaker). The human HEK293T cells were maintained in 10% FCS and in DMEM supplemented with 4.5 g/L glucose (BioWhittaker). Human cord blood cells were layered over Ficoll-Paque (1.77 g/L) (Eurobio, Les Ulis, France), and the interface containing mononuclear cells was harvested after centrifugation. Then, the cells were washed, and CD34+ cells were purified using the CD34+ cells magnetic isolation kit and AutoMACS™ separator according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany).

2.2. Immunoprecipitation and western blotting

The HA-MOZ and the c-Myc-MOZ vectors were provided by Issai Kitabayashi (NCCRI, Tokyo, Japan) and Edward Chan (Indiana University Cancer Center, Indianapolis, IN, USA), respectively, whereas the Flag-Symplekin plasmid was obtained from James Manley (Columbia University, New York, NY, USA).

HEK293T (transiently transfected as indicated above or not) or KG1 cells were harvested, washed with PBS and lysed in a cold immunoprecipitation-lysis buffer (1% NP40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH8, protease inhibitor cocktail). Samples were incubated on ice for 30 min. After centrifugation, 1 mg of total proteins was then pre-cleared with protein

G agarose beads (Upstate Biotechnology). MOZ (a mouse monoclonal antibody directed against residues 856-870 of MOZ (IGBMC, Illkirch, France)), Symplekin (Becton-Dickinson), MLL-C (Upstate Biotechnology), c-Myc (9E10, Santa Cruz Biotechnology), Acetyl Lysine (Cell Signaling Technology) specific antibodies associated with protein G agarose beads, were used for immunoprecipitating proteins with gentle shaking at 4°C overnight. As control, each extract was also immunoprecipitated with irrelevant IgG (Santa Cruz Biotechnology). For FLAG immunoprecipitations, protein extracts were immunoprecipitated with anti-FLAG M2 affinity gel (EZview Red Anti-Flag M2 Affinity Gel, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Immunoprecipitation complexes were washed five times in ice-cold immunoprecipitation-lysis buffer. Proteins were eluted by boiling in Laemmli buffer. Eluated proteins were then separated by SDS-PAGE and electroblotted to nitrocellulose membranes. Equivalent loading between lanes was confirmed by Ponceau Red staining. Membranes were blocked in 1x PBS-T (0.1%) and fat-free dry milk or BSA (5%) (blocking buffer) during one hour at room temperature, then incubated with the primary antibodies diluted in the blocking buffer at 4°C overnight. Membranes were washed three times in 1x PBS-T (0.1%) during 10 min each. For immunoblotting, anti-HOXA9 and anti-CPSF100 were obtained from Santa Cruz Biotechnology, and anti-c-IAP1 from R&D Technology. Secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (FLAG Western-blotting) or with fluorochromes were added, and the membranes were incubated at room temperature during one hour. Membranes were washed three times in 1x PBS-T (0.1%) during 10 min each. Anti-HSC70 (Santa Cruz Biotechnology) was used to check loading control. For protein detection, ECL Western blotting reagent kit (Millipore) and the Odyssey infrared imaging system (LI-COR) were used.

2.3. Mass spectrometry

Lysate from HEK293T cells was prepared as described above. MOZ associated with protein G agarose beads was used for immunoprecipitating proteins. Eluated proteins were then separated by SDS-PAGE. Coomassie blue stained bands were excised manually from the gel and cut into 1 mm^3 pieces. The gel fragments were prepared as recently described [25]. Peptides were then analyzed by MS and MS/MS with a MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) mass spectrometer. Proteins were identified by comparison to the human MSDB (Mass Spectrometry protein sequence DataBase) databank.

2.4. Immunofluorescence microscopy

Hematopoietic KG1 or HEK293T cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized in 0.1% Triton X-100 and saturated in PBS 1X 4% BSA. Cells were incubated 1 h at RT with the anti-MOZ (N19, Santa Cruz Biotechnology) (dilution 1:50), anti-Symplekin (dilution 1:200), anti-FLAG (Sigma-Aldrich) (1:500) or anti-c-Myc (1:500). Then, cells were incubated during 1 h with antibodies specific for mouse or goat immunoglobulin subclasses conjugated to fluorochromes (anti-goat-Alexa 488 or anti-mouse-Alexa 568) (dilution 1:1000). Nuclei were counterstained with DAPI. Cells were analyzed using a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP2). Images were processed with Adobe Photoshop (adjustment of brightness and contrast).

2.5. SiRNA knockdown

Ten millions of KG1 cells were transfected with siRNAs by nucleoporation, according to the manufacturer´s protocol (Amaxa). SiRNAs, synthesized by Invitrogen, target human Symplekin (Sense: 5'-CGUCUGUGCUGUUUGGAGCUGACAA-3') or MOZ (Sense: 5'-UUAAUCUGCACUUCAGAGCCUCAGG-3'). A control siRNA was used as a negative control (*Silencer*® Negative Control N°1 siRNA Ambion).

2.6. RNA isolation, reverse transcription, Q-PCR, poly(A) tail lenght

Total RNA was extracted with TRI Reagent® (Ambion) and reverse transcribed with random primer (Promega). Real-time PCR was performed in triplicates with TaqMan probes from Applied Biosystems and analyzed in an Applied Biosystems 7500 Fast thermocycler. Values for each PCR were normalized with 18S. The TaqMan® assays were the following: Hs00191361_m1 (Symplekin), Hs00365956_m1 (Hoxa9), Hs00198899_m1 (Moz), Hs00610538_m1 (Mll). To measure poly(A) tail lengths of *Hoxa9* RNA, we employed the Poly(A) Tail-Length Assay Kit provided by Affymetrix. Two gene-specific forward and reverse primer sets were designed upstream of the polyadenylation site correspond to control for *Hoxa9*. The gene specific primers used were the following: site 1 forward 5'-AACTTCTGTGTACTGGGTGAT-3'; site 1 reverse CACTGGGAAATTCTTACAGCT-3'; site 2 forward 5'-TTATACACTATGAAACCGCCATT-3'; site 2 reverse 5'-GGCCTTGAGGTAACTATTGC-3'. The second set of primers uses the gene-specific forward primer and the universal reverse primer provided with the Kit to generate a product that includes the poly(A) tails of *Hoxa9*. Human actin polyadenylation was measured as positive control with primers from the Kit. The PCR products were analyzed on

polyacrylamide gels. To evaluate mRNA degradation, KG1 cells (20×10^6) were transfected with siRNAs by nucleoporation. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with actinomycin D (1 □ M) (Sigma-Aldrich). RNA was extracted and analyzed at different time.

2.7. ChIP assays

Briefly, 5×10^6 of KG1 cells were fixed with 1% formaldehyde to cross-link DNA with proteins, lysed, and fragmented by sonication to obtain DNA fragments of 200-1000 bp. ChIP procedure was carried out with modifications according to the manufacturer's instructions (Upstate Biotechnology). After pre-clearing with salmon sperm DNA/protein A (antibodies specific for histone modifications) or G agarose beads, the samples underwent immunoprecipitation with antibodies specifically directed against Symplekin, MOZ, MLL-C, Me2H3K4 (Upstate Biotechnology), Me3H3K4 (Upstate Biotechnology), AcH3K9 (Upstate Biotechnology), AcH3K14 (Upstate Biotechnology), RNA polymerase II CTD repeat YSPTSPS phosphorylated Ser 5 (Abcam, Cambridge, UK), IgA (Santa Cruz Biotechnology) (Control ChIP) or IgG (Control ChIP) at 4°C overnight. Beads were washed, protein/DNA complexes eluted, then cross-links reversed by heating at 65°C overnight. After RNA and protein digestions, DNA was purified on a spin column (NucleoSpin Extract II: Macherey-Nagel, Düren, Germany). For sequential ChIP assays, the primary immunoprecipitation was done using Symplekin, MLL-C or MOZ antibody. The immunoprecipitated complexes were eluted with ChIP buffer. The eluate from Symplekin or MOZ IP was re-immunoprecipitated with the antibody corresponding to the other protein. The presence of the promoter sequences in the resulting re-ChIP immunoprecipitates were examined as described for one-step ChIP. Real-time Q-PCR analysis was performed in an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time

PCR System. The ChIP primers used to amplify regions of the promoter locus of *HOXA9* were (5′- GGGGAGACGGGAGAGTACAG-3’ and 5′-CGTCCAGCAGAACAATAACG-3’) (Invitrogen). For internal control of ChIP-Q-PCR, we designed the primers to amplify an intronic region of *HOXA9* (5′-CTCCTCCCTTCAAATCCGCC-3′ and 5′-CAACTTCTGGCTCCTGGCC-3′). Input corresponding to total sonicated DNA was used as cell number control. Delta-delta Ct values of each immunoprecipitated sample were normalized with those obtained from the amplification of their respective input and by subtracting the values obtained in the corresponding samples incubated without antibodies. Results with IgA or IgG were arbitrarily considered as 1. Error bars (standard deviation) correspond to the average of triplicates.

2.8. Analysis of mRNA degradation

KG1 cells (20×10^6) were transfected with siRNAs by nucleoporation. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with Actinomycin D (1 □ M). RNA was extracted and analyzed at different time.

2.9. Statistical analysis

Mann-Whitney *U* test was used for statistical analysis. Differences were considered significant when *p* was less than .05. In all cases, * represents *p* less than .05; **, *p* less than .01; and ***, *p* less than .005.

3. Results

3.1. Symplekin is associated with MOZ and MLL

To isolate proteins associating with MOZ, the latter was immunoprecipitated from human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells by the anti-MOZ already described [24]. Mass spectroscopy analysis of co-eluted proteins allowed the identification of Symplekin (Supplemental Fig. 1A). Symplekin, which supports the assembly of polyadenylation complexes [26, 27], has been detected among other members of the MLL supercomplex [28]. However, up to now the interaction between MLL and Symplekin has not been validated by immunoprecipitation assays.

To evaluate further the interactions that may occur between MOZ, MLL and Symplekin in human immature hematopoietic cells, we performed co-IP experiments using the KG1 AML0 cell line that expresses these proteins. We observed that Symplekin interacts with both MOZ and MLL (Fig. 1A, B). As a negative control, MOZ does not immunoprecipitate cIAP1 (Supplemental Fig. 1B). In the human cord blood CD34+ cells, Symplekin was detected after immunoprecipitation with the MOZ antibody (Supplemental Fig. 1C), indicating that the two proteins interact in normal hematopoietic stem/progenitor cells. In HEK293T cells, endogenous Symplekin and MOZ proteins interact with each other (Fig. 1C). We confirmed this interaction with exogenous epitope-tagged proteins. The Flag-tagged Symplekin co-immunoprecipitates the c-Myc-tagged MOZ from extracts of HEK293T cells co-transfected with the corresponding expression vectors (Fig. 1D).

In mammals, effective cleavage requires four multi-subunit complexes including CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) [29]. CPSF is required for the

polyadenylation step. As symplekin exists in a complex with CPSF100, we decided to examine a potential interaction between MOZ and CPSF100. CPSF100 is found to interact with MOZ (Fig. 1E) in KG1 cells, suggesting that various proteins of the polyadenylation complex could be associated with MOZ.

Since MOZ is known to acetylate not only histones, *e.g.* RUNX1 [19], we then examined whether the interaction observed between Symplekin and MOZ could lead to its acetylation. A first IP performed using anti-Symplekin followed by subsequent IP with acetylated lysine antibody suggests its acetylation (Fig. 1F). This post-translational modification may result from its interaction with MOZ.

Despite its clear role in mRNA polyadenylation, Symplekin has been first identified in tight junction and its sub-cellular localization can change depending of the cell type [30-32]. We carried out double staining of MOZ with Symplekin in KG1 cells (Fig. 2A). Symplekin, which appears to be confined in the nucleus, co-localizes with MOZ. Co-localization was confirmed in HEK293T cells, either using endogenous proteins or exogenously expressed tagged proteins, c-Myc-MOZ and Flag-Symplekin (Fig. 2B, C).

Altogether, these results demonstrate the association between Symplekin, MOZ and MLL.

3.2. Symplekin modulates HOXA9 in immature hematopoietic cells

Symplekin is an essential member of the polyadenylation machinery, supporting its assembly and its activity [27, 33]. In addition, Symplekin has been described as a transcription co-regulator through its association with transcription factors such as ZONAB/DbpA and HSF1 [34, 35]. Since we previously showed that MOZ and MLL

cooperate to activate *HOXA9* transcription, we thus examined whether the interaction of Symplekin with MOZ and MLL could affect *HOXA9* expression. To investigate the potential recruitment of Symplekin onto the *HOXA9* promoter, we carried out ChIP analyses in KG1 cells. After IP, the segment of the *HOXA9* promoter is amplified, indicating that Symplekin, like MOZ and MLL, is recruited onto *HOXA9* promoter (Fig. 3A). Sequential ChIP demonstrates that Symplekin is simultaneously recruited with MOZ or MLL (Fig. 3B, C). Therefore, Symplekin, MOZ and MLL associate with the *HOXA9* locus in KG1 cells. These results may suggest that Symplekin is a regulator for *HOXA9* transcription.

We thus analyzed *HOXA9* expression in absence of *Symplekin* or *Moz* in KG1 cells (Supplemental Fig. 2). Surprisingly, *Hoxa9* mRNA is not affected by Symplekin down-regulation (Fig. 4A) while HOXA9 protein level is markedly decreased (Fig. 4B). In contrast, the inhibition of *Moz* induces a down-regulation of *HOXA9* mRNA and protein level (Fig. 4A, B).

Polyadenylation, a multi-step processing consisting in the cleavage of the 3' end of the mRNA and the synthesis of the poly(A) tail, is determinant for RNA stability or export and translation efficiency. The role of Symplekin in polyadenylation could explain why the HOXA9 protein level decreases whereas *Hoxa9* mRNA is not affected. A PCR-based assay was used to assess the effect of Symplekin on *Hoxa9* RNA 3' poly(A) tail length. Total RNA from KG1 cells transfected with siRNA targeting *Symplekin* (si*Sympk*) or control siRNA (si*Ctrl*) (Supplemental Fig. 2) was retro-transcribed and annealed with two different primer pairs reflecting the length of the poly(A) tail of *Hoxa9* (Supplemental Fig. 3). Experiments with si*Ctrl* or si*Moz* were performed as controls. There is a marked reduction in the length of the poly(A) tail with si*Sympk* compared to the controls (Fig. 5A). Since polyadenylation is a

determining element for translation efficacy, decreased polyadenylation by si*Sympk* could explain reduced level of the HOXA9 protein.

Polyadenylation is crucial for RNA stability. We tested whether knockdown of Symplekin enhanced *Hoxa9* mRNA degradation. KG1 cells transfected either with the control siRNA or si*Sympk* were incubated with actinomycin D, which interferes with the process of transcription. The decay of *Hoxa9* mRNA was measured from 10 min to 4 hrs (Fig. 5B). After 1 hour of treatment, *Hoxa9* mRNA levels were significantly lower in si*Sympk*-treated cells than in the control cells. Therefore, a lack of *Symplekin* decreases *Hoxa9* mRNA stability. This is consistent with the impairment of *Hoxa9* mRNA polyadenylation observed after *Symplekin* knockdown. From this result we could expect a decrease in global *Hoxa9* mRNA level after *Symplekin* inhibition. However, we observed no variation of *Hoxa9* mRNA level (Fig. 4A). We decided to clarify this phenomenon since a specific molecular mechanism may counteract the higher degradation of *Hoxa9* mRNA.

3.3. Symplekin affects MOZ and MLL recruitment on HOXA9 promoter

We focused our work on the transcriptional effects of Symplekin on *HOXA9*. Cells were transfected with si*Sympk*, si*Moz* or si*Ctrl*, followed by ChIP analysis of the *HOXA9* promoter. As expected from our previous report [24], binding of MOZ or MLL to the *HOXA9* promoter is decreased after *Moz* knockdown in KG1 cells, leading to a fall in histone modifications catalyzed by MOZ and MLL, *i.e.* AcH3K9, AcH3K14, Me2H3K4 or Me3H3K4 (Fig. 6A, B and Supplemental Fig. 4). Interestingly, contrary to what is observed in intron of *HOXA9* (Supplemental Fig. 5), *Symplekin* inhibition induces an over-recruitment of MOZ or MLL onto the *HOXA9* promoter (Fig. 6A and Supplemental Fig. 4). Meanwhile,

the level of the corresponding post-translational modifications is increased (Fig. 6B and Supplemental Fig. 4). To test if the accrued recruitment of MOZ and MLL is associated with an activation of *HOXA9* transcription, we assessed the phosphorylation status the C-terminal domain (CTD) of the RNA-polymerase II (CTD-RNA-PolII) by ChIP assays. Indeed, when transcription is initiated, this domain is phosphorylated, thus initiation of transcription is associated with an increase in CTD-RNA-PolII phosphorylation on the serine 5 onto target promoters. After *Symplekin* knockdown, we can observe a rise in the serine 5-phosphorylated form of the CTD-RNA-PolII onto *HOXA9* promoter (Fig. 6C). These results suggest an increase in *HOXA9* transcription after *Symplekin* inhibition through an accrued recruitment of MOZ and MLL. Thus, depletion of *Symplekin* leads to a balance between a more important *Hoxa9* mRNA degradation and a boosted transcription, making clear the constant global level of *Hoxa9* mRNA.

4. Discussion

In this work we show that Symplekin interacts with MOZ and MLL, two histone-modifying proteins, preventing their recruitment onto *HOXA9*. *HOXA9* is an important homeobox gene involved in hematopoiesis, and its over-expression is a central mechanism in leukemia induction. Indeed, in AML harboring MLL fusion proteins, inhibition of HOXA9 leads to a fall in cell transformation. Thus, the understanding of mechanisms implicated in *HOXA9* transcriptional regulation is essential.

Pta1, the yeast counterpart of Symplekin, a member of the polyadenylation machinery, is necessary for both cleavage and polyadenylation tail synthesis [36]. Pta1 is known to interact with the CTD-RNA-PolII [37] and with Ssu72, a CTD-RNA PolII phosphatase [38], linking transcription initiation to polyadenylation [39], and improving gene-looping, a mechanism which promotes transcription [40]. *In vitro* studies performed with the N-terminal domain of human Symplekin revealed that it also interacts with human Ssu72 and the CTD of RNA PolII [41] to stimulate polyadenylation when processing is coupled with transcription.

Symplekin has also been described as a transcriptional co-regulator *via* its association with several transcription factors. In case of cell stress, Symplekin is recruited onto *HSP70* promoter through its interaction with HSF1 (Heat shock factor 1) promoting the polyadenylation linked to transcription. Thus, *Hsp70* mRNA newly transcribed is more efficiently processed, and its translation rate is improved [35]**.** In contrast, Symplekin is an important co-factor for ZONA/B, a repressive transcription factor, and altogether they silence *RUNX1* expression in undifferentiated intestinal cells [34]. In this case, Symplekin is crucial for ZONA/B recruitment onto *RUNX1* promoter. However, its role in polyadenylation was not explored. Interestingly, our results indicate that human endogenous Symplekin is bound onto

a specific promoter and acts as a repressive co-regulator to prevent the recruitment of the well-known transcription co-activators MOZ and MLL (Fig. 6). Our study is in contradiction with the idea that Symplekin may be involved in the activation of transcriptional machinery. Pta1 representing ~50% of Symplekin in size and sharing only 31% of similarity [26], this could explain mechanistic differences reported by this study and other reports. Finally, a differential interaction network promoter-dependent targeted by Symplekin may also influence its transcriptional activity (co-repressor *versus* co-activator) [34, 35].

Symplekin's post-translational modifications could highlight its contradictory role. Indeed, its sumoylation is essential for its activity as a polyadenylation factor [42]. Since we have shown that Symplekin is also acetylated, further studies on these modifications will be necessary to explain its complex role in regulating transcription and polyadenylation.

Altogether, these findings indicate that Symplekin exhibits a transcriptional role by controlling the function of MOZ-MLL in human immature hematopoietic cells.

Acknowledgements

We thank A. Bataille for IF assays and C. Arnould for confocal analysis (Université de Bourgogne, Dijon) as well as M. Oulad-Abdelghani for the MOZ antibody (IGBMC, Illkirch, France), J. Manley (Columbia University, New York, NY, USA), I. Kitabayashi (NCCRI, Tokyo, Japan) and E. Chan (Indiana University Cancer Center, Indianapolis, IN, USA) for plasmids.

This study was supported by the Ligue contre le Cancer (Conférence de Coordination Inter-régionale du Grand Est) (to L.D.) and the Conseil Régional de Bourgogne (CRB) (PARI to RGHL team). A.L. was supported by fellowships from the Inserm associated with the Conseil Régional de Bourgogne and the Société Française d'Hématologie (SFH), J.P. by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of France (MESR) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), R.A. by fellowships from the Ligue de Saône-et-Loire contre le Cancer, the ARC, and the SFH, B.L. by fellowships from the MESR, the ARC, and the SFH, R.Z.M. by fellowships from the MESR, R.Q. by fellowships from the CRB and the ARC, and J.B. by the MESR.

References

[1] S.A. Armstrong, J.E. Staunton, L.B. Silverman, R. Pieters, M.L. den Boer, M.D. Minden, S.E. Sallan, E.S. Lander, T.R. Golub, S.J. Korsmeyer, MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia, Nat Genet, 30 (2002) 41-47.
[2] E.A. Eklund, The role of HOX genes in myeloid leukemogenesis, Curr Opin Hematol, 13 (2006) 67-73.
[3] M. Camos, J. Esteve, P. Jares, D. Colomer, M. Rozman, N. Villamor, D. Costa, A. Carrio, J. Nomdedeu, E. Montserrat, E. Campo, Gene expression profiling of acute myeloid leukemia with translocation t(8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement reveals a distinctive signature with a specific pattern of HOX gene expression, Cancer Res, 66 (2006) 6947-6954.
[4] P.M. Ayton, M.L. Cleary, Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9, Genes Dev, 17 (2003) 2298-2307.
[5] A. Yokoyama, M.L. Cleary, Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes, Cancer Cell, 14 (2008) 36-46.
[6] S. Jin, H. Zhao, Y. Yi, Y. Nakata, A. Kalota, A.M. Gewirtz, c-Myb binds MLL through menin in human leukemia cells and is an important driver of MLL-associated leukemogenesis, J Clin Invest, 120 (2010) 593-606.
[7] T.A. Milne, J. Kim, G.G. Wang, S.C. Stadler, V. Basrur, S.J. Whitcomb, Z. Wang, A.J. Ruthenburg, K.S. Elenitoba-Johnson, R.G. Roeder, C.D. Allis, Multiple interactions recruit MLL1 and MLL1 fusion proteins to the HOXA9 locus in leukemogenesis, Mol Cell, 38 (2010) 853-863.
[8] Y.X. Chen, J. Yan, K. Keeshan, A.T. Tubbs, H. Wang, A. Silva, E.J. Brown, J.L. Hess, W.S. Pear, X. Hua, The tumor suppressor menin regulates hematopoiesis and myeloid transformation by influencing Hox gene expression, Proc Natl Acad Sci U S A, 103 (2006) 1018-1023.
[9] A.K. Voss, C. Collin, M.P. Dixon, T. Thomas, Moz and retinoic acid coordinately regulate H3K9 acetylation, Hox gene expression, and segment identity, Dev Cell, 17 (2009) 674-686.
[10] A.K. Voss, H.K. Vanyai, C. Collin, M.P. Dixon, T.J. McLennan, B.N. Sheikh, P. Scambler, T. Thomas, MOZ regulates the Tbx1 locus, and Moz mutation partially phenocopies DiGeorge syndrome, Dev Cell, 23 (2012) 652-663.
[11] M. Ullah, N. Pelletier, L. Xiao, S.P. Zhao, K. Wang, C. Degerny, S. Tahmasebi, C. Cayrou, Y. Doyon, S.L. Goh, N. Champagne, J. Cote, X.J. Yang, Molecular architecture of quartet MOZ/MORF histone acetyltransferase complexes, Mol Cell Biol, 28 (2008) 6828-6843.
[12] T. Thomas, L.M. Corcoran, R. Gugasyan, M.P. Dixon, T. Brodnicki, S.L. Nutt, D. Metcalf, A.K. Voss, Monocytic leukemia zinc finger protein is essential for the development of long-term reconstituting hematopoietic stem cells, Genes Dev, 20 (2006) 1175-1186.
[13] C.T. Miller, L. Maves, C.B. Kimmel, moz regulates Hox expression and pharyngeal segmental identity in zebrafish, Development, 131 (2004) 2443-2461.
[14] J.G. Crump, M.E. Swartz, J.K. Eberhart, C.B. Kimmel, Moz-dependent Hox expression controls segment-specific fate maps of skeletal precursors in the face, Development, 133 (2006) 2661-2669.
[15] X.J. Yang, The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases, Nucleic Acids Res, 32 (2004) 959-976.

[16] S. Esteyries, C. Perot, J. Adelaide, M. Imbert, A. Lagarde, C. Pautas, S. Olschwang, D. Birnbaum, M. Chaffanet, M.J. Mozziconacci, NCOA3, a new fusion partner for MOZ/MYST3 in M5 acute myeloid leukemia, Leukemia, 22 (2008) 663-665.
[17] T. Katsumoto, Y. Aikawa, A. Iwama, S. Ueda, H. Ichikawa, T. Ochiya, I. Kitabayashi, MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells, Genes Dev, 20 (2006) 1321-1330.
[18] F.M. Perez-Campo, J. Borrow, V. Kouskoff, G. Lacaud, The histone acetyl transferase activity of monocytic leukemia zinc finger is critical for the proliferation of hematopoietic precursors, Blood, 113 (2009) 4866-4874.
[19] I. Kitabayashi, Y. Aikawa, L.A. Nguyen, A. Yokoyama, M. Ohki, Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein, EMBO J, 20 (2001) 7184-7196.
[20] N. Pelletier, N. Champagne, S. Stifani, X.J. Yang, MOZ and MORF histone acetyltransferases interact with the Runt-domain transcription factor Runx2, Oncogene, 21 (2002) 2729-2740.
[21] P.A. Del Rizzo, R.C. Trievel, Substrate and product specificities of SET domain methyltransferases, Epigenetics, 6 (2011) 1059-1067.
[22] K.A. McMahon, S.Y. Hiew, S. Hadjur, H. Veiga-Fernandes, U. Menzel, A.J. Price, D. Kioussis, O. Williams, H.J. Brady, Mll has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal, Cell Stem Cell, 1 (2007) 338-345.
[23] R. Marschalek, Mechanisms of leukemogenesis by MLL fusion proteins, Br J Haematol, 152 (2011) 141-154.
[24] J. Paggetti, A. Largeot, R. Aucagne, A. Jacquel, B. Lagrange, X.J. Yang, E. Solary, J.N. Bastie, L. Delva, Crosstalk between leukemia-associated proteins MOZ and MLL regulates HOX gene expression in human cord blood CD34+ cells, Oncogene, 29 (2010) 5019-5031.
[25] S. Seguin-Py, G. Lucchi, S. Croizier, F.Z. Chakrama, G. Despouy, J.N. Le Grand, P. Ducoroy, W. Boireau, M. Boyer-Guittaut, M. Jouvenot, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, Identification of HSP90 as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein, Biochimie, 94 (2012) 748-758.
[26] Y. Takagaki, J.L. Manley, Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component, Mol Cell Biol, 20 (2000) 1515-1525.
[27] C.R. Mandel, Y. Bai, L. Tong, Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing, Cell Mol Life Sci, 65 (2008) 1099-1122.
[28] T. Nakamura, T. Mori, S. Tada, W. Krajewski, T. Rozovskaia, R. Wassell, G. Dubois, A. Mazo, C.M. Croce, E. Canaani, ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation, Mol Cell, 10 (2002) 1119-1128.
[29] N. Proudfoot, J. O'Sullivan, Polyadenylation: a tail of two complexes, Curr Biol, 12 (2002) R855-857.
[30] B.H. Keon, S. Schafer, C. Kuhn, C. Grund, W.W. Franke, Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein, J Cell Biol, 134 (1996) 1003-1018.
[31] H. Chang, C. Zhang, Y. Cao, Expression and distribution of symplekin regulates the assembly and function of the epithelial tight junction, Histochem Cell Biol, 137 (2012) 319-327.
[32] Z. Dominski, W.F. Marzluff, Formation of the 3' end of histone mRNA: getting closer to the end, Gene, 396 (2007) 373-390.

[33] M.D. Ruepp, C. Schweingruber, N. Kleinschmidt, D. Schumperli, Interactions of CstF-64, CstF-77, and symplekin: implications on localisation and function, Mol Biol Cell, 22 (2011) 91-104.
[34] E. Kavanagh, M. Buchert, A. Tsapara, A. Choquet, M.S. Balda, F. Hollande, K. Matter, Functional interaction between the ZO-1-interacting transcription factor ZONAB/DbpA and the RNA processing factor symplekin, J Cell Sci, 119 (2006) 5098-5105.
[35] H. Xing, C.N. Mayhew, K.E. Cullen, O.K. Park-Sarge, K.D. Sarge, HSF1 modulation of Hsp70 mRNA polyadenylation via interaction with symplekin, J Biol Chem, 279 (2004) 10551-10555.
[36] J. Zhao, M. Kessler, S. Helmling, J.P. O'Connor, C. Moore, Pta1, a component of yeast CF II, is required for both cleavage and poly(A) addition of mRNA precursor, Mol Cell Biol, 19 (1999) 7733-7740.
[37] C.R. Rodriguez, E.J. Cho, M.C. Keogh, C.L. Moore, A.L. Greenleaf, S. Buratowski, Kin28, the TFIIH-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II, Mol Cell Biol, 20 (2000) 104-112.
[38] S. Krishnamurthy, X. He, M. Reyes-Reyes, C. Moore, M. Hampsey, Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase, Mol Cell, 14 (2004) 387-394.
[39] X. He, A.U. Khan, H. Cheng, D.L. Pappas, Jr., M. Hampsey, C.L. Moore, Functional interactions between the transcription and mRNA 3' end processing machineries mediated by Ssu72 and Sub1, Genes Dev, 17 (2003) 1030-1042.
[40] A. Ansari, M. Hampsey, A role for the CPF 3'-end processing machinery in RNAP II-dependent gene looping, Genes Dev, 19 (2005) 2969-2978.
[41] K. Xiang, T. Nagaike, S. Xiang, T. Kilic, M.M. Beh, J.L. Manley, L. Tong, Crystal structure of the human symplekin-Ssu72-CTD phosphopeptide complex, Nature, 467 (2010) 729-733.
[42] V. Vethantham, N. Rao, J.L. Manley, Sumoylation modulates the assembly and activity of the pre-mRNA 3' processing complex, Mol Cell Biol, 27 (2007) 8848-8858.

Figure 1

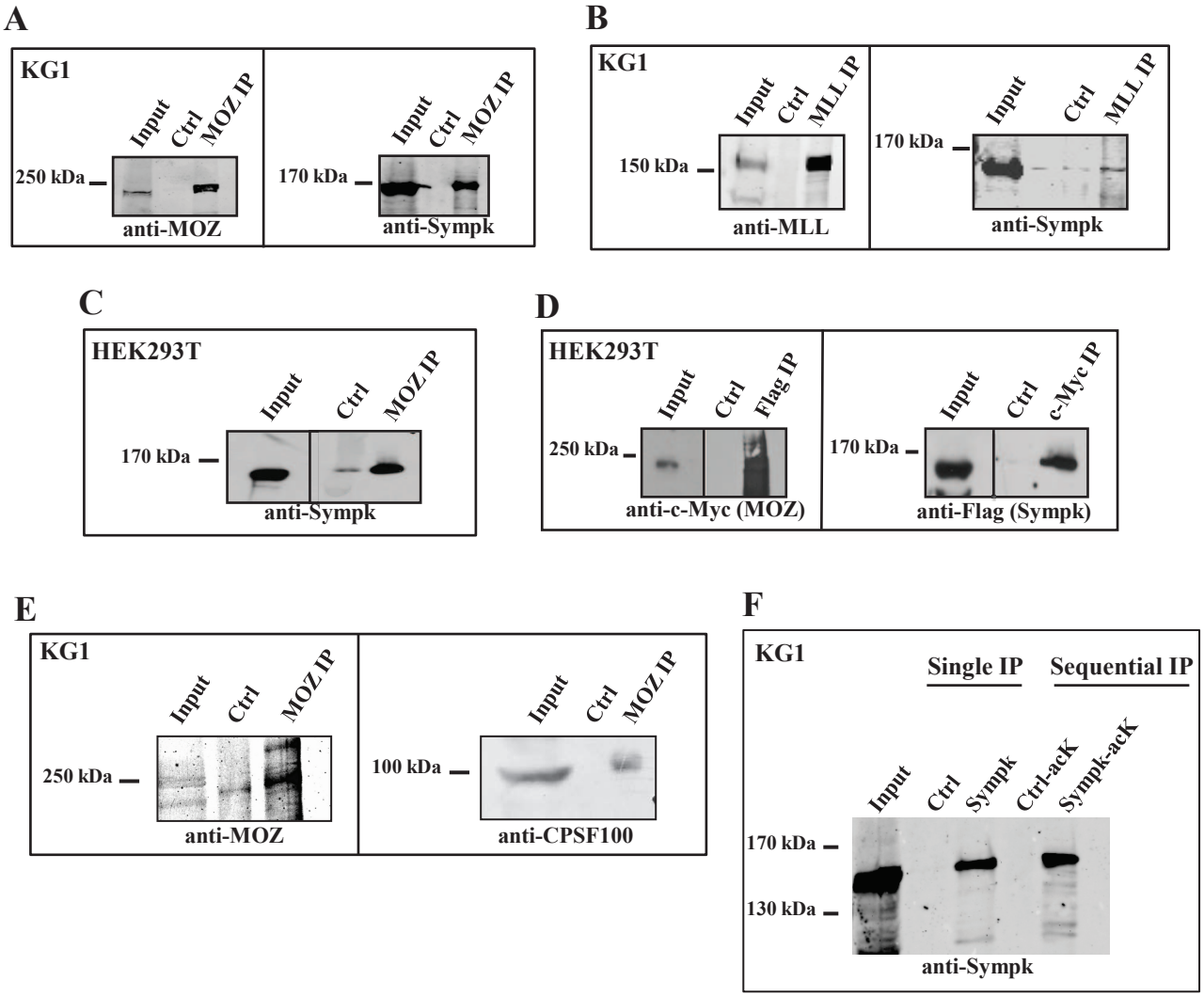


Fig. 1. **Symplekin is associated with MOZ and MLL.** (A) **Symplekin interacts with MOZ in KG1 cells.** IP were performed with anti-MOZ, then immunoprobed with anti-MOZ or anti-Sympk. (B) **Symplekin interacts with MLL.** IP were performed with anti-MLL, then immunoprobed with anti-MLL or anti-Sympk. (C) **Symplekin interacts with MOZ in HEK293T cells.** IP were performed with anti-MOZ, then immunoprobed with anti-Sympk. (D) **Flag-Symplekin interacts with c-Myc-MOZ.** Flag-Sympk or c-Myc-MOZ vectors were transfected into HEK293T cells. IP were performed with anti-Flag or anti-c-Myc, then immunoprobed as indicated. (E) **MOZ interacts with CPSF100 in KG1 cells.** IP were performed with anti-MOZ, then immunoprobed with anti-MOZ or anti-CPSF100. (F) **Symplekin is acetylated.** A first IP was performed with anti-Sympk, eluated, then a second IP was performed with anti-acetylated lysine (anti-acK) and immunoprobed with anti-Sympk.

Figure 2

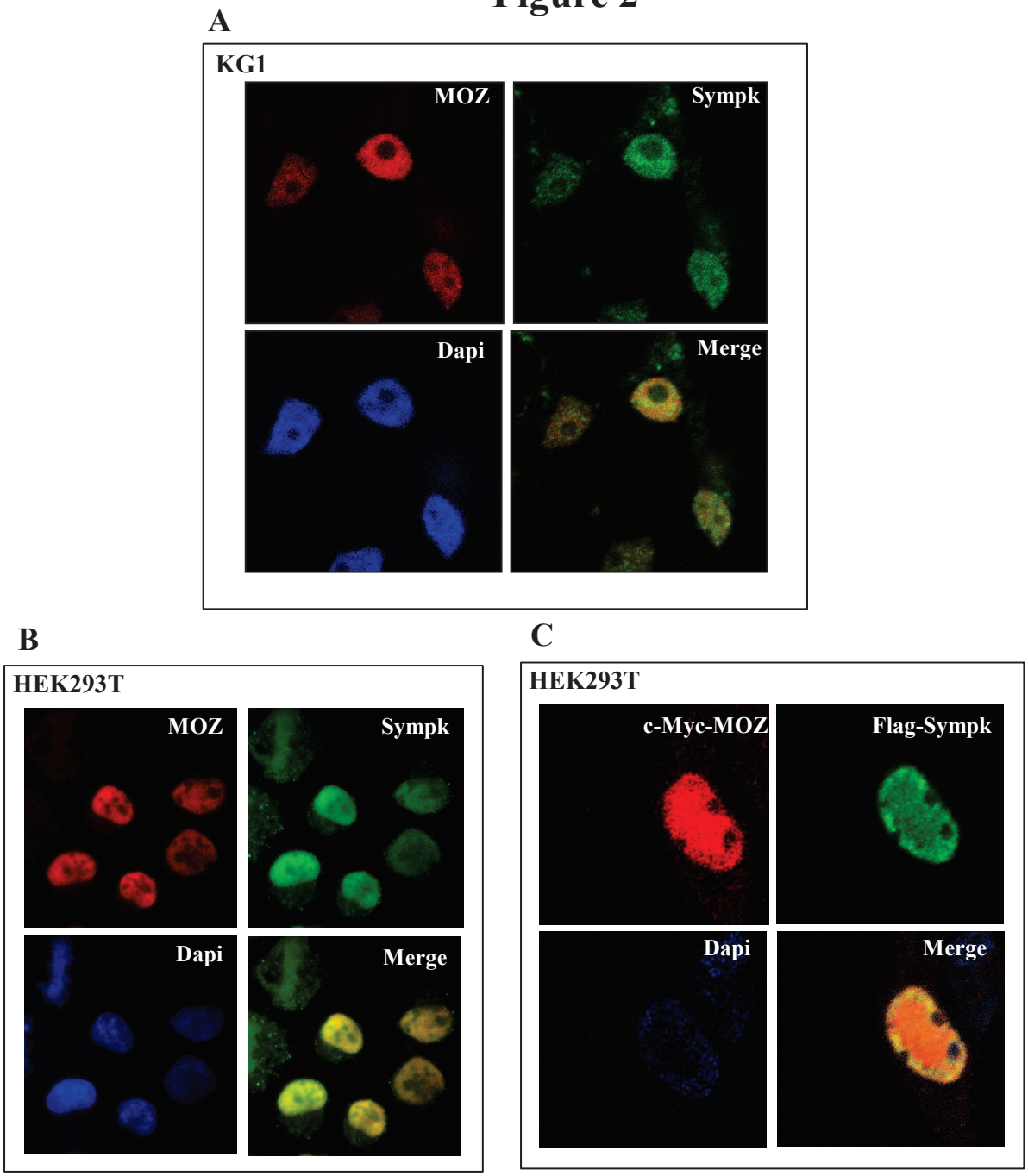


Fig. 2. Symplekin co-localizes with MOZ. (A) MOZ was stained with anti-MOZ and Symplekin with anti-Sympk in KG1 cells. Nuclei were counterstained with DAPI. The merge is the overlay of both images (Scale bar: 9 mm). (B) MOZ was stained with anti-MOZ and Symplekin with anti-Sympk in HEK293T cells. Nuclei were counterstained with DAPI. The merge is the overlay of both images (Scale bar: 9 mm). (C) Flag-Sympk or c-Myc-MOZ vectors were transfected into HEK293T cells. c-Myc-MOZ was stained with anti-c-Myc and Flag-Symplekin with anti-Flag. Nuclei were counterstained with DAPI. The merge is the overlay of both images (Scale bar: 6 mm).

Figure 3

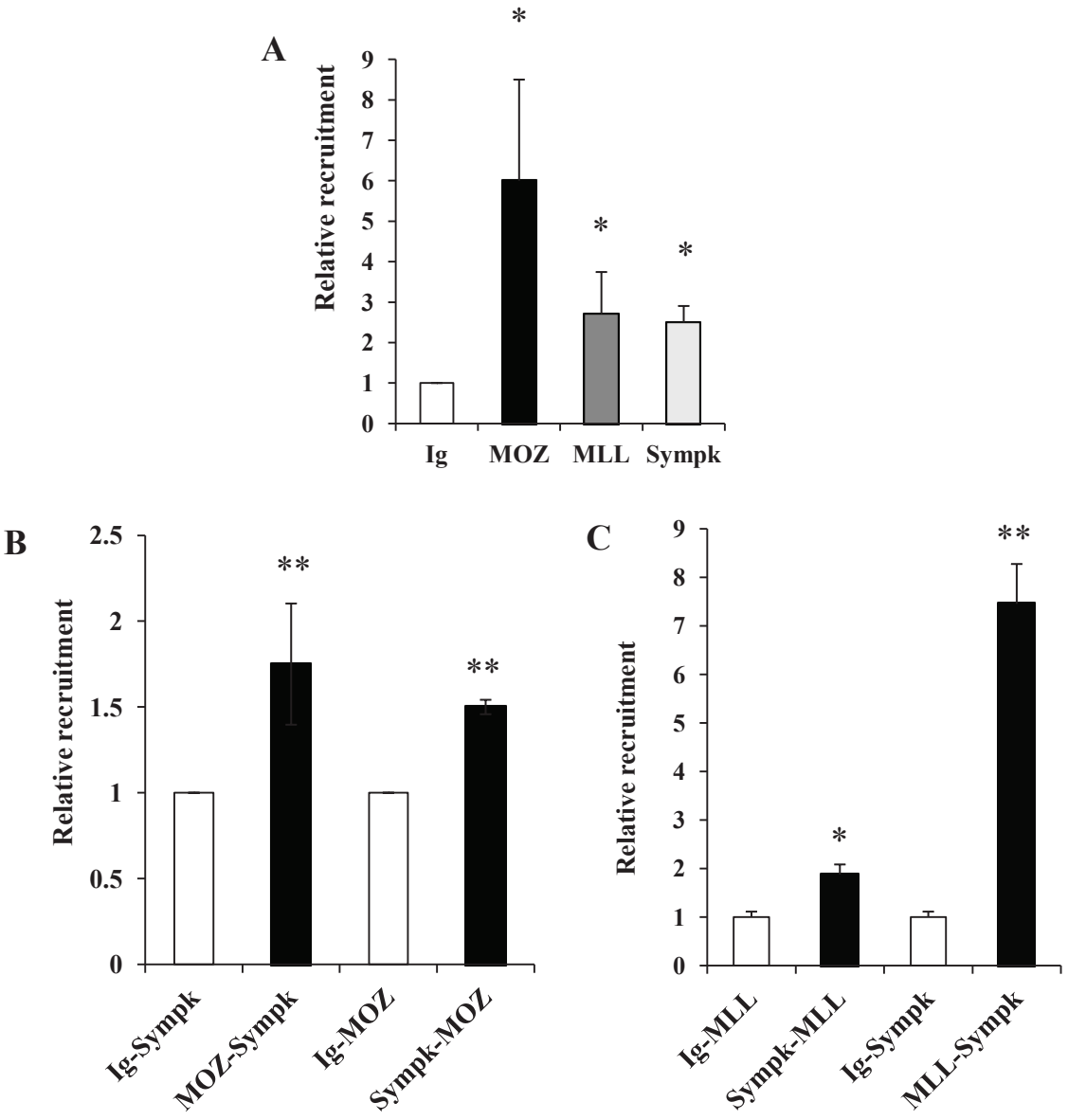


Fig. 3. Symplekin is recruited onto *HOXA9* promoter in KG1 cells. (A) The occupancy of MOZ, MLL and Sympk at the *HOXA9* promoter was measured by ChIP (n=3). (B, C) MOZ or MLL are simultaneously recruited with Symplekin. Sequential ChIP experiments were performed (n=3).

Figure 4

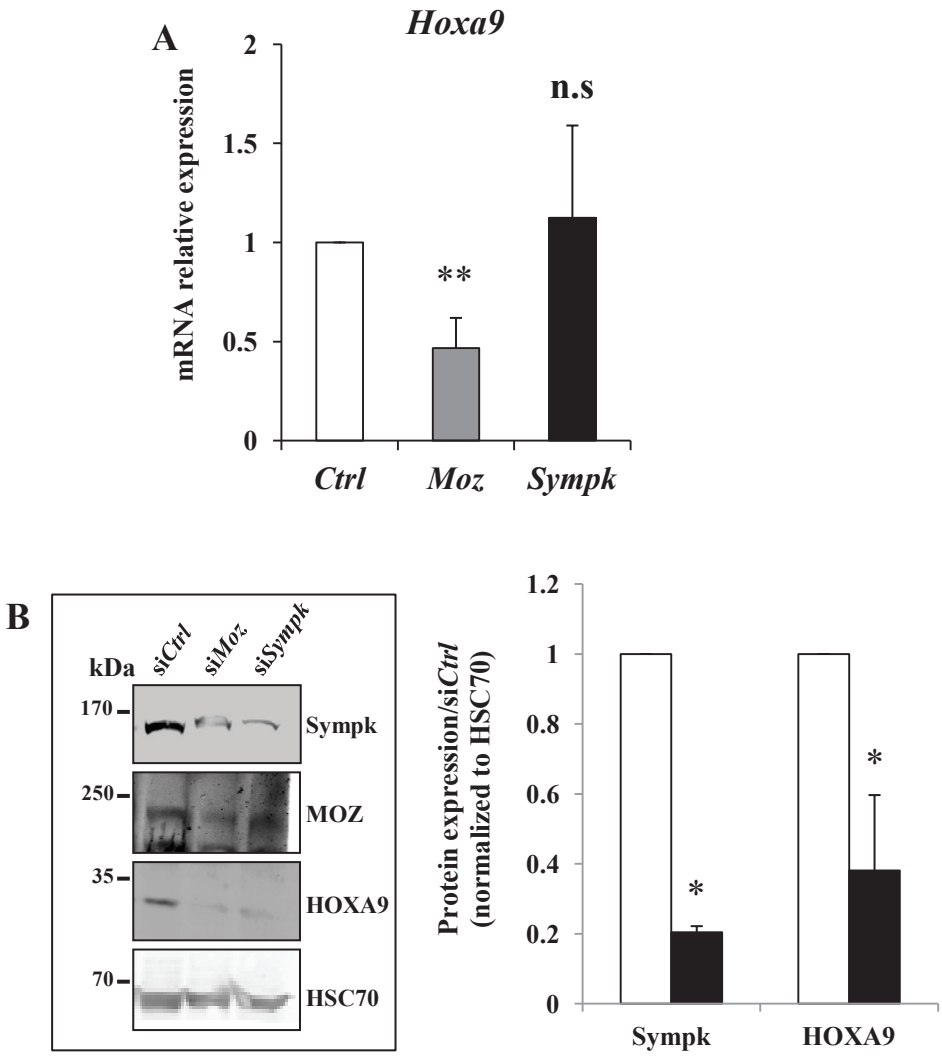


Fig. 4. Symplekin affects HOXA9 protein level in KG1 cells. (A) **Symplekin impacts *HOXA9* expression.** Cells were transfected with si*Ctrl*, si*MOZ* or si*Sympk*. *HOXA9* expression was measured 24 hrs after transfection by RQ-PCR (bar graphs: Error bars represent standard deviation) (n=5). (B) **Symplekin affects HOXA9 protein level.** Cells were transfected with si*Ctrl*, si*MOZ* or si*Sympk*. *HOXA9* expression was measured 24 hrs after transfection by immunoblotting performed with anti-Sympk, anti-MOZ, anti-HOXA9 or anti-HSC70. One independent experiment out of three is shown (left panel). Quantitation of HOXA9 and Symplekin proteins from three independent experiments are also shown (bar graphs: Error bars represent standard deviation) (right panel).

Figure 5

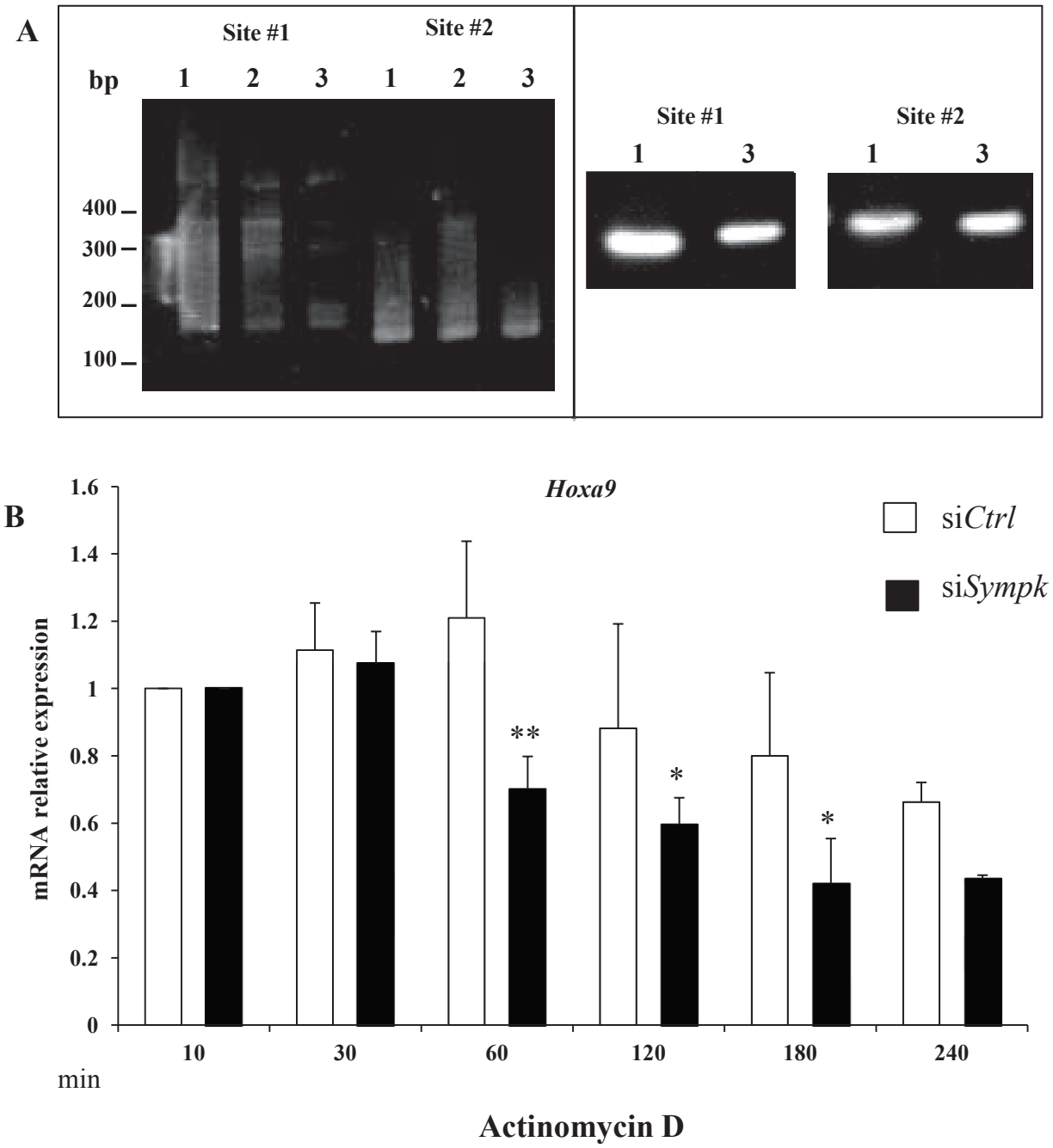
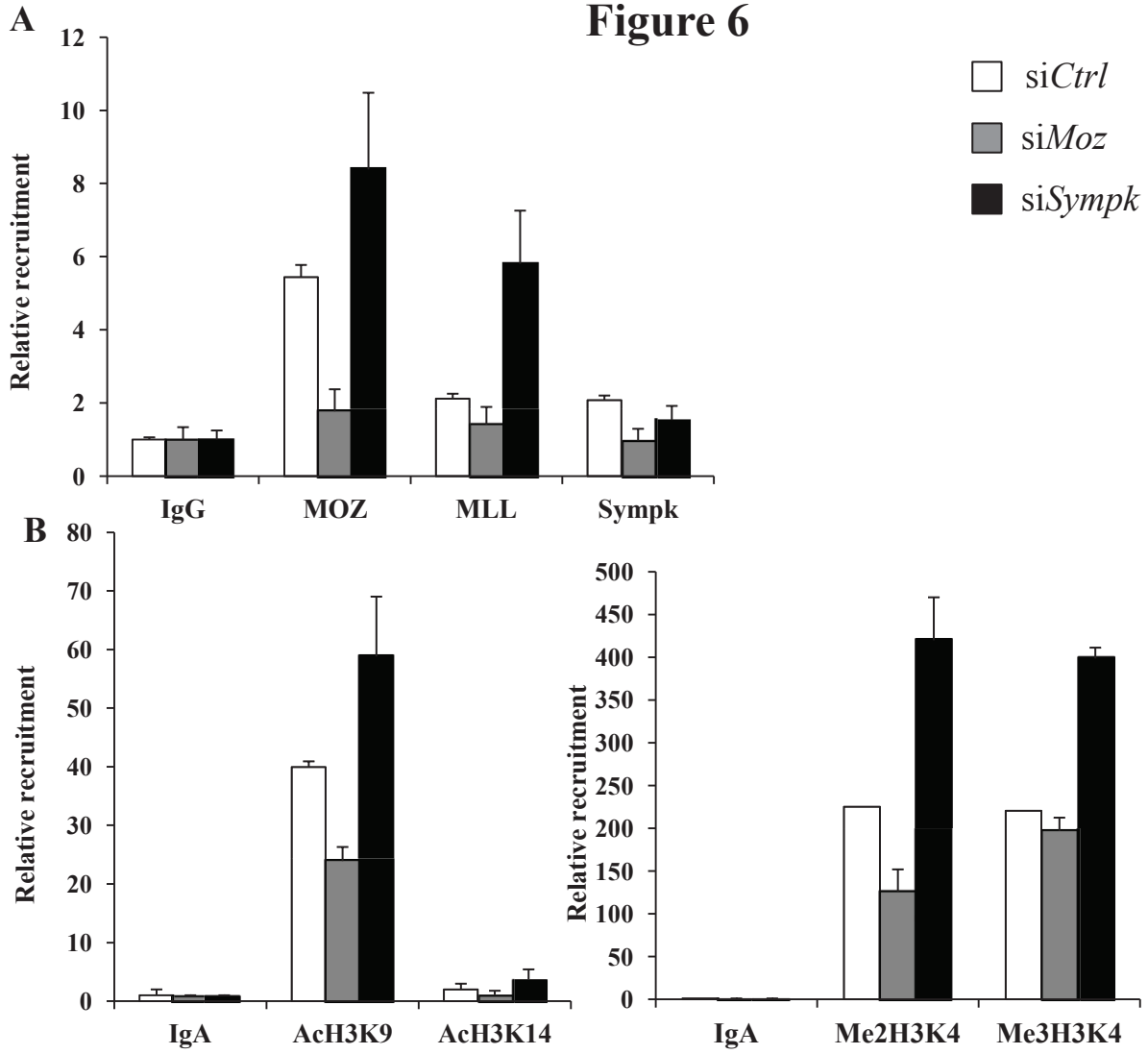


Fig. 5. Symplekin acts on polyadenylation of *Hoxa9* mRNA. (A) **Impairment in *Hoxa9* polyadenylation after Symplekin knockdown.** Cells were transfected with si*Ctrl* (1), si*MOZ* (2) or si*Sympk* (3). The amplified products corresponding to polyadenylated *Hoxa9* (left panel) or controls (right panels) were analyzed by PAGE. (B) Cells were transfected with si*Ctrl* or si*Sympk* and treated with actinomycin D, 24 hrs after transfection. *Hoxa9* mRNA level was measured by RQ-PCR. Error bars represent standard deviation (n=3).

Figure 6



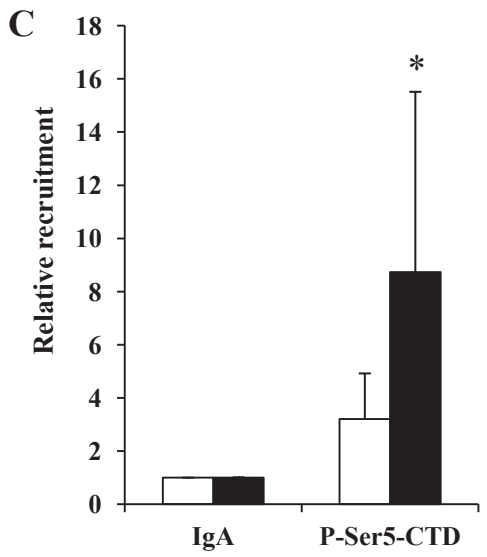
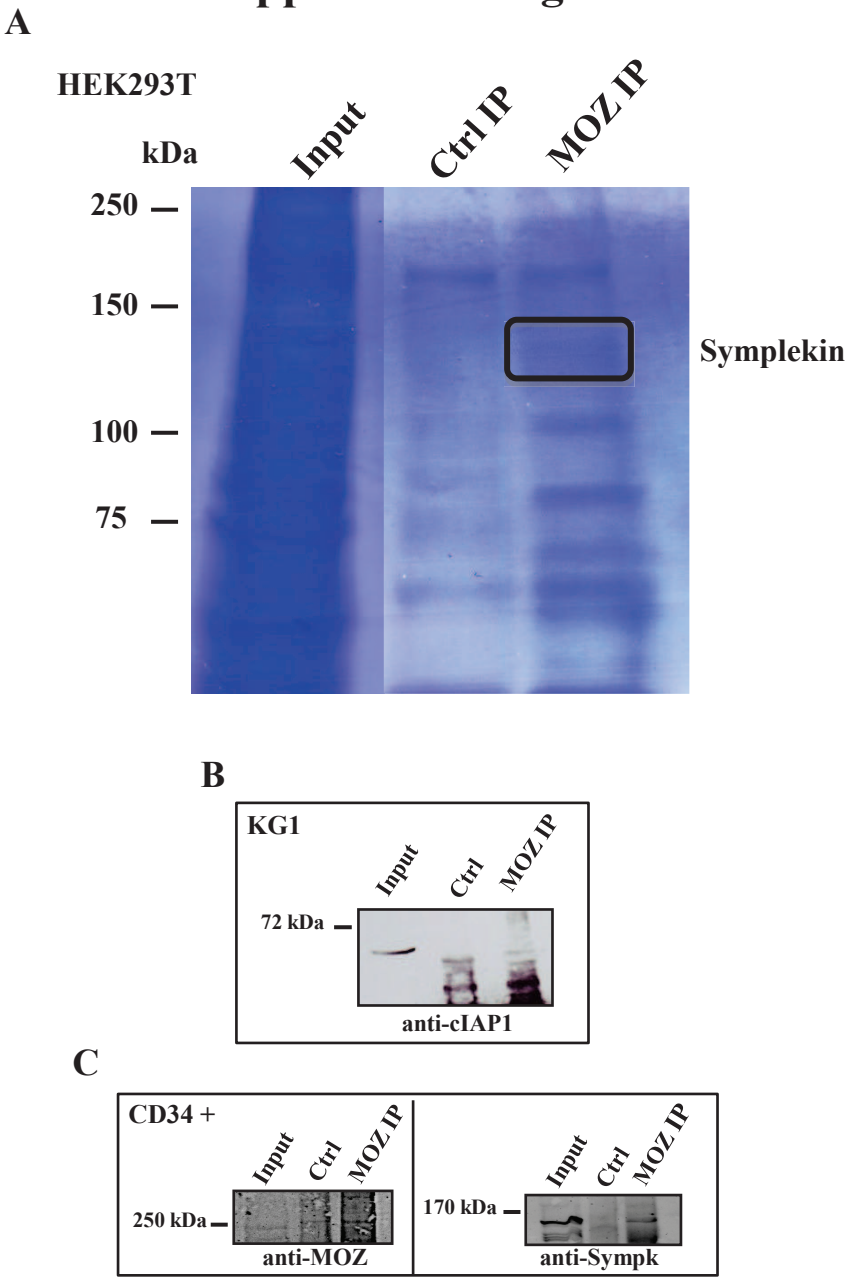


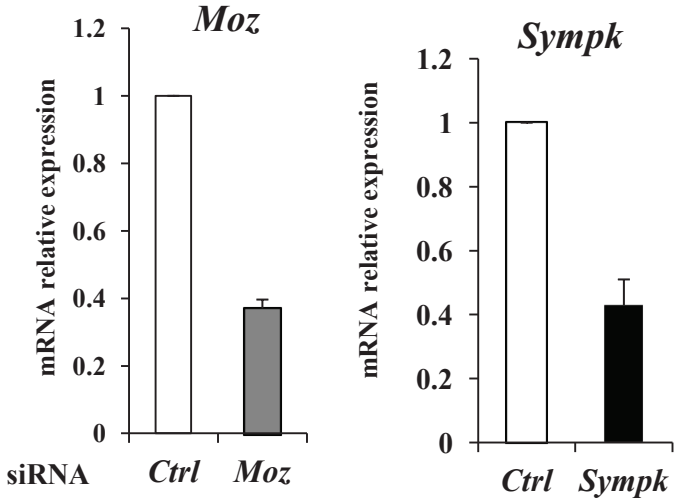
Fig. 6. Symplekin prevents MOZ and MLL recruitment on *HOXA9* promoter. ChIP experiments were carried out in cells transfected with si*Ctrl*, si*MOZ* or si*Sympk*. (A) This panel corresponds to ChIP measuring MOZ, MLL or Symplekin occupancy (one out of five independent experiments). (B) These panels represent post-translational modifications of histones (one out of four independent experiments). (C) This panel corresponds to ChIP measuring the occupancy of the phosphorylated CTD-RNA-PolII. Error bars represent standard deviation (n=3).

Supplemental Fig. 1



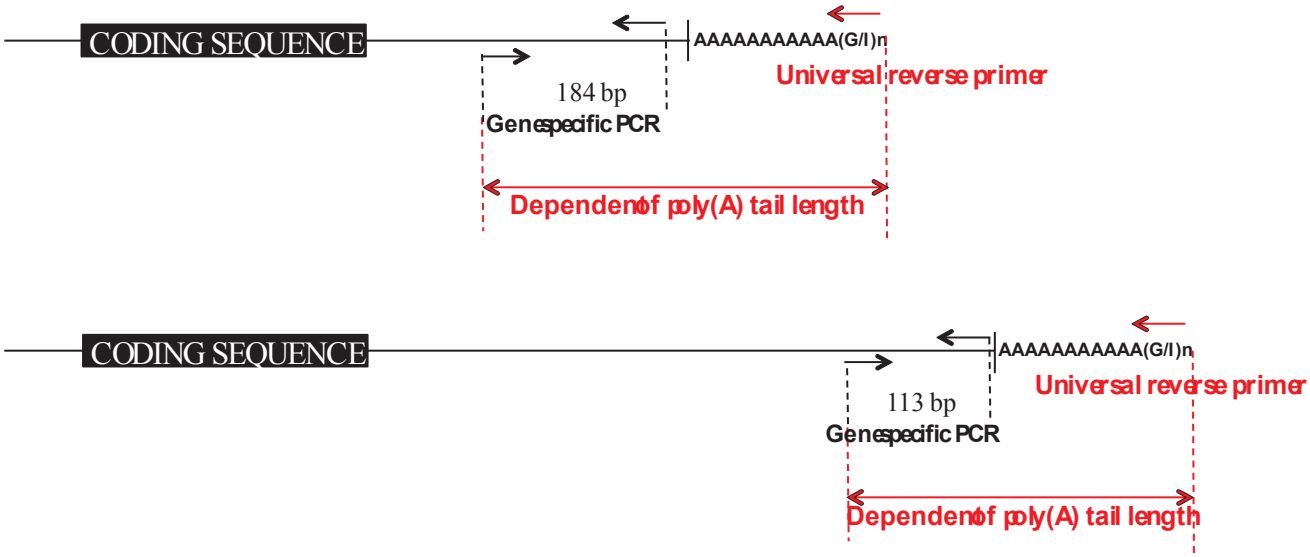
Supplemental Fig. 1. **Symplekin interacts with MOZ.** (A) Coomassie blue of proteins co-precipitating with MOZ and the control IP from HEK293T cell lysate, respectively. The immunoprecipitated proteins were resolved by 6% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Note that several MOZ-binding proteins are resolved. Both lanes were subjected to tandem mass spectrometry. (B) Co-immunoprecipitation of MOZ with cIAP1 in KG1 cells indicates that endogenous MOZ does not interact with endogenous cIAP1. Whole cell soluble extracts were immunoprecipitated with anti-MOZ, then immunoprobed with anti-cIAP1. (C) Co-immunoprecipitation of MOZ with Symplekin (Sympk) in CD34+ cells indicates that endogenous MOZ interacts with endogenous Symplekin. Whole cell soluble extracts were immunoprecipitated with anti-MOZ, then immunoprobed with anti-Sympk.

Supplemental Fig. 2



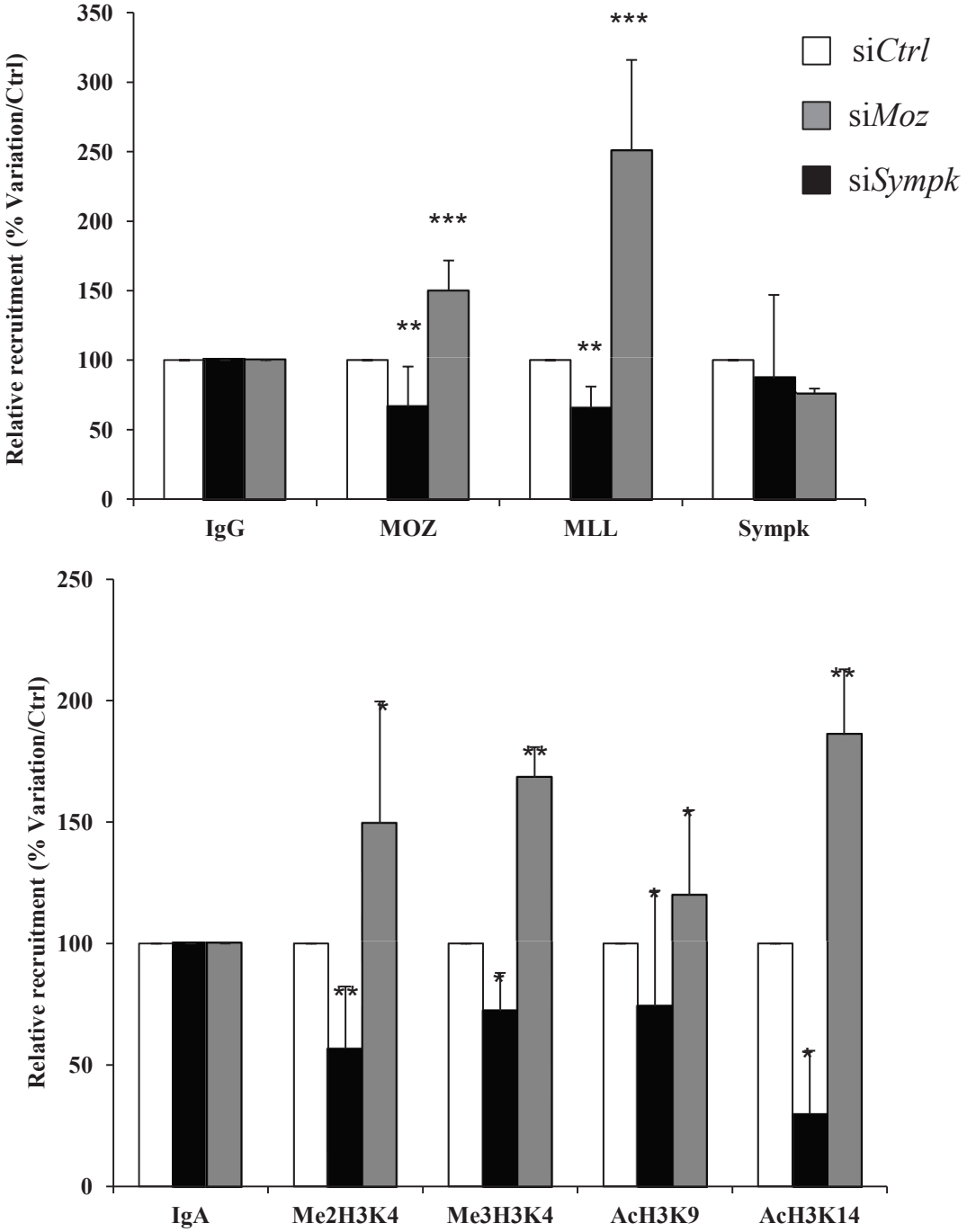
Supplemental Fig. 2. Efficient inhibition of *Moz* and *Symplekin* siRNA. KG1 cells were transfected with si*Ctrl*, si*Moz* or si*Sympk*. *Moz* or *Symplekin* expressions were measured 24 hrs after transfection by RQ-PCR (bar graphs: Error bars represent standard deviation) (n=5).

Supplemental Fig. 3



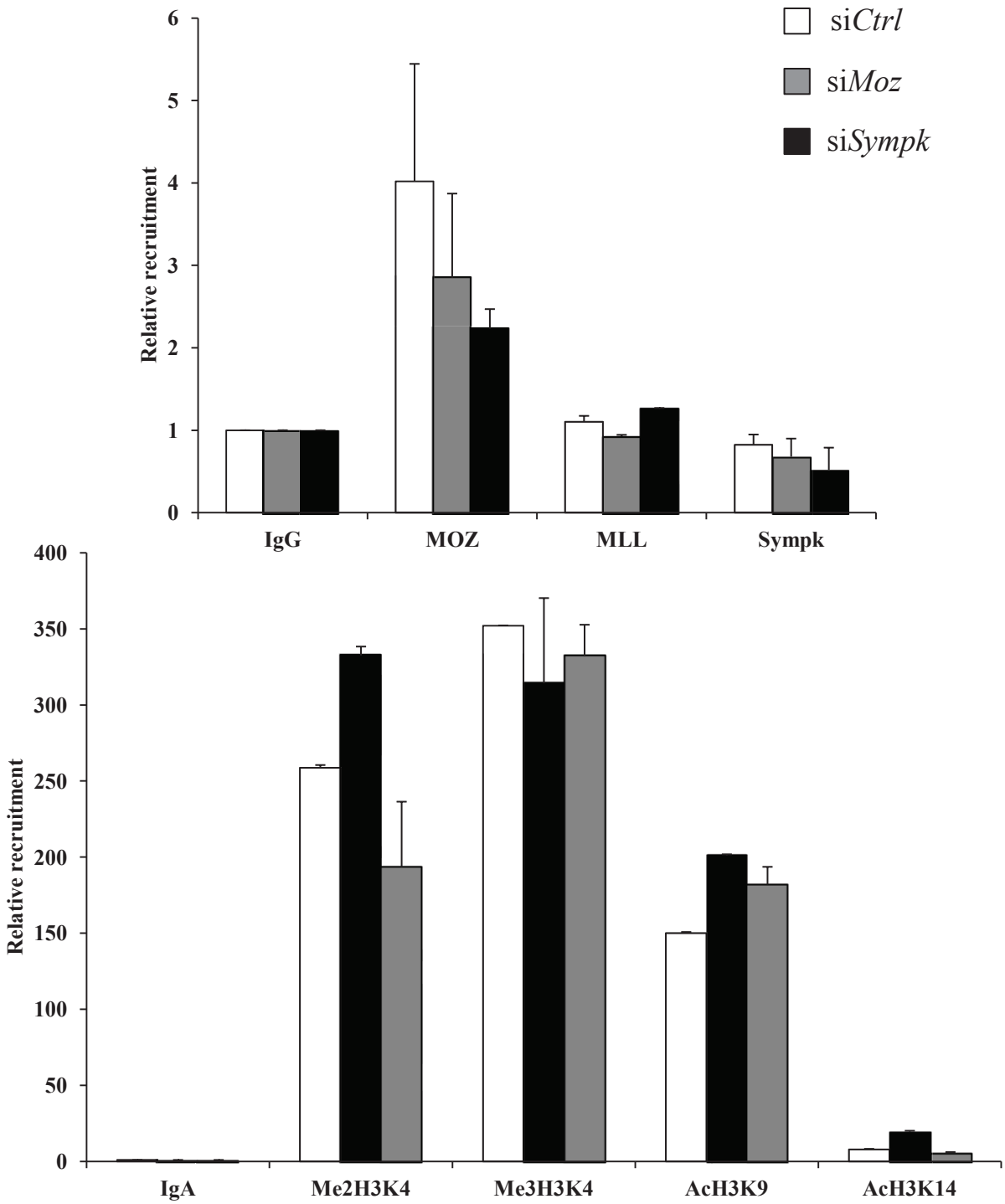
Supplemental Fig. 3. Schematic diagram of the *Hoxa9* transcript 3' end structure and experimental strategy. Two putative polyadenylation sites were identified by *in silico* analysis. The location of the poly(A) sites and relative location of primers are indicated.

Supplemental Fig. 4



Supplemental Fig. 4. Symplekin prevents MOZ and MLL recruitment on *HOXA9* promoter. ChIP experiments were performed in cells transfected with si*Ctrl*, si*MOZ* or si*Sympk*. Upper panel corresponds to ChIP measuring MOZ, MLL or Symplekin occupancy (n=5) while lower panels represent post-translational modifications of histones (n=4). Graphs correspond to the average of the percentage of variations compared to the recruitment measured in the si*Ctrl* sample.

Supplemental Fig. 5



Supplemental Fig. 5. MOZ and MLL recruitments onto *HOXA9* intron are not influenced by *Symplekin* inhibition. ChIP experiments were performed in cells transfected with si*Ctrl*, si*MOZ* or si*Sympk*. Upper panel corresponds to ChIP measuring MOZ, MLL or Symplekin occupancy (one out of two independent experiments) while lower panels represent post-translational modifications of histones (one out of two independent experiments).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

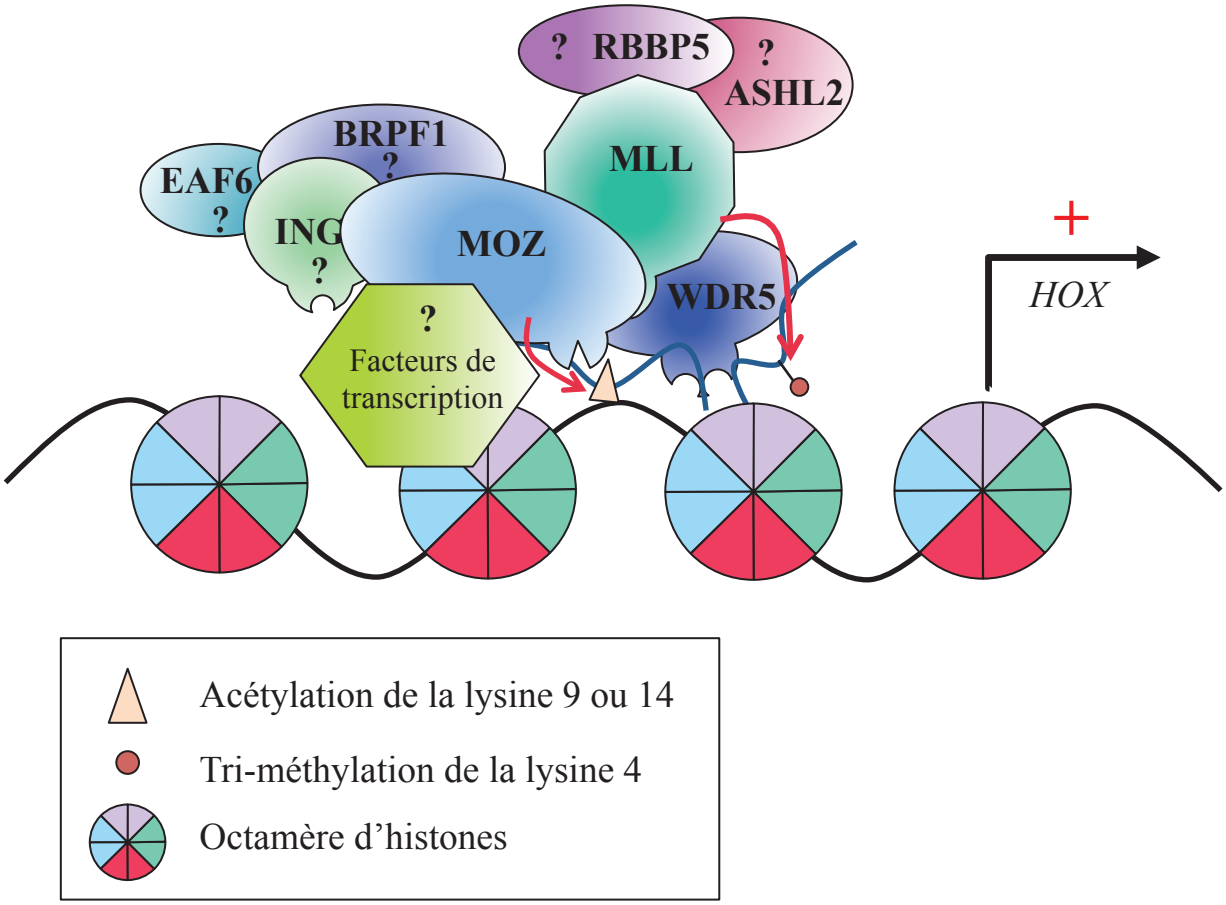


Figure 38 : Modèle de la coopération entre MOZ et MLL dans l'activation de l'expression des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9*.

MOZ et MLL sont recrutés au niveau du promoteur des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9*. Ils modifient alors localement la chromatine grâce à leur activité enzymatique afin d'activer la transcription. MOZ interagit avec WDR5, un des membres du complexe cœur de MLL. Nous ne savons pas si les autres membres des complexes de MOZ ou de MLL interviennent dans cette coopération. Des facteurs de transcription sont certainement recrutés avec MOZ et MLL.

A. MOZ et MLL coopèrent dans la régulation des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9*

Nous avons démontré que MOZ et MLL s'associent fonctionnellement dans les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques humaines afin d'activer la transcription des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9* (Figure 38).

I. MOZ active directement l'expression des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9*

Avant nos travaux, MOZ était déjà considérée comme un co-activateur de l'expression des gènes *HOX*. En effet, d'une part les embryons nullizygotes pour *Moz* révèlent une diminution de leur expression (Katsumoto *et al.,* 2006; Voss *et al.,* 2009) et d'autre part, dans les leucémies impliquant des protéines de fusion de MOZ, une augmentation de l'expression des gènes *HOX* est observée (Camos *et al.,* 2006). Chez le Poisson-Zèbre, les anomalies homéotiques identifiées dans les mutants de *Moz* sont le fait d'une baisse de l'expression des gènes *Hox* (Miller *et al.,* 2004; Crump *et al.,* 2006). Cependant, il n'avait été rapporté jusqu'à présent aucune preuve du contrôle direct de MOZ sur ces gènes, puisque les anticorps commerciaux spécifiques ne permettent pas de réaliser des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. Nous avons donc fait synthétiser des anticorps dirigés contre MOZ performants en ChIP, à l'IGBMC (Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Illkirch). Ainsi, nous avons montré le recrutement de MOZ au niveau des promoteurs des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9* dans les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques humaines. Ce recrutement est diminué après inhibition de MOZ, provoquant une baisse de l'expression de ces gènes. Nous avons donc attesté le rôle direct de MOZ dans l'activation des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9*.

II. Une coopération fonctionnelle réciproque existe entre MOZ et MLL

En 2009, l'étude des souris invalidées pour *Moz* par l'équipe de Tim Thomas et d'Anne Voss a révélé que MOZ est un facteur essentiel de l'activation de nombreux gènes *Hox in vivo*. Les auteurs ont également démontré que le recrutement de Mll était dépendant de Moz (Voss *et al.,* 2009). Nos résultats corroborent leurs observations et étendent la mise en évidence de cette coopération fonctionnelle au niveau de l'hématopoïèse adulte humaine. De plus, l'absence de MLL au niveau des promoteurs des gènes *HOX* empêche le recrutement de MOZ, témoignant de la réciprocité de cette association. MOZ et MLL étant connus pour contrôler la transcription

d'autres gènes que les gènes *HOX*, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivies d'un séquençage détermineraient si le recrutement de MOZ et de MLL est spécifique des gènes *HOX* ou est applicable à d'autres promoteurs.

Une des hypothèses qui peut être émise afin d'expliquer le fait que MOZ et MLL sont nécessaires à leur recrutement réciproque repose sur l'observation que ces protéines fixent les histones comportant des modifications spécifiques. Moz est responsable de l'acétylation de la lysine 9 de l'histone H3 dans les embryons murins (Voss *et al.,* 2009). Nous avons montré que l'inhibition de MOZ résulte en une baisse de cette acétylation ainsi que celle de la lysine 14 de l'histone H3. Or, chez la Drosophile, la protéine Trithorax, homologue de MLL, est capable de se lier à l'histone H3 préférentiellement acétylée sur les lysines 9 ou 14 (Katsani *et al.,* 2001). En sus, l'activité histone méthyl-transférase de MLL est stimulée lorsque l'histone H3 est acétylée sur les lysines 9 ou 14 (Milne *et al.,* 2002). Ainsi, la baisse du recrutement de MLL et de la méthylation de la lysine 4 de l'histone H4 que nous observons après une inhibition de MOZ, pourrait s'expliquer par l'amoindrissement de l'acétylation des lysines 9 et 14 de l'histone H3. Nos résultats indiquent que MOZ est capable de se lier à l'histone H3 méthylée sur la lysine 4. Les domaines PHD sont considérés comme des domaines de reconnaissance des histones méthylées. Cependant, l'étude de ces domaines de MOZ avait révélé qu'ils fixaient l'histone H3 qu'elle soit non modifiée ou acétylée sur la lysine 14. La méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 provoque une baisse d'affinité entre les domaines PHD de MOZ et l'histone (Qiu *et al.,* 2012). Il semble donc que la reconnaissance de cette modification par MOZ ne soit pas due aux domaines PHD. L'étude de la fixation des mutants de MOZ dont nous disposons permettrait d'identifier le ou les domaines impliqués dans cette reconnaissance de la tri-méthylation de l'histone H3. Néanmoins, il est à noter que l'étude des domaines PHD de MOZ a été effectuée à partir de la synthèse *in vitro* de ces domaines isolés. Nous pouvons donc envisager que ces domaines, au sein de la protéine MOZ complète, ne présentent pas la même conformation, entraînant une différence d'affinité. ING5, un des composants du complexe tétramérique de MOZ a également la capacité de fixer l'histone H3 tri-méthylée sur la lysine 4 (Champagne *et al.,* 2008). Par conséquent, le recrutement affaibli de MOZ au niveau des promoteurs des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9* après inhibition de MLL pourrait résulter d'une diminution de l'interaction entre MOZ et son complexe avec les histones, qui ont perdu la méthylation de la lysine 4.

III. D'autres protéines sont impliquées dans la coopération entre MOZ et MLL

Comme indiqué dans la littérature, les activités enzymatiques de MOZ et de MLL sont dépendantes de complexes protéiques bien définis (Dou *et al.,* 2006; Doyon *et al.,* 2006). Nous avons montré que MOZ interagit avec WDR5, un des membres du complexe de MLL. Il semble donc que MOZ soit capable d'interagir non seulement avec MLL, mais aussi avec certains de ses partenaires. Par contre, nous n'avons pas déterminé si MLL peut interagir avec ceux de MOZ. Il serait donc intéressant d'établir si l'ensemble des membres des deux complexes en forment un plus important au niveau des promoteurs des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9*, ou si d'autres sont mis en œuvre.

MLL et MOZ sont également connues pour interagir avec d'autres protéines que celles présentes dans leur complexe enzymatique. En 2005, il a été montré que MLL coopère avec MOF, un homologue de MOZ. Les deux protéines forment un complexe et agissent de concert afin d'activer la transcription de différents gènes, dont *HOXA9* dans des fibroblastes murins (Dou *et al.,* 2005). Au sein de ce complexe, il est détecté une activité histone acétyl-transférase. L'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 peut être attribuée à MOF, connue pour réaliser cette modification. Néanmoins, il est également retrouvé une activité enzymatique d'acétylation sur les histones H3 et H2A, indiquant la présence d'une autre HAT dans le complexe. Nos travaux suggèrent que MOZ pourrait être une de ces HAT. Nous mettons en évidence que l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4 est diminuée après inhibition de *MOZ* ou de *MLL*. Bien que MOZ soit capable de réaliser cette modification *in vitro*, l'étude *in vivo* chez la Souris indique qu'elle ne serait responsable que de l'acétylation de la lysine 9 sur l'histone H3. Ainsi, il n'est pas à exclure que la perte de l'acétylation de la lysine 16 de l'histone H4, après l'inhibition de *MOZ* ou de *MLL* soit dépendante de MOF. Il serait intéressant de savoir si MOZ ou MOF sont situées dans divers complexes associés à MLL, ou si les trois protéines font partie du même super-complexe à activités enzymatiques multiples. A cette fin, de nouvelles expériences de purification de complexes devraient être effectuées.

MOZ et MLL interagissent avec différents facteurs de transcription afin de co-activer la transcription des gènes cibles. Dans le cadre de la régulation des gènes *HOX*, le ou les facteurs de transcription associés à MOZ et MLL ne sont pas encore connus. Les identifier aiderait à décrypter le mécanisme de contrôle par MOZ et MLL des gènes *HOX*. Parmi les facteurs de transcription essentiels à l'hématopoïèse, RUNX1 est connu pour interagir avec MOZ ou MLL

(Kitabayashi *et al.,* 2001; Huang *et al.,* 2011). Nous montrons que MLL et MOZ activent de manière synergique l'expression de *Mip1α*, un gène cible de RUNX1 (Bristow et Shore 2003). De plus, il a été suggéré que RUNX1 puisse être un régulateur de l'expression des gènes *HOX* durant l'hématopoïèse, bien que son rôle direct ne soit pas prouvé (Tsuzuki et Seto 2012). Il serait intéressant de déterminer si RUNX1 est recruté au niveau des promoteurs des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9* dans les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques humaines.

IV. Rôle de la coopération entre MOZ et de MLL dans la différenciation hématopoïétique et dans les leucémies associées à ces protéines

Nous avons mis en évidence qu'une déficience en MOZ ou MLL dans les cellules souches/progénitrices hématopoïétiques humaines $CD34^+$ provoque une diminution de leur capacité à former des colonies myéloïdes en culture semi-solide. Dans les modèles murins nullizygotes pour *Moz* ou *Mll*, des défauts de la différenciation hématopoïétique sont observés (Katsumoto *et al.,* 2006; Thomas *et al.,* 2006; Perez-Campo *et al.,* 2009). Nos résultats attestent que les fonctions de MOZ et de MLL sont conservées entre la Souris et l'Homme. Dans les souris présentant une abolition de l'activité HAT de Moz, l'altération de la différenciation hématopoïétique est due à un défaut dans la prolifération des progéniteurs (Perez-Campo *et al.,* 2009). Nous n'avons pas testé si la diminution du nombre de colonies myéloïdes que nous observons résulte d'un blocage de la différenciation ou d'une atteinte de la prolifération des cellules $CD34^+$. De plus, nous ne pouvons pas conclure si la baisse du nombre de colonies myéloïdes après l'inhibition seule de *Moz* ou de *Mll* est une conséquence de leur coopération fonctionnelle.

Nous pouvons également nous interroger sur les conséquences de la coopération fonctionnelle que nous avons mis au jour dans le développement des leucémies associées à MOZ et MLL. En effet, ces leucémies ont des profils d'expression semblables, se caractérisant entre autre par une forte expression de certains gènes *HOX*, activés par l'association des deux enzymes. Nous n'avons pas déterminé le domaine nécessaire à MLL pour son interaction avec MOZ. En revanche, nous avons établi que le domaine MYST de MOZ permet l'association avec MLL. Ce domaine est présent dans les protéines de fusion arborant des anomalies de MOZ. Il est donc probable que MLL puisse interagir avec celles-ci. Par des expériences d'immunoprécipitation, l'interaction éventuelle entre MOZ ou MLL avec les protéines de

fusion les impliquant pourrait être testée. De plus, l'utilisation de protéines chimériques comportant des délétions dans les domaines d'interaction avec MOZ ou MLL devrait démontrer si la perte de leur association qu'elles soient normales ou chimériques, peut affecter leur capacité transformante. Il a été rapporté par exemple que l'interaction entre MOZ-TIF2 et CBP, en délocalisant CBP de ses sites normaux d'activation, est nécessaire à l'activité leucémogène de MOZ-TIF2 (Kindle *et al.,* 2005). Les complexes moléculaires issus de translocations chromosomiques sont donc essentiels au développement leucémique.

B. Discussion et perspectives sur l'association entre MOZ, MLL et la Symplekin

Nous avons mis en évidence que la Symplekin interagit avec MOZ et MLL et qu'elle est co-recrutée avec ces co-régulateurs transcriptionnels au niveau du promoteur du gène *HOXA9*. Nous avons déterminé que la Symplekin réprime la transcription du gène *HOXA9* en empêchant le recrutement optimal de MOZ et de MLL sur son promoteur.

I. La Symplekin est nécessaire à la polyadénylation de l'ARN *Hoxa9*

Par des études *in silico*, nous avons identifié deux sites potentiels de polyadénylation sur l'ARN *Hoxa9*. Des expériences de PCR déterminant la longueur de la queue poly(A), ont montré que les deux sites sont polyadénylés. Chez l'Homme, 54% des transcrits possèdent plusieurs sites de polyadénylation (Tian *et al.,* 2005). L'inhibition de la Symplekin provoque une racourcissement drastique de la taille de la queue poly(A) des deux sites étudiés. L'altération de la polyadénylation peut expliquer la baisse de la quantité de protéine HOXA9 qui en résulte. Des techniques de « *ribosome profiling* » pourraient être mises en place afin de nous assurer que le taux de traduction est diminué et que ce ne soient pas d'autres mécanismes qui opèrent, tel que la dégradation par le protéosome. La polyadénylation étant fondamentale pour la stabilité des ARN, nous avons testé la dégradation de l'ARN *Hoxa9* après l'inhibition de la Symplekin. Un traitement à l'actinomycine D qui bloque la transcription (Bensaude 2011), permet d'étudier la durée de vie d'un ARN. Nous observons qu'avec une faible expression de la Symplekin, l'ARN *Hoxa9* est dégradé de manière plus forte et plus rapidement que dans les cellules contrôles. Ce résultat est donc en accord avec l'affaiblissement de la polyadénylation mis en évidence.

La Symplekin est décrite comme un facteur général de la polyadénylation (Mandel *et al.,*

2008). Cependant, nous n'avons pas noté de diminution du taux protéique de MOZ après inhibition de la Symplekin. De même, chez la Levure, l'absence de Pta1 provoque une baisse d'expression de certains membres du complexe de polyadénylation, mais pas de PAP (Zhao *et al.,* 1999). Plusieurs hypothèses expliqueraient ces observations. La première s'appuie sur l'existence de différents complexes de polyadénylation et sur le postulat que la Symplekin ne soit pas nécessaire dans tous. L'existence de complexes « alternatifs » au sein du noyau est envisageable, en cas d'absence d'un des membres de la machinerie de polyadénylation. La deuxième repose sur l'inhibition partielle de la Symplekin dans notre étude. En effet, nous estimons par quantification protéique qu'il en reste encore 20%. Les protéines restantes pourraient être recrutées sur certains sites particuliers afin d'assurer la polyadénylation de divers ARN. La troisième hypothèse est basée sur les mécanismes de compensation qui maintiendraient un niveau stable de certaines protéines, soit à travers l'induction de la transcription (que nous observons pour *HOXA9*, mais qui ne suffit pas à stabiliser son niveau protéique), soit par un blocage de la dégradation protéique.

II. La Symplekin empêche le recrutement de MOZ et de MLL au niveau du promoteur du gène *HOXA9*

Dans les cellules partiellement déficientes en Symplekin, les recrutements de MOZ et de MLL sont accrus. Ceci est corrélé à une augmentation des modifications d'histones catalysées par ces enzymes, connues pour être activatrices de la transcription. Nous expliquons ainsi que la quantité d'ARN globale *Hoxa9* reste constante, malgré une plus forte dégradation de l'ARN. Afin de tester l'élévation du niveau de la transcription, l'utilisation d'une technique permettant de mesurer directement la production d'ARN néo-synthétisés, comme le « *nuclear run-on* », a été envisagée. Ces expériences n'ayant pas abouti du fait de difficultés techniques, nous avons examiné le recrutement de la forme phosphorylée au niveau des sérines 5 du CTD de l'ARN polymérase II. Cette modification est associée à l'initiation de la transcription (Sims *et al.,* 2004). L'inhibition de la Symplekin conduit à l'augmentation de son recrutement sur le promoteur de *HOXA9*. De ce fait, nous estimons que le recrutement accru de MOZ et de MLL au niveau du promoteur du gène *HOXA9* est effectivement associé à une hausse de la transcription. Ainsi, la Symplekin est un inhibiteur du recrutement de MOZ et de MLL au niveau du promoteur du gène *HOXA9*, conduisant à un blocage partiel de sa transcription dans les cellules hématopoïétiques immatures.

HOXA9 est un des facteurs de transcription essentiels au contrôle des CSH. Son gène est à la fois fortement exprimé dans les cellules hématopoïétiques très immatures et réprimé au cours de la différenciation hématopoïétique (Sauvageau *et al.,* 1994). Nos travaux établissent que les recrutements de MOZ et MLL sont partiellement bloqués par la Symplekin au niveau du promoteur d'*HOXA9* dans les cellules KG1. Ces cellules ont été utilisées puisqu'elles représentent un modèle de cellules immatures hématopoïétiques humaines portant le marqueur CD34. Cependant, elles se différencient spontanément en cellules myéloïdes. Ce processus de différenciation peut laisser envisager que le taux d'*HOXA9* soit déjà faible comparé à celui de cellules plus immatures. Dans les cellules souches hématopoïétiques isolées à partir de sang de cordon, le recrutement de la Symplekin sur le promoteur du gène *HOXA9* devrait être examiné. Dans ces cellules, l'expression d'*HOXA9* étant maximale, il est possible que la Symplekin ne soit pas recrutée. De plus, nous pourrions suivre sa fixation potentielle sur le promoteur du gène *HOXA9* au cours de la différenciation, expliquant ainsi la répression observée.

HOXA9 est un des gènes clefs de la leucémogenèse impliquant les protéines de fusion MOZ et MLL (Ayton et Cleary 2003; Camos *et al.,* 2006). Puisque la Symplekin est un répresseur du gène *HOXA9* s'opposant aux fonctions de MOZ et de MLL, nous pouvons nous interroger sur son rôle dans la leucémogenèse. Dans le cadre de cette investigation, des cellules KG1 surexprimant les protéines chimériques comprenant MOZ ou MLL, ou des cellules de patients atteints de leucémies pourraient être utilisées. Des expériences d'immunoprécipitation des protéines de fusion contenant MOZ ou MLL détermineraient si la Symplekin est capable d'interagir avec celles-ci. En outre, des expériences de ChIP indiqueraient si la Symplekin est toujours recrutée au niveau du promoteur du gène *HOXA9* en présence des protéines chimériques. Il se pourrait que ces protéines anormales empêchent le recrutement de la Symplekin, limitant ainsi la répression transcriptionnelle au niveau du locus du gène *HOXA9*. Ainsi, la surexpression de *HOXA9* pourrait s'expliquer, non pas par le biais de modifications épigénétiques anormales, comme souvent suggéré, mais du fait du recrutement altéré de partenaires protéiques nécessaires à la répression. La consultation de la base de donnée SAGE a révélé que la Symplekin est surexprimée dans différents cas de tumeurs solides. Dans les cancers colorectaux, cette surexpression est responsable de l'activation transcriptionnelle de la Claudine-2, conduisant à une polarisation cellulaire et à la tumorigenèse (Buchert *et al.,* 2010). Il serait intéressant d'étudier le niveau d'expression de la Symplekin et son recrutement sur différents gènes cibles, dans différents cas de leucémies impliquant ou non MOZ et MLL, afin de déterminer si son expression affecte les processus leucémogènes selon la translocation

chromosomique.

III. Coordination entre la transcription et les différentes étapes de la maturation des ARN

L'ensemble des étapes de la maturation des ARN se déroule en association avec la transcription. Cette coopération est due à l'interaction entre le CTD de l'ARN polymérase II avec différents membres des machineries de maturation (Hsin et Manley 2012). MOZ et MLL interagissent avec un membre du complexe de la polyadénylation, mais dans un contexte de répression transcriptionnelle. Ayant mis en évidence l'interaction de MOZ avec CPSF, le rôle de MOZ dans la polyadénylation est dès lors envisageable. Nous avons constaté que l'inhibition de MOZ ne modifie pas la taille de la queue poly(A) de l'ARN *Hoxa9*, suggérant l'absence de participation de MOZ à la polyadénylation des ARN malgré sa présence avec différents membres de cette machinerie.

Néanmoins, l'association de MOZ et MLL avec les autres complexes de maturation des ARN responsables de l'ajout de la coiffe sur l'extrémité 5' des ARN ou de l'épissage est envisageable. Afin d'identifier des protéines qui interagissent uniquement avec MOZ, c'est-à-dire pas avec MORF, nous avons utilisé le système double-hybride chez la Levure avec le domaine PQ de MOZ comme appât. La principale différence entre MOZ et son homologue MORF réside dans l'absence du domaine PQ dans MORF. Le criblage d'une banque d'ADNc issus d'ARN extraits à partir de cellules de moelle osseuse humaine nous a permis d'identifier plusieurs protéines dont TLS/FUS (*translocated in liposarcoma/fused in sarcoma*). Cette protéine est impliquée dans l'épissage des ARN néo-synthétisés (Yang *et al.,* 1998) et est également connue pour activer la transcription des gènes en association avec des récepteurs nucléaires aux hormones (Zinszner *et al.,* 1997). TLS/FUS est retrouvée dans un gros complexe comprenant les machineries de transcription et d'épissage. En son sein, TLS/FUS interagit avec l'ARN polymérase II. De manière intéressante, TLS/FUS interagit aussi avec Spi-1/PU.1, ce qui a pour conséquence de modifier les sites préférentiels d'épissage des ARN (Hallier *et al.,* 1998; Delva *et al.,* 2004). Spi-1/PU.1 est l'un des facteurs de transcription pour lequel MOZ est co-activateur (Aikawa *et al.,* 2010). De plus, les modifications d'histones sont essentielles pour la reconnaissance des introns et des exons. Certaines enzymes modifiant les histones sont recrutées à des sites spécifiques de la chromatine du fait de leur interaction avec les membres de l'épissosome (Brown *et al.,* 2012). Il est donc envisageable que MOZ participe à l'épissage

alternatif en modifiant la chromatine le long de certains gènes cibles de Spi-1/PU.1, du fait de possibles interactions entre MOZ, Spi-1/PU.1 et TLS/FUS.

C. Conclusion

Ce projet de recherche s'inscrit dans le cadre de la caractérisation de la régulation transcriptionnelle lors de l'hématopoïèse. Nos travaux ont apporté de nouvelles connaissances fondamentales quant à la compréhension des mécanismes d'action de MOZ et de MLL, deux enzymes modifiant les histones. En effet, malgré de nombreuses études sur ces protéines, du fait de leur implication majeure dans le développement leucémique, peu d'informations sur leur fonction dans les cellules souches/progénitrices humaines étaient à notre disposition.

La première partie de cette étude a permis de montrer que MOZ et MLL coopèrent afin d'activer la transcription des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9*. La régulation de gènes cibles communs et des profils d'expression similaires trouvés dans les leucémies les impliquant, ont suggéré une association fonctionnelle entre MOZ et MLL, deux enzymes modifiant les histones. Le « code histone » est une théorie née au début des années 2000, qui explique qu'une modification post-traductionnelle d'histone n'a de signification biologique qu'à travers son association avec les modifications qui l'entoure (Jenuwein et Allis 2001). Ceci s'expliquerait par le fait que les protéines reconnaissant les modifications d'histones, seules ou au sein de complexes multi-protéiques, ont des affinités variables selon la combinaison de modification d'histones. Ainsi, le recrutement de complexes effecteurs (activateurs ou répresseurs de la transcription par exemple) est dépendant de la combinaison de modifications d'histone à un locus donné (Rando 2012). De plus, les marques d'histones sont dépendantes les unes par rapport aux autres. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 facilite l'acétylation de la lysine 14 par l'HAT Gcn5 (Lo *et al.,* 2000). Nos travaux démontrent que le recrutement de MLL, et la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 qui s'ensuit, est dépendant de celui de MOZ, par conséquent de l'acétylation des lysines 9 et 14 de l'histone H3, et réciproquement. Une nouvelle association fonctionnelle entre deux modifications d'histone a donc été révélée, participant ainsi à une meilleure compréhension des modifications épigénétiques et de leur association. Certaines équipes de recherche considèrent que les prochains travaux en épigénétiques devraient se consacrer à la mise en évidence des différents réseaux de modifications d'histones (Guan *et al.,* 2013; Lau et Cheung 2013). Priscillia Nga Leng Lau et ses collaborateurs proposent ainsi une technique identifiant les modifications

associées à la phosphorylation de la sérine 28 de l'histone H3 produite par l'enzyme MSK1 (*mitogen- and stress-activated protein kinase 1*). Cette technique consiste à surexprimer l'histone H3 fusionnée à la séquence Avitag, qui est le site de reconnaissance impliquée dans la biotinylation catalysée par l'enzyme BirA. L'enzyme BirA, sous forme la fusionnée à MSK1, est surexprimée dans les cellules étudiées. Ainsi, les histones phosphorylées par MSK1 sont également biotinylées par BirA, ce qui permet leur purification. Les histones associées sont alors séquencées afin d'analyser les modifications post-traductionnelles subies. Cette technique pourrait être utilisée dans le cadre de l'étude de MOZ et de MLL pour déterminer si l'association que nous avons mise en évidence est retrouvée le long du génome et si d'autres modifications d'histones sont également associées à ce complexe. Nos résultats apportent la preuve que le recrutement de deux enzymes modifiant les histones peut être couplé, expliquant au moins partiellement comment une combinaison d'histone est trouvée à un endroit donnée du génome. Néanmoins, nous ne connaissons pas le ou les facteurs responsables du recrutement initial de MOZ et de MLL au niveau des promoteurs des gènes *HOXA5*, *HOXA7* et *HOXA9*.

Dans une seconde partie, nous mîmes en évidence le rôle répresseur de la Symplekin, un membre de la polyadénylation des ARN, dans la coopération entre MOZ et MLL. Ainsi, la Symplekin empêche le recrutement optimal de MOZ et de MLL au niveau du promoteur du gène *HOXA9*. De nombreuses études ont mis en évidence que la transcription et les étapes de maturation de l'ARN sont inter-connectées et peuvent agir les unes sur les autres de manière bi-directionnelle. Certains facteurs sont impliqués dans les différents processus, le plus révélateur étant certainement l'ARN polymérase II (ARN polII) qui s'avère être un membre clef de la polyadénylation et de l'épissage (Lenasi et Barboric 2013). Deux modèles sont envisagés afin d'expliquer cette coordination. Le premier est basé sur le fait que selon le cycle moléculaire de l'ARN PolII, c'est-à-dire selon les modifications du CTD, différents complexes de maturation sont recrutés et activés. Le second postule que la vitesse d'élongation détermine l'action de ces complexes. Par exemple, celui-ci est plus lent au niveau des exons que des introns, ce qui permettrait à la machinerie d'épissage de sélectionner les exons. Les membres des complexes de maturation sont en retour capables de moduler la transcription. Dans la majorité des cas décrits, une action positive sur la transcription est notée. Cependant, certains membres des différentes étapes de la maturation des ARN peuvent inhiber la transcription. Par exemple, deux membres de l'ajout de la coiffe des ARN, Ceg1p et Cet1p, répriment la réinitiation de la transcription chez la Levure. Il s'agirait ici d'un point de contrôle moléculaire afin de synthétiser de nouveaux transcrits que lorsque les précédents sont correctement coiffés. Nos

travaux suggèrent un rôle de répression par la transcription de la Symplekin, en bloquant le recrutement des enzymes épigénétiques MOZ et MLL au niveau du promoteur du gène *HOXA9*. Nous avons ainsi caractérisé un nouveau mécanisme d'inhibition de la transcription par un membre d'une des machineries de maturation des ARN. La Symplekin avait déjà été décrite comme agissant en tant que co-répresseur transcriptionnel, ceci lorsqu'elle est associée au facteur de transcription ZONAB. Dans ce contexte, les deux protéines répriment la transcription des gènes *ERB2* (*Estrogen receptor beta 2*) et *RUNX1* (Kavanagh *et al.,* 2006; Buchert *et al.,* 2009). Dans le premier rapport, les auteurs montrèrent que la déplétion de la Symplekin provoque une relocalisation cytoplasmique de ZONAB. Ainsi, la Symplekin est essentielle à la fonction de ZONAB au moins partiellement, à travers le contrôle de sa localisation nucléaire. L'un des éléments majeurs dans la compréhension du mécanisme que nous avons mis en évidence serait d'expliquer comment la Symplekin empêche le recrutement optimal de MOZ et de MLL au niveau du promoteur du gène *HOXA9*. Une des pistes à explorer correspond à l'étude différents facteurs précédemment décrits, réprimant la transcription de *HOXA9*. Parmi eux, sont retrouvés le membre du complexe Polycomb 2, EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*), qui du fait de son activité de méthylation sur la lysine 27 de l'histone H3 réprime l'expression des gènes *HOXA* dont *HOXA9* (Cao et Zhang 2004; Nagel *et al.,* 2010). SCMH1 (*Sex comb on midleg homolog 1*), une E3 ubiquitine ligase cruciale pour le maintien de la quiescence des CSH, est un autre répresseur de la transcription d'*HOXA9*. Dans les souris nullizygotes pour *Scmh1*, le niveau d'expression de *Hoxa9* est augmenté (Yasunaga *et al.,* 2013). Un dernier exemple correspond à Cyp_{33} ($Cyclophilin_{33}$), une peptidyl-prolyl isomérase-*cis-trans* qui se lie au domaine PHD de MLL, bloquant ainsi sa fixation au niveau de ses gènes cibles, notamment *HOXA9* (Park *et al.,* 2010). En conséquence, l'interaction entre la Symplekin et ces facteurs de co-répression transcriptionnelle pourrait être testée, ainsi que leur localisation ou leur recrutement au niveau du promoteur du gène *HOXA9*, après inhibition de la Symplekin, ce qui participerait à l'élucidation du rôle de la Symplekin en tant que répresseur.

Les différentes études menées sur la Symplekin révèlent son rôle ambivalent sur la transcription. Nous ne sommes pas actuellement en mesure de comprendre les raisons de cette ambivalence. Les modifications post-traductionnelles sont importantes dans le contrôle des fonctions protéiques. Ainsi, la Symplekin doit être sumoylée afin que la polyadénylation soit efficace (Vethantham *et al.,* 2007). En outre, il a été montré que la phosphorylation de Pta1 inhibe la polyadénylation (He et Moore 2005). La Symplekin interagit avec MOZ, une HAT capable d'acétyler d'autres cibles que les histones, comme BRPF1 ou RUNX1 (Kitabayashi *et*

al., 2001; Ullah *et al.,* 2008). Nous ne pouvons donc pas exclure que MOZ puisse modifier post-traductionnellement la Symplekin. Par des expériences d'immunoprécipitation, nous avons mis en évidence l'acétylation de la Symplekin. Nous n'avons pas d'éléments sur la responsabilité de MOZ dans cette acétylation. Des expériences d'acétylation *in vitro* doivent donc être menées. L'acétylation de la Symplekin pourrait expliquer son ambivalence fonctionnelle avec d'une part son rôle d'activateur de la transcription et de moteur de l'association entre la transcription et la polyadénylation, et d'autre part son activité de répresseur de la transcription (Buchert *et al.,* 2009). Chez la Levure, Pta1 interagit avec Ssu72 ce qui permet la formation d'une boucle d'ADN (« *gene looping* ») essentielle à l'efficacité de la transcription (Ansari et Hampsey 2005). L'interaction entre la Symplekin et SSU72 induit le camouflage du domaine de la Symplekin qui inhibe la PAP. La lysine 185 de la Symplekin s'avère nécessaire à cette association (Xiang *et al.,* 2010). Si cette lysine représente une cible de modification post-traductionnelle, il est possible que l'interaction entre la Symplekin et SSU72 soit abrogée. Ainsi, des modifications post-traductionnelles de la Symplekin, dépendantes de protéines associées au niveau des promoteurs ciblés, pourraient expliquer ses différentes fonctions. Des expériences de séquençage protéique en spectrométrie de masse sont en cours et détermineront peut-être la ou les lysines acétylées sur la Symplekin. Des mutants mimant l'acétylation (lysine modifiée en glutamine) ou à l'inverse reproduisant la forme non acétylée de la protéine (lysine changée en arginine) seront ensuite synthétisés. De cette manière, l'influence de l'acétylation de la Symplekin sur son rôle dans la polyadénylation, son recrutement sur des promoteurs ou son association avec différents partenaires tels que SSU72, ZONAB, MOZ ou MLL sera caractérisée.

ANNEXES

Liste des publications

Article 1

Crosstalk between leukemia-associated proteins MOZ and MLL regulates HOX gene expression in human cord blood CD34+ cells.

Paggetti J*, **Largeot A***, Aucagne R, Jacquel A, Lagrange B, Yang XJ, Solary E, Bastie JN, Delva L *Equal contribution

Oncogene. 2010;29(36):5019-31

Article2

Symplekin, a polyadenylation factor, prevents MOZ and MLL activity on HOXA9 in hematopoietic cells

Largeot A, Paggetti J, Broséus J, Aucagne R, Lagrange B, Martin RZ, Quéré R, Berthelet J, Lucchi G, Ducoroy P, Bastie JN, Delva L

BBActa Mol. Cell Res., En attente d'une seconde soumission après révision

Article 3

Transcription intermediary factor 1γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia

Aucagne R, Droin N, Paggetti J, Lagrange B, **Largeot A**, Hammann A, Bataille A, Martin L, Yan KP, Fenaux P, Losson R, Solary E, Bastie JN, Delva L

J. Clin. Invest. 2011;121(6):2361-70.

Article 4

A role for miR-142-3p in colony-stimulating factor 1-induced monocyte differentiation into macrophages

Lagrange B, Martin RZ, Droin N, Aucagne R, Paggetti J, **Largeot A**, Itzykson R, Solary E, Delva L, Bastie JN

BBActa Mol. Cell Res. 2013;1833(8):1936-46

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213

Research article

Transcription intermediary factor 1γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia

Romain Aucagne,[1,2] Nathalie Droin,[3] Jérôme Paggetti,[1,2] Brice Lagrange,[1,2] Anne Largeot,[1,2] Arlette Hammann,[1,2,4] Amandine Bataille,[2,5] Laurent Martin,[6] Kai-Ping Yan,[7] Pierre Fenaux,[8] Régine Losson,[7] Eric Solary,[3] Jean-Noël Bastie,[1,2,9] and Laurent Delva[1,2]

[1]Inserm UMR 866, University of Burgundy, Dijon, France. [2]IFR "Santé-STIC," University of Burgundy, Dijon, France. [3]Inserm UMR 1009, Integrated Research Cancer Institute Villejuif (IRCIV), Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. [4]Flow Cytometry Facility, [5]Cellular Imagery Facility, and [6]Department of Pathology, University Hospital, Dijon, France. [7]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Department of Functional Genomics, CNRS UMR 7104, Inserm U964, Louis Pasteur University, Collège de France, Illkirch, France. [8]University Hospital, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP) and University of Paris 13, Bobigny, France. [9]University Hospital, Clinical Hematology Department, Dijon, France.

Transcription intermediary factor 1γ (TIF1γ) was suggested to play a role in erythropoiesis. However, how TIF1γ regulates the development of different blood cell lineages and whether TIF1γ is involved in human hematological malignancies remain to be determined. Here we have shown that TIF1γ was a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia (CMML). Loss of *Tif1g* in mouse HSCs favored the expansion of the granulo-monocytic progenitor compartment. Furthermore, *Tif1g* deletion induced the age-dependent appearance of a cell-autonomous myeloproliferative disorder in mice that recapitulated essential characteristics of human CMML. TIF1γ was almost undetectable in leukemic cells of 35% of CMML patients. This downregulation was related to the hypermethylation of CpG sequences and specific histone modifications in the gene promoter. A demethylating agent restored the normal epigenetic status of the *TIF1G* promoter in human cells, which correlated with a reestablishment of TIF1γ expression. Together, these results demonstrate that *TIF1G* is an epigenetically regulated tumor suppressor gene in hematopoietic cells and suggest that changes in TIF1γ expression may be a biomarker of response to demethylating agents in CMML.

Introduction

TIF1γ (also known as tripartite motif protein TRIM33) is an ubiquitous nuclear protein that belongs to the transcriptional intermediary factor 1 family (1). Four TIF1 family members (α to δ) have been identified in mammals, and orthologs are present in organisms such as *Drosophila* (1–6). TIF1α (also known as TRIM24) interacts with nuclear receptors and modulates their transcriptional activity either positively or negatively in a ligand-dependent fashion (5, 7). In mice, TIF1α functions as a liver-specific tumor suppressor whose deletion reveals the deleterious effect of retinoic acid receptor α aberrant activation to liver homeostasis (8). TIF1β, a component of the histone deacetylase N-CoR1/HDAC3 complex (9), functions as a corepressor for the large family of Krüppel-associated box (KRAB) zinc finger transcription factors (3, 10) and is required for post-implantation embryogenesis and mesoderm induction (11). TIF1δ is involved in heterochromatin-mediated gene silencing (4). Human and mouse *TIF1G* is closely related to zebrafish moonshine (*mon*), a gene whose mutations disrupt embryonic and adult hematopoiesis with severe red blood cell aplasia (12). Targeted deletion of *Tif1g* is embryonic lethal in mice (13, 14). In zebrafish and human CD34$^+$ cells, TIF1γ functionally links positive elongation factors such as p-TEFb and FACT to blood-specific transcription complexes (e.g., the SCL/TAL1 complex) to regulate elongation of genes by antagonizing RNA polymerase II (RNA Pol II) pausing (15). TIF1γ also affects the human hematopoietic progenitor cell response to the cytokines of the TGF-β superfamily through various mechanisms (14, 16–18).

To further explore the role of TIF1γ in hematopoiesis, we examined the effects of hematopoietic tissue–targeted deletion of *Tif1g* in mice. *Tif1g* deletion affects the transition from very primitive progenitors (i.e., LT-HSC population) to common myeloid progenitors and leads to a selective expansion of granulo-monocytic progenitors. This effect correlates with an inhibition of the hematopoietic progenitor cell response to TGF-β and provokes the age-dependent appearance of a cell-autonomous phenotype that recapitulates important features of human chronic myelomonocytic leukemia (CMML). Interestingly, a downregulation of *TIF1G* gene expression is observed in hematopoietic cells of approximately 35% of patients with CMML. While no inactivating mutations were identified, a low level of TIF1γ expression in CMML cells was related to the hypermethylation of the gene promoter, and the expression of TIF1γ was reestablished after treatment with the demethylating agent decitabine, suggesting that changes in TIF1γ expression may be a biomarker of CMML response to demethylating agents. Together, the results indicate that TIF1γ is a key regulator of HSC fate that behaves as a tumor suppressor gene.

Results

The Tif1g deletion affects hematopoietic progenitor populations in mice. To obtain further insights into the contribution of TIF1γ to adult hematopoiesis, and in particular HSCs, we generated mice selec-

Authorship note: Romain Aucagne, Nathalie Droin, Jean-Noël Bastie, and Laurent Delva contributed equally to this work. Régine Losson is deceased.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J Clin Invest.* 2011;121(6):2361–2370. doi:10.1172/JCI45213.

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213

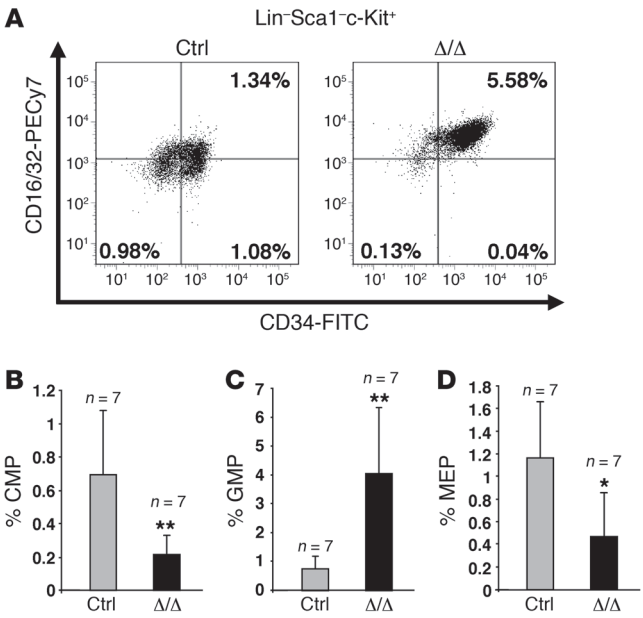


Figure 1

The *Tif1g* deletion affects hematopoietic progenitor populations in mice younger than 6 months. (**A**) Representative FACS staining profiles of the progenitor populations, including CMPs (lower right panel), MEPs (lower left panel), and GMPs (upper right panel), from the respective control (Ctrl) or $Tif1g^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mice. Calculation of the numbers and percentages of each of the populations was based on the number of living cells. The number of CMPs and MEPs decreased, whereas the number of GMPs increased. Analysis of control and $Tif1g^{\Delta/\Delta}$ mice demonstrated a decrease in CMPs (**B**), an increase in GMPs (**C**), and a decrease in MEPs (**D**) in $Tif1g^{\Delta/\Delta}$ mice. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

tively deficient for Tif1γ by breeding floxed *Tif1g* mice ($Tif1g^{fl/fl}$) (19) with *cFES*-Cre transgenic animals (ref. 20 and Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI45213DS1). In litters from crosses between $Tif1g^{fl/fl}$ mice and *cFES*-Cre transgenic animals, *cFES-Cre;*$Tif1g^{fl/fl}$ ($Tif1g^{\Delta/\Delta}$) mice correspond to the hematopoietic tissue–restricted knockout mice, whereas $Tif1g^{fl/fl}$ mice represent controls (Supplemental Figure 1A). Although *Tif1g*-null mice invariably died perinatally (13, 14), $Tif1g^{\Delta/\Delta}$ mice reached adulthood and were fertile. As expected, the deletion of *Tif1g* floxed alleles was observed in hematopoietic organs and cells, including long-term HSCs (LT-HSCs) (Supplemental Figure 1, B and C, and ref. 20), and was associated with a low expression of *Tif1g* at both the RNA and protein levels in the hematopoietic organs (Supplemental Figure 1, D and E).

Mice younger than 6 months old did not display any macroscopic and blood peripheral abnormalities (data not shown). Nevertheless, the proportion of granulocyte/monocyte progenitors (GMPs; Lin⁻Sca-1⁻c-Kit⁺CD34⁺CD16/32⁺) was increased (~400%) at the expense of common myeloid progenitors (CMPs; Lin⁻Sca-1⁻c-Kit⁺CD34⁺CD16/32⁻; ~50%) and megakaryocyte-erythroid progenitors (MEPs; Lin⁻Sca-1⁻c-Kit⁺CD34⁻CD16/32⁻; ~60%) (Figure 1). A significant increase in the Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ (LSK) fraction was also observed (Figure 2, A and B), including an increase in the proportion of short-term HSCs/multipotent progenitors (ST-HSCs/MPPs; LSK CD34⁺) (Figure 2, C and D) and a decrease in the fraction of primitive LSK (long-term reconstituting HSCs [LT-HSCs]) identified on the "SLAM code" (signaling lymphocyte activation molecule: CD150⁺CD48⁻) (ref. 21 and Figure 2, E and F). These data demonstrate that TIF1γ is a key regulator of HSC fate.

$Tif1g^{\Delta/\Delta}$ mice develop a CMML-like myeloproliferative disease with monocytic features. Mice older than 6 months developed a progressive hyperleukocytosis (data not shown). Although the number of MEPs was decreased, there were no obvious signs of anemia before or after the onset of the disease (Supplemental Figure 2A). The number of Ter119⁺CD71⁺ erythroid progenitors was slightly decreased in the bone marrow, while it is increased in the spleen (Supplemental Figure 2B). Morphologic analysis of peripheral blood identified Howell-Jolly bodies and stomatocytes in mice older than 6 months (Supplemental Figure 2C). The progressive hyperleukocytosis observed was due to the accumulation of monocytes (Figure 3A), which was confirmed by FACS analysis (Gr1^{lo}Mac1⁺ cells) (Figure 3B). Bone marrow examination showed an accumulation of monocytes (Figure 3, C and D), which was also observed in the spleen and in the liver (Figure 3, D–H), leading to a severe hepatosplenomegaly (Supplemental Figure 3A). The splenic organization was destroyed (Figure 3E) by mature highly proliferative Mac1⁺ cells (Figure 3, F and G) that invaded the red pulp (Supplemental Figure 3B). Immature hematopoietic cells including erythroblast cells were observed in the spleen (not shown), and the liver was also infiltrated by highly proliferative cells (Figure 3H). Kinetics of hematopoietic recovery after sublethal irradiation of control or $Tif1g^{\Delta/\Delta}$ mice did not reveal another lineage specificity of *Tif1g* deletion, i.e., these mice recovered normally and accumulated monocytes in their blood and spleen when progressing in age (data not shown).

$Tif1g^{\Delta/\Delta}$ myeloproliferative disease is transplantable into secondary recipients. Mice transplanted with $Tif1g^{\Delta/\Delta}$ bone marrow cells from 4-month-old mice (phenotypically normal) survived lethal irradiation, indicating the reconstitution of hematopoiesis. Two months after transplantation, *Tif1g*-deleted cells were detected by quantitative PCR (Q-PCR) in the peripheral blood of the transplanted mice (Supplemental Figure 4A), this deletion being correlated to the decreased expression of *Tif1g* mRNA (data not shown). These observations suggested that the deletion occurred in HSCs. Two months after transplantation, the mice developed the same myeloproliferative disease (i.e., monocytosis, hepatosplenomegaly) (data not shown), supporting the notion that the phenotypic effects of the *Tif1g* deletion were cell autonomous. We observed an increased number of Gr1^{lo}Mac1⁺ cells in the bone marrow and in the spleen (Supplemental Figure 4C) and an augmentation of the LSK fraction in $Tif1g^{\Delta/\Delta}$ mice compared with control littermates (Supplemental Figure 4D). The abnormal distribution and frequency of progenitors were also reproducible (Supplemental Figure 4E). A second transplantation into lethally irradiated recipients reproduced the same disorder after 2 months (data not shown). We performed reciprocal transplant experiments in which wild-type donor cells were transplanted into either control or $Tif1g^{\Delta/\Delta}$ mutant recipients. We did not observe any alteration in the distribution of LSK (Supplemental Figure 4F) and progenitors (CMPs, GMPs, MEPs) (Supplemental Figure 4G) in the $Tif1g^{\Delta/\Delta}$ mutant recipients. These observations indicate that the disease generated by the deletion of *Tif1g* is initiated from the HSC compartment and is cell autonomous.

The hematopoietic cell response to TGF-β is inhibited in $Tif1g^{\Delta/\Delta}$ mice. TIF1γ was identified as part of the TGF-β signaling pathway, including its E3 ubiquitin ligase activity on Smad4 (16–18, 22).

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213

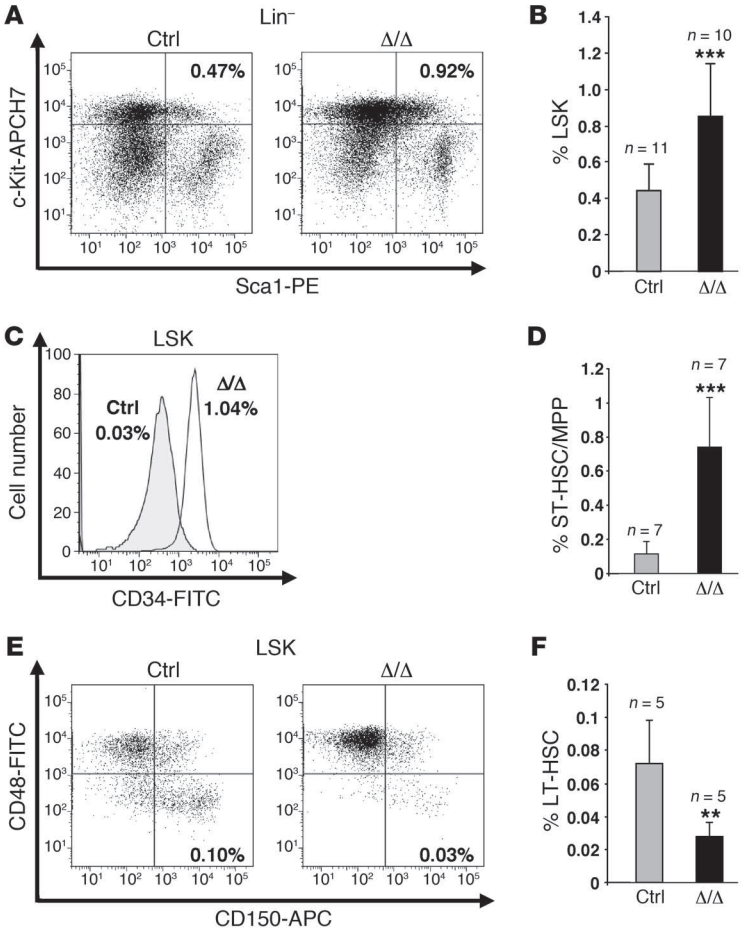


Figure 2

The *Tif1g* deletion affects HSCs in mice younger than 6 months. (**A** and **B**) Analysis of LSK cells from representative control and healthy *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice demonstrated an increase in the LSK population in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice. (**C** and **D**) Analysis of ST-HSCs/MPPs from representative control and *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice demonstrated an increase in ST-HSCs/MPPs in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice. (**E** and **F**) Analysis of LT-HSCs from representative control and *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice demonstrated a decrease in the LT-HSC population in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

Tif1g-deficient LSK CD34$^+$ cells (ST-HSCs/MPPs) were cultured in the presence or absence of TGF-β and TGF-β inhibitor (Figure 4, A and B). Stimulation with TGF-β dramatically (~80%) reduced the formation of myeloid cells from control LSK CD34$^+$ cells as compared with untreated cultures, whereas it only slightly decreased (~25%) myelopoiesis of *Tif1g*-deficient cells (Figure 4, A and B). We also treated i.p. 6-month-old *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ or control mice with either PBS or 15 mg/kg of a neutralizing pan–TGF-β monoclonal antibody that blocks all 3 TGF-β mammalian isoforms (TGF-β1, -β2, and -β3) (23, 24). Treatment was administered once a week for 5 weeks, when the mice were sacrificed and evaluated for hematopoietic progenitor populations. In control mice, treatment with 2G7 induced an increase in the number of LSK (Figure 4C) and ST-HSCs/MPPs (Figure 4D), whereas the antibody did not affect the distribution of these cells in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice. We conclude that *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ HSCs escape to the effect of TGF-β1–β3 cytokines.

The Tif1g deletion affects Csf1r expression in mice. We next tested whether Tif1γ could regulate expression of *Csf1r* (*M-CSFR*), *Csf3r* (*G-CSFR*), and *Csf2ra* (*GM-CSFR*), 3 genes known to participate in monocyte or granulocyte differentiation. Unlike *Csf3r* and *Csf2ra*, *Csf1r* expression was significantly decreased by the lack of Tif1γ (Supplemental Figure 5, A and B), which could account for the altered production of peritoneal macrophages observed in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice (Supplemental Figure 5C). These *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ macrophages did not adhere to the plastic and were morphologically abnormal in vitro (Supplemental Figure 5D). The plasma levels of M-CSF (CSF-1) and G-CSF remained unchanged in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ compared with control mice (Supplemental Figure 5E).

TIF1G is downregulated in a subset of chronic myelomonocytic leukemia patients. CMML is a heterogeneous disease with regard to molecular abnormalities. Our mouse data prompted us to investigate the expression of TIF1γ in peripheral blood monocytes sorted from a cohort of 60 patients with CMML (Supplemental Table 1). The transcript was almost undetectable in 21 of the 60 patients (35%) (Figure 5A). Immunocytochemical analysis identified a decrease in the expression of the protein in monocytes and neutrophils of these patients (Figure 5B). The decreased expression in *Csf1r* expression identified in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mouse cells (Supplemental Figure 5) was confirmed in CMML cells, in which it was strongly correlated with a low level of *TIF1G* ($r = 0.915$) (Figure 5C).

TIF1G is an epigenetically regulated tumor suppressor gene in chronic myelomonocytic leukemia. Sequencing of all the *TIF1G* exons in the monocytes of a cohort of 66 CMML patients (Supplemental Table 2) with various TIF1γ mRNA and protein levels failed to identify any mutation in the coding sequence (data not shown). We analyzed by direct sequencing the bisulfite-modified *TIF1G* promoter sequence in CMML and health donor monocytes. The *TIF1G* promoter of CMML patients expressing low levels of TIF1γ was methylated, while none of the DNA from normal monocytes nor a CMML monocyte sample with normal *TIF1G* mRNA level showed any detectable methylation (Figure 6A and Supplemental Figure 6). Thus, low expression of TIF1γ in CMML cells correlates with *TIF1G* promoter hypermethylation. Histone modifications, which are highly related to the epigenetic status of DNA, may be correlated with gene expression levels (25). The decrease in *TIF1G* gene expression observed in normal human monocytes upon M-CSF exposure for 1 day was correlated with a specific pattern of histone modification (acetylations and methylations) on the *TIF1G* gene promoter (Figure 6B). A similar pattern that suggests the inactive form of the promoter was observed in CMML cells harboring very low levels of TIF1γ, whereas those with normal TIF1γ expression levels displayed a pattern similar to the active form of the promoter observed in untreated normal human monocytes (Figure 6B).

A 3-day exposure of the peripheral blood monocytes from CMML patients to decitabine, a demethylating agent that has demonstrated some efficacy in the treatment of CMML (26), restored *TIF1G* expression in the cells in which its levels were initially downregulated (Figure 7A). TIF1γ expression was also reestablished in the peripheral blood monocytes of a CMML patient who responded to decitabine in vivo (Figure 7, B and C). Cytosine methylation in the *TIF1G* promoter sequence identified in the monocytes of these

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213

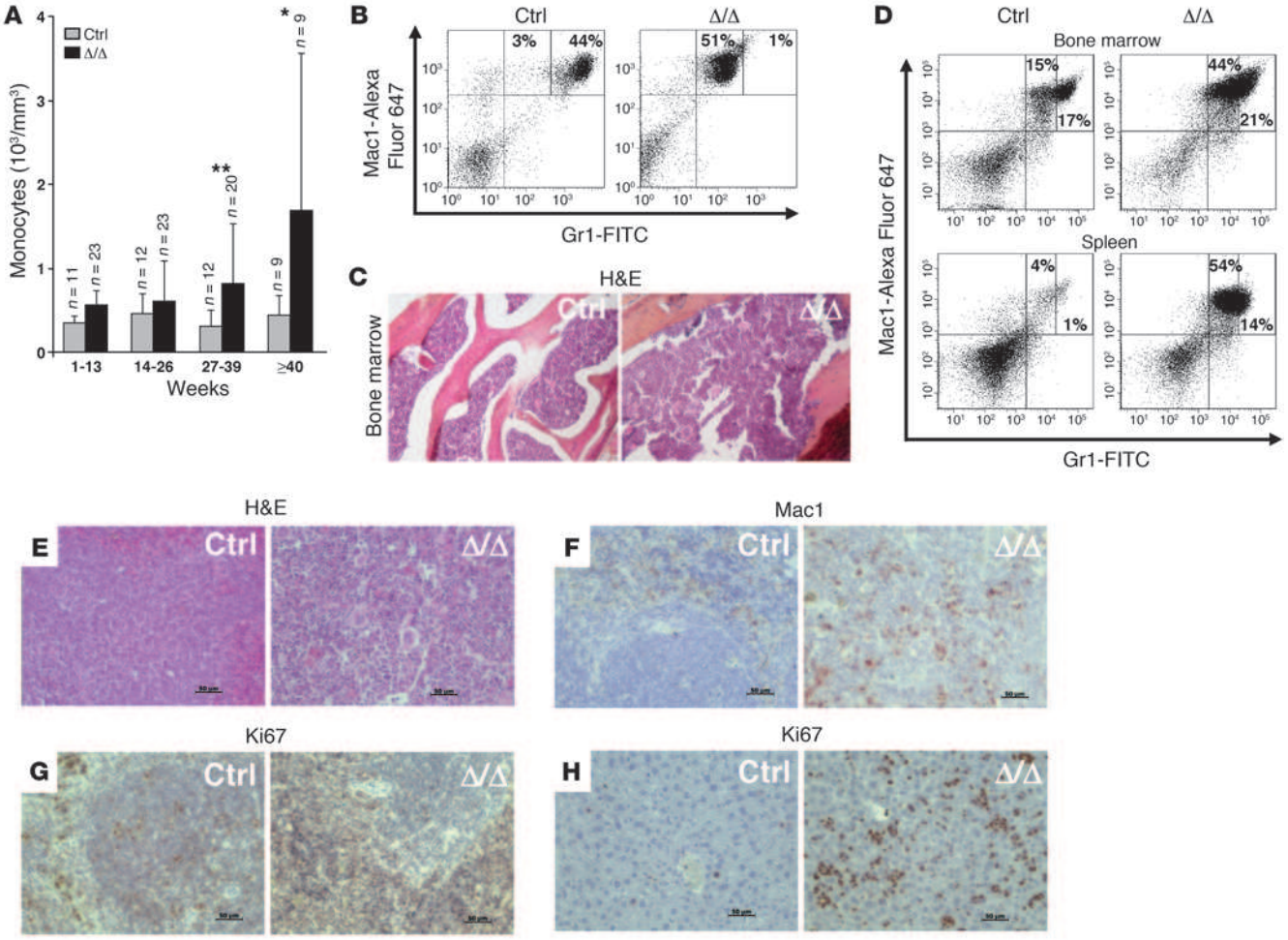


Figure 3

Tif1g$^{\Delta/\Delta}$ mice older than 6 months develop a CMML-like myeloproliferative disease with monocytic features. (**A**) Peripheral monocyte counts in control and *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice. The results are shown as mean ± SD (n = 9–23 mice). (**B**) FACS analysis of peripheral blood cells demonstrated an increase in the monocytic (Gr1^{lo}Mac1^{+}) population in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice. (**C**) Representative H&E-stained histopathologic sections of bone marrow demonstrated hypercellularity in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice. (**D**) FACS analyses of the cell populations from bone marrow or spleen demonstrated an increase of the monocytic (Gr1^{lo}Mac1^{+}) population in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice. (**E**) Representative H&E-stained histopathologic sections of spleen demonstrated that the splenic organization was destroyed in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice. (**F**) Immunohistochemical (IHC) staining for Mac1 in paraffin-embedded spleen sections indicated an expanded monocytic population. (**G** and **H**) IHC staining for Ki67 in paraffin-embedded spleen (**G**) or liver (**H**) revealed a highly proliferative population. Original magnification, ×76. *P < 0.05, **P < 0.01.

patients before decitabine treatment (Figure 7D) was no longer detected after 7 cycles of decitabine (Figure 7D), which correlated with *Tif1g* mRNA reexpression (Figure 7B).

Discussion

We demonstrate that hematopoietic tissue–targeted deletion of *TIF1G* gene, which encodes an E3 ubiquitin ligase that is also a transcription and elongation coregulator, deregulates the HSC compartment and leads in aging mice to a myeloproliferative disease with myelodysplastic features. Its epigenetically regulated downregulation in leukemic cells of a subset of patients with CMML also suggests a tumor suppressor function in human hematopoiesis.

cFES-Cre–mediated recombination of the floxed phosphatidylinositol glycan class A (*Piga*) allele induced the deletion of *Piga* in adult HSCs and all blood cell lineages (20), which prompted us to investigate the role of TIF1γ in adult hematopoiesis by crossing *cFES*-Cre with *Tif1g*$^{fl/fl}$ mice (19). Mutations in the zebrafish *mon* (*tif1g*) gene cause a disruption in both primitive embryonic and definitive adult hematopoiesis, resulting in a severe loss of erythroid cells (12). In zebrafish and human stem/progenitor CD34^{+} cells, TIF1γ functionally links positive elongation factors to blood-specific transcription complexes to regulate the erythroid commitment (15). Here, we show that targeted inactivation of *Tif1g* in stem cells does not affect the number of peripheral blood erythrocytes. The discrepancy with previous models may be related to compensatory mechanisms operating in the mouse model, i.e., the decrease in bone marrow erythroblast is compensated by splenic erythropoiesis, by a function of TIF1γ in zebrafish embryonic primitive erythropoiesis, or by the requirement of TIF1γ for in vitro erythroid commitment of human CD34^{+} cells while being dispensable for mammalian adult erythropoiesis in vivo. Based on the expression of *c-myb*, *mon* mutants were suggested also to have

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213

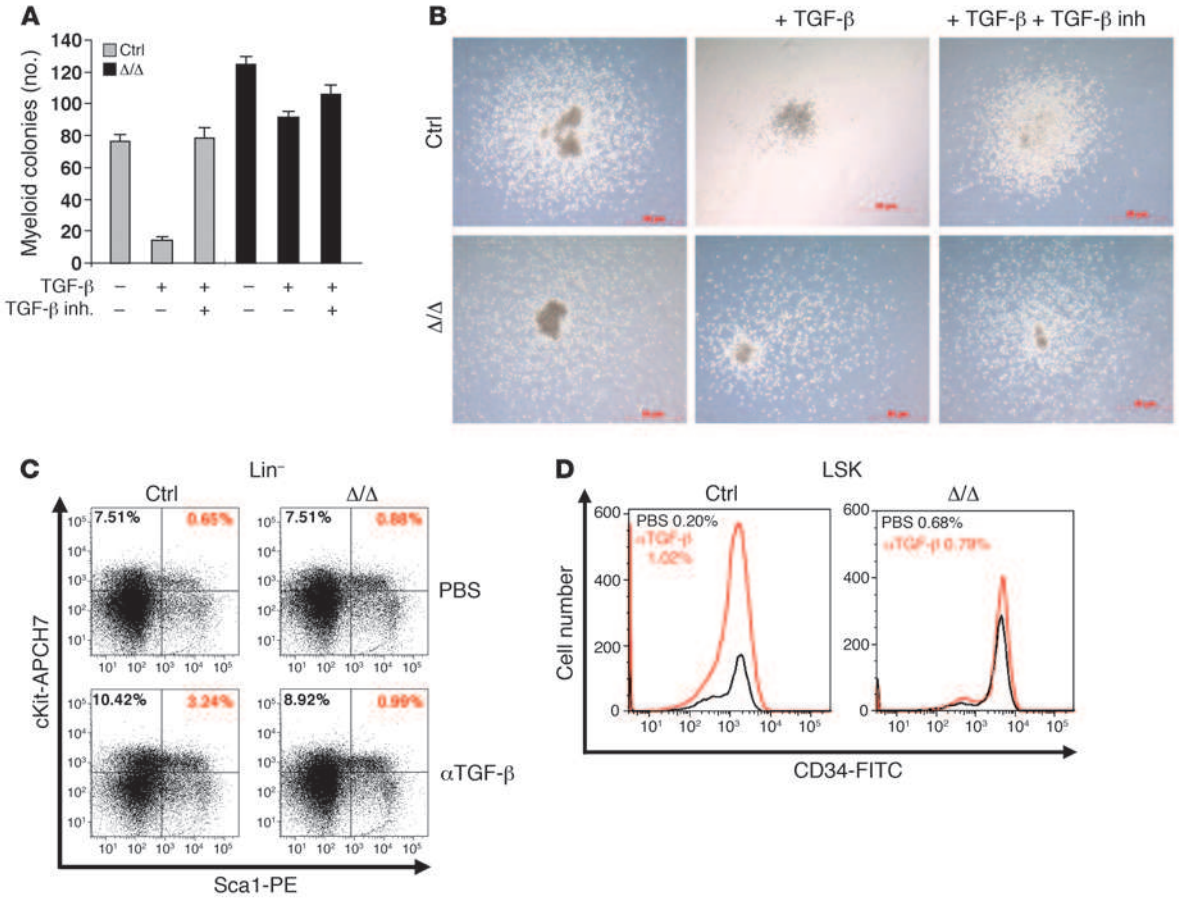


Figure 4

Alteration of the TGF-β pathway in aging *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice. (**A**) Defective TGF-β signaling pathway responsiveness in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice. Sorted ST-HSCs/MPPs were plated on methylcellulose medium in triplicate, with or without TGF-β and TGF-β inhibitor (inh.). The number of myeloid colonies was determined at day 8. The results are shown as the mean ± SD of triplicates. (**B**) Representative images (original magnification, ×138) of the resulting myeloid colonies from sorted ST-HSCs/MPPs, untreated or treated with TGF-β or with TGF-β plus TGF-β inhibitor. (**C** and **D**) TGF-β–neutralizing antibody (αTGF-β) does not affect hematopoietic progenitor cell distribution in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice. (**C**) Analysis of LSK cells from treated or untreated representative control and *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice demonstrated an increase in the LSK population in control mice treated with the antibody, which was not observed in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice. (**D**) Analysis of ST-HSCs/ MPPs from treated or untreated representative control and *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice demonstrated an increase in MPPs in control mice treated with the antibody, which was not observed in *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice.

normal myeloid development (12). We show here that inactivation of *Tif1g* in mouse stem cells expanded the LSK population, in which LT-HSC number was decreased while ST-HSC/MPP number was dramatically increased. The Tif1γ defect also promotes the expansion of the GMP compartment at the expense of the CMPs and the MEPs. At an older age (>6 months), all *Tif1g*-deficient mice exhibit an accumulation of monocytes in peripheral blood, bone marrow, liver, and spleen, suggesting that aging favors the dysregulation of myelopoiesis. This phenotype recapitulates the human CMML that is observed in patients older than 50 (mean age, 70 years old) and associates proliferative and dysplastic features (27). Transplantation experiments demonstrate that hematopoietic cells are capable of propagating the *Tif1g*-deficient CMML-like phenotype in recipient mice, indicating a cell-autonomous process. In addition, similarly to mice in which *Junb* has been deleted (28), and in contrast to those deficient in *Rarg* (27) and *Rb* (29, 30), *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice receiving control bone marrow transplants did not develop the phenotype.

TIF1γ was identified as a modulator of the TGF-β signaling pathway (22). Cytokines of the TGF-β family bind membrane heterodimeric serine/threonine kinases that in turn phosphorylate intracellular mediators known as Smads (31). Phosphorylated Smad2 and Smad3 accumulate into the nucleus and bind Smad4 to regulate target gene transcription. In hematopoietic, mesenchymal, and epithelial cells exposed to TGF-β, TIF1γ could selectively bind phosphorylated Smad2/3 in competition with Smad4 (17). TIF1γ could also antagonize Smad4 through its ubiquitin ligase properties (16). Here, we show that decreased expression of TIF1γ impairs the HSC response to TGF-β (32–34). Recent results indicate that the gene deletion also affects transcriptional elongation of blood genes such as *SCL/TAL1* by antagonizing Pol II pausing (15). Hence, TIF1γ may act on cell fate and lineage commitment through transcription regulation, elongation, and protein degradation. These effects may account for the decrease in *Csf1r* gene expression observed in Lin⁻ and total bone marrow cells of *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice, which correlates with altered monocyte differentiation into macrophages.

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213

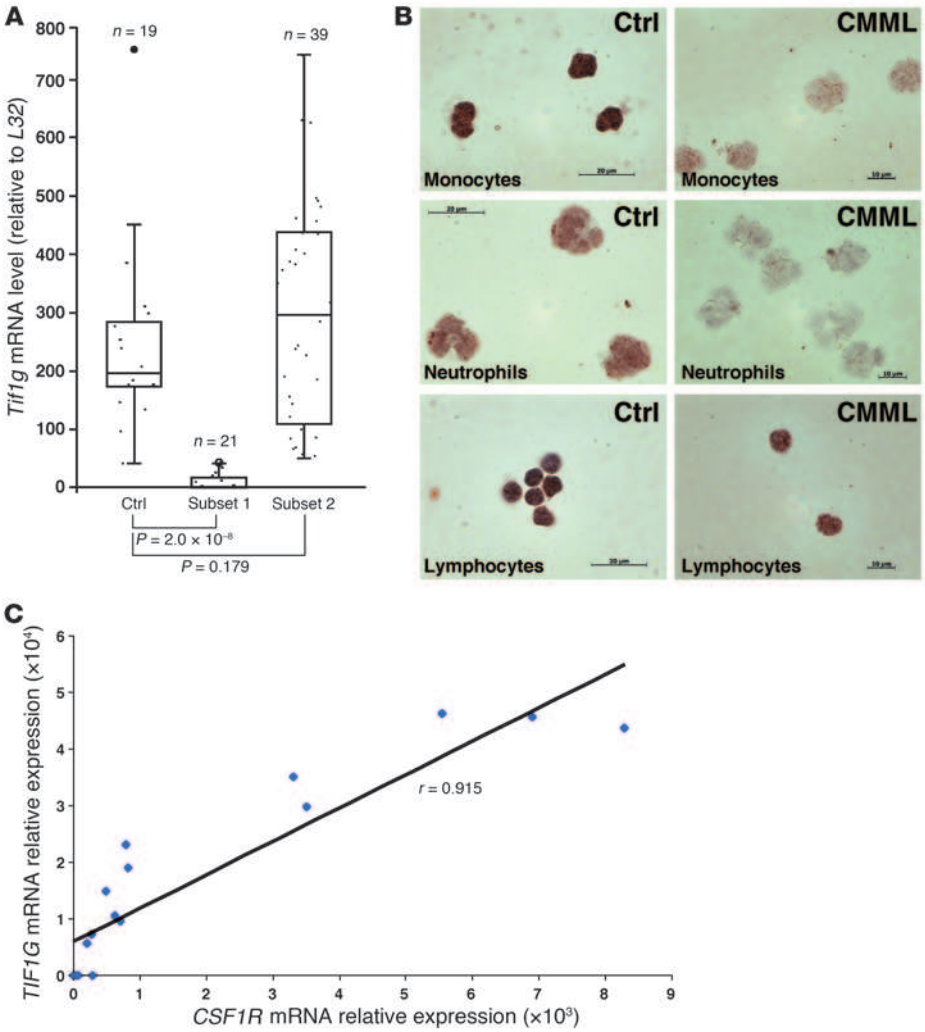


Figure 5

TIF1γ is downregulated in 35% of CMML patients. (**A**) RQ-PCR analysis of TIF1γ expression in the purified monocytes (CD14+ cells) of healthy donors (Ctrl) or CMML patients (subsets 1 and 2). (**B**) Immunocytochemistry staining for TIF1γ from the monocytes, neutrophils and lymphocytes (×340) of a representative control or CMML patient. (**C**) Correlation of *TIF1G* and *CSF1R* expression in monocytes of 17 individuals with CMML. The scatter plot shows *TIF1G* and *CSF1R* mRNA expression. Expression values are expressed in arbitrary units. A linear regression curve and the correlation coefficient are indicated. *$P < 0.05$.

TIF1G gene expression is almost undetectable in sorted leukemic cells of approximately 35% of patients with CMML, which, as in the mouse model, correlates with decreased expression of the *CSF1R* gene. In this disease, the most frequently identified somatic mutations involve *TET2* (35), *RUNX1* (36, 37), and *ASXL1* (38); *RAS* and *CBL* mutations may be less frequent and mutually exclusive (36, 39); while mutations in several other genes encoding epigenetic regulators or signaling molecules (UTX, EZH2, IDH1, IDH2) were identified with a low frequency (40–47). It remains difficult to distinguish in these somatic events those that drive the disease pathogenesis from those acquired as a consequence of clonal evolution. The copy-neutral uniparental disomy that is frequently observed in CMML cells can affect the 1p chromosomal region containing the *TIF1G* gene (48), but we failed to detect any mutation in the coding sequence of the gene that could account for its decreased expression in patient cells.

TIF1G downregulation correlates with the hypermethylation of CpG islands and a specific pattern of histone modifications on the gene promoter in CMML samples (26, 49). The link between mutations in epigenetic genes such as *TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *UTX*, *IDH1*, and *IDH2* and the downregulation of *TIF1G* has now to be explored (50–53). TIF1γ downregulation could also cooperate with mutated signaling molecules such as K-Ras, as recently demonstrated in a mouse model of pancreatic cancer (54). Epigenetic drugs including DNA methyltransferase inhibitors, histone deacetylase inhibitors, and their combination are currently tested as therapeutic approaches in CMML (55). Interestingly, the expression of TIF1γ was restored in monocytes of patients who responded to the demethylating agent decitabine, which could indicate either a demethylating effect of the treatment on the gene promoter or the selection of cells in which the gene was not repressed. Whatever the explanation, changes in TIF1γ expression may be a biomarker of response to demethylating agents in CMML (56).

Together, our results suggest that *TIF1G* is an epigenetically regulated tumor suppressor gene in hematopoietic cells. The decreased expression of this gene favors the proliferation of MPPs and leads to the age-dependent expansion of the monocyte population. Changes in *TIF1G* expression may be tested as a biomarker of response to demethylating agents and other chromatin structure modifiers such as HDAC inhibitors (57) that are currently being developed for the treatment of this disease.

Methods

Mice. Mice were housed in a temperature-controlled environment under a 12-hour light/12-hour dark cycle with free access to water and a standard rodent chow diet; all mice used were maintained under specific patho-

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213

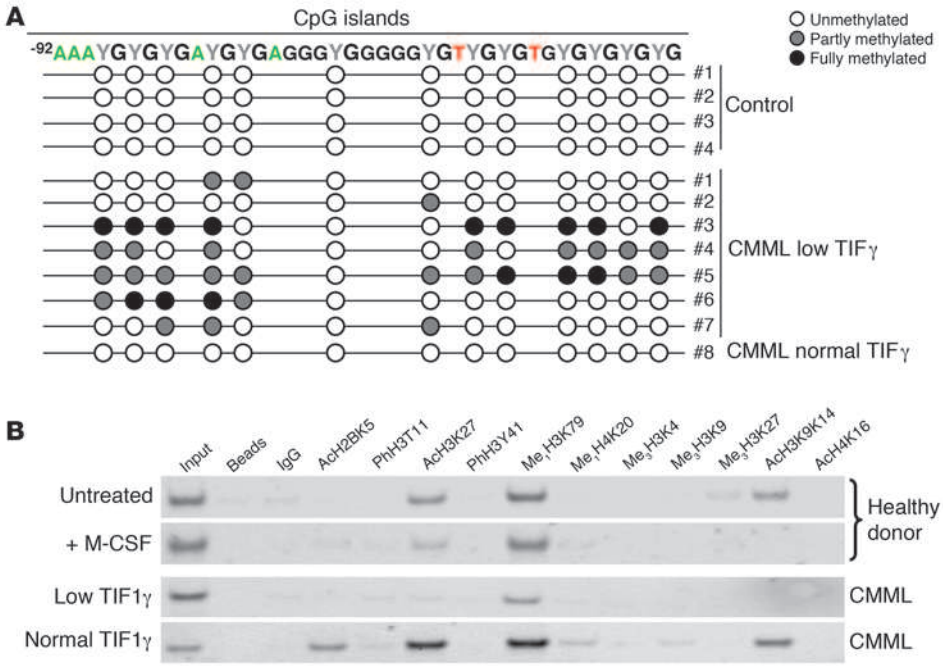


Figure 6
TIF1G is an epigenetically regulated tumor suppressor gene in CMML. (**A**) Sequencing of the bisulfite modified *TIF1G* promoter sequence from normal monocytes (Control) or CMML monocytes. (**B**) ChIP analysis of the status of histone modifications on the *TIF1G* promoter. Chromatin was immunoprecipitated using specific antibodies directed against histone modifications. Ac, acetylated; Me_1, methylated; Me_3, tri-methylated.

gen–free conditions according to animal study protocols reviewed and approved by the Animal Experiment Ethics Committee of the University of Burgundy. *cFES*-Cre mice were provided by P.P. Pandolfi (Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA). For genotyping, genomic DNA was prepared from blood, bone marrow, or tail biopsies using the Gentra Puregene Kit (QIAGEN). Floxed (531 bp), deleted (360 bp), and wild-type (498 bp) *Tif1g* alleles were identified by PCR with primers AFI 124 (5′-AGCTCTGGAACGTCGGTC-3′), AFI 125 (5′-GGTAAGTCAGCAAGAGCTCA-3′), and AFM 257 (5′-GGTAGTACTTGTATGGAGGT-3′). For genomic Q-PCR, a specific sequence located between exons 3 and 4 was amplified on a 7500 FAST thermocycler (Applied Biosystems) using the SYBR Green detection protocol as outlined by the manufacturer (Applied Biosystems). Mouse specific forward and reverse primers were: *Moz*, 5′-GAGGACCCAGGTTCAATTCTTAG-3′ and 5′-GAAGAAGCTGTCAGATCCTCTAGAACT-3′, used as a standardizing control, and *Tif1g*, 5′-GTGCCGCAGTGCCTATTTG-3′ and 5′-AATGCAGAGAGAGCCAGTTCCT-3′.

Bone marrow transplantation. To generate bone marrow–reconstituted mice, we injected a total of 2×10^6 bone marrow cells from control or *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ donor mice into the retro-orbital sinus of lethally irradiated recipient (11 Gy) BALB/c mice. For the second transplantation, the same protocol was followed. For reciprocal transplantations, we injected a total of 2×10^6 BM cells from control donor mice into the retro-orbital sinus of *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ or control lethally irradiated recipient (16 Gy) C57BL/6 mice.

Blood cell analysis. Adult control and *Tif1g*$^{\Delta/\Delta}$ mice were anesthetized with 1%–2% isoflurane. Blood was collected from the conjunctival vein in the eye using an EDTA-coated tube. Complete blood counts were performed using an automated hematology analyzer (MS Laboratories). Collected blood was also used to prepare blood smears, which were stained with May-Grünwald-Giemsa (MGG) stain.

Cell preparation. Following sacrifice, mice were examined for the presence of abnormalities, and organs were collected for further cell and histopathology analyses. For the bone marrow cell preparations, femurs and tibias were removed aseptically and cells were flushed. For splenocytes, spleens were dilacerated, red blood cells were lysed, and cells were washed in 1× PBS (Lonza).

Responsiveness to TGF-β. For myeloid progenitor assays studying the responsiveness to TGF-β ligand, we purified Lin$^-$ cells from bone marrow cells using the Lineage Cell Depletion magnetic isolation kit and AutoMACS separator according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). ST-HSCs/MPPs (LSK CD34$^+$) were sorted from these cells. Then, 5×10^2 ST-HSCs/MPPs were plated in 1.1 ml serum-free methylcellulose (M3134; StemCell Technologies) supplemented with 15% FBS (Lonza), 1× BIT (StemCell Technologies), 100 μM MTG (Sigma-Aldrich), 2 mM glutamine (Invitrogen), 50 ng/ml recombinant murine SCF (rmSCF) (R&D Systems), 10 ng/ml rmIL-3 (R&D Systems), 10 ng/ml rmIL-6 (R&D Systems), and in the presence or absence of 10 ng/ml recombinant human TGF-β1 (R&D Systems) and/or 10 μM TGF-β inhibitor (SB431542; Sigma-Aldrich). Cells were plated in 35-mm culture dishes and incubated in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 at 37°C. Myeloid colonies were scored on day 8 by light microscopy.

To block TGF-β in vivo, mice were treated with 2G7 neutralizing pan–TGF-β IgG2 (R&D Systems) delivered i.p. at a dose of 15 mg/kg once a week during 5 weeks. Mice were then sacrificed.

Histopathology and immunohistochemistry analyses. Sectioned femoral bone marrow, spleens, and livers were fixed at least 72 hours in 10% neutral buffered formalin, dehydrated in alcohol, cleared in xylene, and infiltrated with paraffin on an automated processor (Leica TP1020). Tissue sections (4 μm thick) were placed on charged slides, deparaffinized in xylene, cleared through graded alcohol solutions, rehydrated in water and stained with H&E. Immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded tissue sections using primary antibodies directed against Mac1 (BD Biosciences — Pharmingen) or Ki67 (Abcam).

Flow cytometry and cell sorting analysis. FACS analysis was performed on blood cells, bone marrow cells, or splenocytes from mice. Briefly, single-cell suspension was prepared and stained with primary and secondary antibodies if necessary. The cells were washed twice in 1× PBS and resuspended in 1× PBS/30% FBS. Lin$^-$ cells were identified by absence of signal after staining with a biotinylated antibody cocktail containing B220, CD3, Ter119, Mac1, and Gr1 (BD Biosciences — Pharmingen) and development by streptavidin–Alexa Fluor 405 (Invitrogen). Antibodies Gr1-FITC, Mac1–Alexa

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213

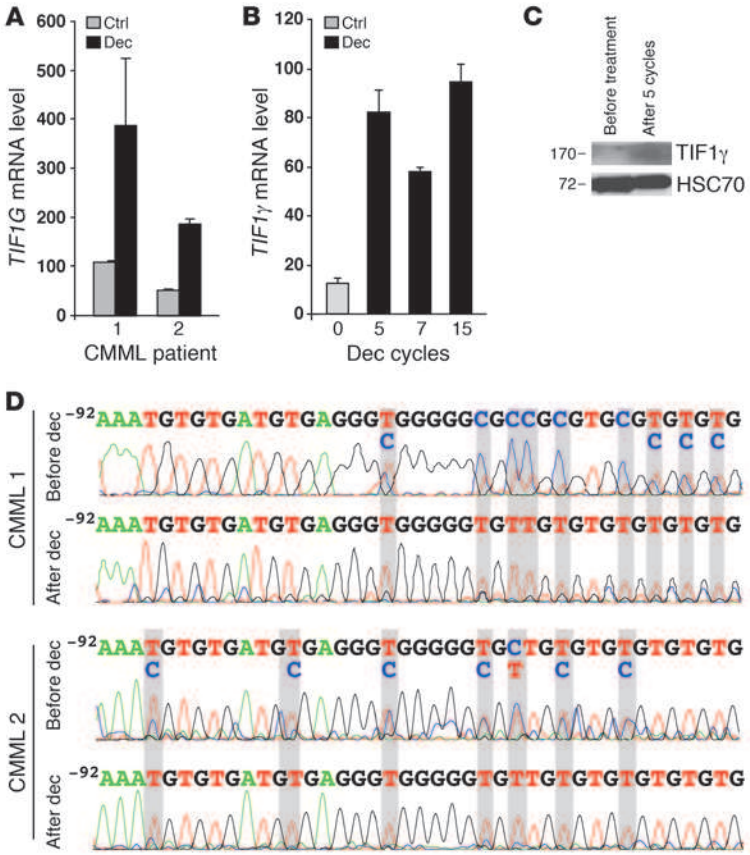


Figure 7

TIF1G is sensitive to decitabine in CMML. (**A**) *TIF1G* expression (RQ-PCR) from the monocytes (CD14+) of two CMML patients (1 and 2) after 3 days of culture in the absence or presence of decitabine (dec). Data are the mean ± SD of the values from experiments performed in triplicate. (**B**) *TIF1G* expression (RQ-PCR) from the monocytes of one CMML patient before and during treatment with decitabine. Data are the mean ± SD of the values from experiments performed in triplicate. (**C**) Immunoblotting analysis for TIF1γ in human monocytes from the same patient after 5 cycles of decitabine. Equivalent loading of the lanes was controlled by anti-HSC70 antibody staining. (**D**) Sequencing of the bisulfite-modified *TIF1G* promoter sequence from the monocytes of two patients before and after 7 cycles of decitabine (CMML 1 is the same patient as in **B**).

Fluor 647, Ter119–Alexa Fluor 405, CD71-PE, Sca1-PE, c-Kit–APCH7, CD150-APC, CD48-FITC, CD34-FITC, and CD16/32-PECya7 were added and incubated on ice. Cell sorting analysis was performed on Lin⁻ cells purified from bone marrow cells using the Lineage Cell Depletion magnetic isolation kit and AutoMACS separator according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Flow cytometry was performed on LSRII (BD) and cell sorting on FACSAria (BD) using DIVA software (BD), and automatic compensations were applied. The results were analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc.). For HSC and hematopoietic progenitor cell analysis and sorting, color compensation samples were produced by singly staining bone marrow cells or Lin⁻ cells with one antibody of each fluorochrome or with a combination of cells stained by the Fluorescence Minus One (FMO) method, which was performed by sequentially adding fluorescence-labeled antibodies to the staining cocktail.

Real-time Q-PCR in mice. Total RNA was isolated from bone marrow cells and splenocytes using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was obtained from 150 ng total RNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). Real-time Q-PCR (RQ-PCR) was performed in triplicate using TaqMan probes (Applied Biosystems) and analyzed in an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. The *Tif1g* TaqMan assay was Mm01308706_m1. Values for each PCR were normalized to *Hprt* levels (Mm03024075_m1). For the study of *Csf1r*, *Csf3r*, and *Csf2ra* expression, real-time PCR was performed in a 7500 FAST thermocycler (Applied Biosystems) using the SYBR Green detection protocol as outlined by the manufacturer. Mouse specific forward and reverse primers were: *Csf1r*, 5′-CATGGCCTTCCTTGCTTCTAAA-3′ and 5′-CAGCACGTTTCGAGCTGCTA-3′; *Csf3r*, 5′-GCGCCGACTGTCAGTACCA-3′ and 5′-GGAGCAGTTGTTCTGCCTCTTC-3′; and *Csf2ra*, 5′-ACGTGGCGCGATGCAT-3′ and 5′-TCACGACCAAGTAGGCCTCACT-3′. *Hprt* was used as internal control.

CMML sample collection and analysis. Blood samples from patients with CMML were collected, and informed consent was obtained. CMML tissue studies were reviewed and approved by the institutional review board of Hospital Cochin (Paris, France). Peripheral blood mononucleated cells were isolated by Ficoll Hypaque (Eurobio), and monocytes were sorted using the CD14+ magnetic isolation kit and AutoMACS separator according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA was reverse transcribed by M-MLV reverse transcriptase with random hexamer primers (Promega). Real-time PCR was performed with AmpliTaq Gold polymerase in a 7500 FAST thermocycler (Applied Biosystems) using the SYBR Green detection protocol as outlined by the manufacturer. Briefly, 15 ng of total complementary DNA, 50 nM of each primer, and 1× SYBR Green mix were used in a total volume of 20 μl. Human specific forward and reverse primers were *L32*, 5′-TGTCCTGAATGTGGTCACCTGA-3′ and 5′-CTGCAGTCTCCTTGCACACCT-3′ used as a standardizing control, *TIF1G*, 5′-AGCAACGGCGACATCCA-3′ and 5′-TGCATTCTTGGCGGCATA-3′, and *CSF1R*, 5′-GCCCCCCATCACCTCACT-3′ and 5′-GTGTTTTGGAAGGTAGCGTTGTT-3′. *L32* was used as internal control.

Treatment of CMML with decitabine. Adults with a diagnosis of CMML were enrolled in "A Phase II Study of Decitabine in Patients with Chronic Myelomonocytic Leukemia" (GFM-DEC-LMMC-2007-02), and informed consent was obtained. CMML tissue studies were reviewed and approved by the institutional review board of Hospital Cochin. Monocytes were isolated, as described in *CMML sample collection and analysis*, after decitabine treatment and subjected to RQ-PCR analysis. One cycle of decitabine corresponds to 20 mg/m²/d i.v. for 5 days every 22 days. For in vitro culture, monocytes isolated from CMML patients were cultured in RPMI 1640 Glutamax medium (BioWhittaker) supplemented with 10% fetal calf serum (BioWhittaker),

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213

penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μg/ml), and amphotericin B (0.25 μg/ml) (BioWhittaker) at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Cells were plated at 0.5×10^6 cells/ml and incubated for 3 days with M-CSF (100 ng/ml) in the presence or absence of decitabine (3 μM).

Bisulfite DNA treatment and sequencing. Genomic DNA was isolated from monocytes of CMML patients before and after 7 cycles of decitabine using QIAGEN's standard procedures. Two hundred nanograms of total genomic DNA was modified by bisulfite treatment according to the manufacturer's instructions (MethylDetector, Active Motif). Converted *TIF1G* promoter was identified by PCR with converted primers forward (5′-GGCTTTAAAAA-AAAAATCTCCCTT-3′) and reverse (5′-CCACCATATTTTCCTCTTTAAA-CCCG-3′), and direct sequencing reaction was performed using standard conditions according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems).

ChIP procedure. One million cells were fixed with 1% formaldehyde to crosslink DNA with proteins, then lysed and sonicated. The ChIP procedure was carried out according to the manufacturer's instructions with modifications (Upstate Biotechnology) and as previously described (58). After pre-clearing with salmon sperm DNA/protein A/G agarose beads, the samples underwent immunoprecipitation with 3 μg of antibodies specific for acetylated H2B K5, phosphorylated H3 T11, acetylated H3 K27, phosphorylated H3 Y41, methylated H3 K79, methylated H4 K20 (Santa Cruz Biotechnology Inc.), tri-methylated H3 K4, tri-methylated H3 K9, tri-methylated H3 K27, acetylated H3 K9 K14, acetylated H4 K16 (Millipore), or rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc.) at 4°C overnight. Beads were washed, protein/DNA complexes eluted, then cross-links reversed by heating at 65°C overnight. After RNA and protein digestions, DNA was purified on a spin column (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel). Input corresponds to total sonicated DNA. DNA was amplified by PCR. PCR amplification was performed using *Taq* polymerase (Promega) and ChIP primers. The ChIP primers used to amplify regions of the promoter locus of *TIF1G* were 5′-CCCTCAGGCCCTTTGCA-3′ and 5′-GAAGGAACCT-GTCTTGGAGAAGAG-3′ (Invitrogen).

Statistics. Student 2-tailed *t* test and ANOVA were used for statistical analysis. Differences were considered significant when *P* was less than 0.05.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the clinicians (Groupe Francophone des Myélodysplasies) who provided human CMML samples. We thank O. Kosmider, A. Chlemaire, A. Bouchot, M. Ciudad, C. Racoeur, J. Guy, L. Desoche, and A. Aznague for technical assistance, and V. Saint-Giorgio and N. Hoffmann (Onco*design*) for their assistance in the mouse studies. We also thank W. Vainchenker and F. Louache for technical advice and helpful discussions, as well as P.-H. Roméo and S. Kusy for helpful discussions. This work was supported by the Conseil Régional de Bourgogne (FABER to L. Delva and N. Droin), the Ligue Contre le Cancer (CCIR-GE to L. Delva), the Institut National du Cancer (INCa; to E. Solary), the Agence nationale de la recherche (ANR; to E. Solary and L. Delva), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC to L. Delva, Equipment of Gustave Roussy Institute), the national Programmes hospitaliers de recherche clinique (PHRC) (MAD06), the Ligue Nationale Contre le Cancer (to E. Solary), the Fondation de France (Comité Leucémie) (to N. Droin), and the Association Laurette Fugain (to N. Droin). R. Aucagne was supported by fellowships from the Ligue Contre le Cancer (Saône-et-Loire committee), the ARC, and the Société Française d'Hématologie (SFH); J. Paggetti by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of France (MESR) and the ARC; B. Lagrange by fellowships from the MESR and the ARC; and A. Largeot by fellowships from Inserm and the Région Bourgogne.

Received for publication September 24, 2010, and accepted in revised form March 8, 2011.

Address correspondence to: Laurent Delva or Jean-Noël Bastie, Inserm UMR 866, University of Burgundy, Dijon, F-21000, France. Phone: 33.0.380393440; Fax: 33.0.380393434; E-mail: Laurent.Delva@u-bourgogne.fr (L. Delva); jean-noel.bastie@chu-dijon.fr (J.N. Bastie).

Jérôme Paggetti's present address is: CRP-Santé Laboratoire d'Hémato-Cancérologie Expérimentale, Luxembourg.

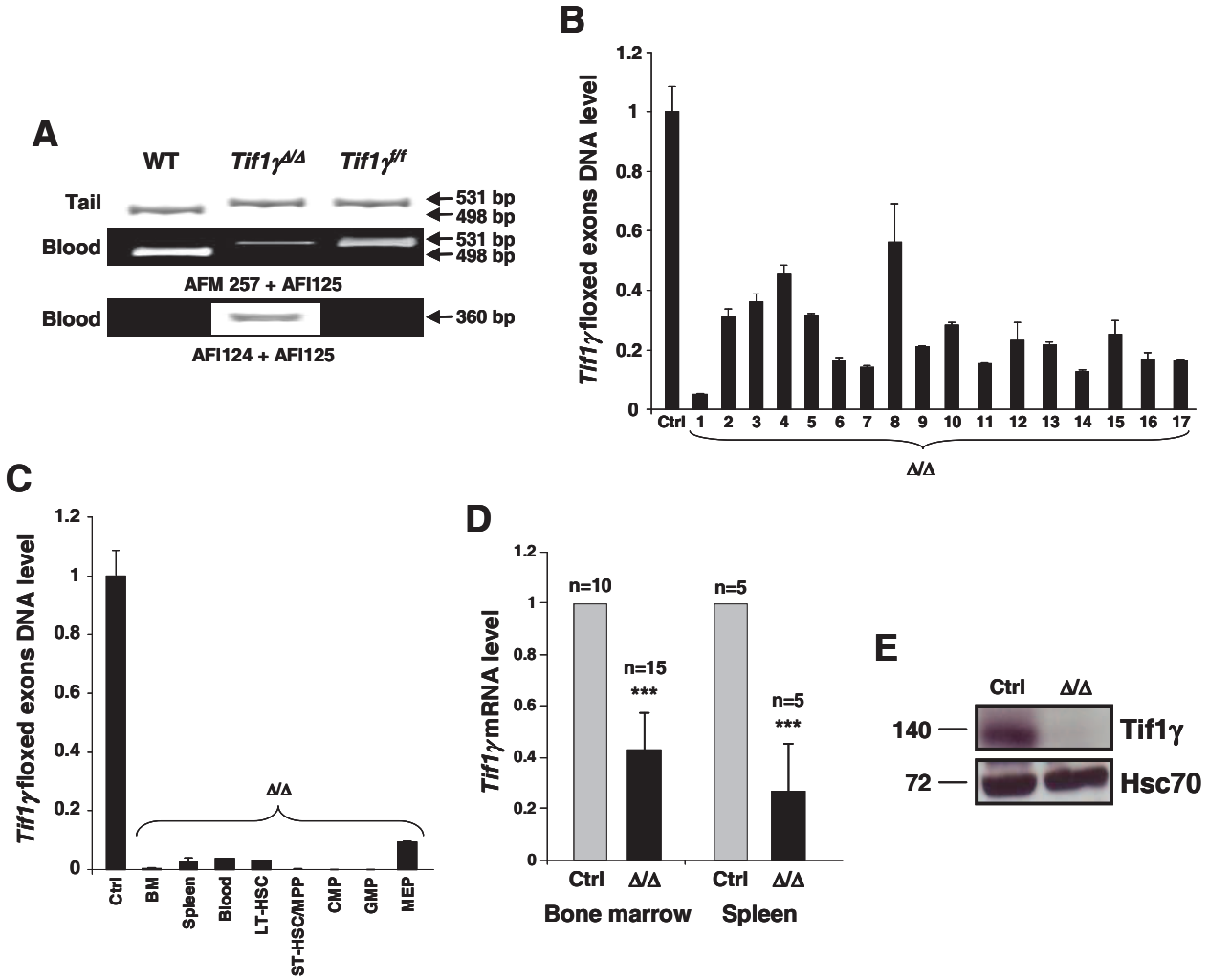
Kai-Ping Yan's present address is: Gene Expression and Regulation, The Wistar Institute, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

1. Venturini L, et al. TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene*. 1999;18(5):1209–1217.
2. Beckstead R, et al. Bonus, a Drosophila homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit betaFTZ-F1-dependent transcription. *Mol Cell*. 2001;7(4):753–765.
3. Friedman JR, et al. KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev*. 1996;10(16):2067–2078.
4. Khetchoumian K, et al. TIF1delta, a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids. *J Biol Chem*. 2004;279(46):48329–48341.
5. Le Douarin B, et al. The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J*. 1995;14(9):2020–2033.
6. Moosmann P, Georgiev O, Le Douarin B, Bourquin JP, Schaffner W. Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1. *Nucleic Acids Res*. 1996;24(24):4859–4867.
7. Zhong S, et al. A RA-dependent, tumour-growth suppressive transcription complex is the target of the PML-RARalpha and T18 oncoproteins. *Nat Genet*. 1999;23(3):287–295.
8. Khetchoumian K, et al. Loss of Trim24 (Tif1-alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nat Genet*. 2007;39(12):1500–1506.
9. Underhill C, Qutob MS, Yee SP, Torchia J. A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1. *J Biol Chem*. 2000;275(51):40463–40470.
10. Abrink M, et al. Conserved interaction between distinct Kruppel-associated box domains and the transcriptional intermediary factor 1 beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(4):1422–1426.
11. Cammas F, Mark M, Dolle P, Dierich A, Chambon P, Losson R. Mice lacking the transcriptional corepressor TIF1beta are defective in early postimplantation development. *Development*. 2000;127(13):2955–2963.
12. Ransom DG, et al. The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol*. 2004;2(8):E237.
13. Kim J, Kaartinen V. Generation of mice with a conditional allele for Trim33. *Genesis*. 2008;46(6):329–333.
14. Morsut L, et al. Negative control of Smad activity by ectodermin/Tif1gamma patterns the mammalian embryo. *Development*. 2010;137(15):2571–2578.
15. Bai X, et al. TIF1gamma controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell*. 2010;142(1):133–143.
16. Dupont S, et al. Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell*. 2005;121(1):87–99.
17. He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massague J. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell*. 2006;125(5):929–941.
18. Dupont S, et al. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell*. 2009;136(1):123–135.
19. Doisne JM, et al. iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *J Exp Med*. 2009;206(6):1365–1378.
20. Keller P, et al. FES-Cre targets phosphatidylinositol glycan class A (PIGA) inactivation to hematopoietic stem cells in the bone marrow. *J Exp Med*. 2001;194(5):581–589.
21. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121(7):1109–1121.
22. Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213

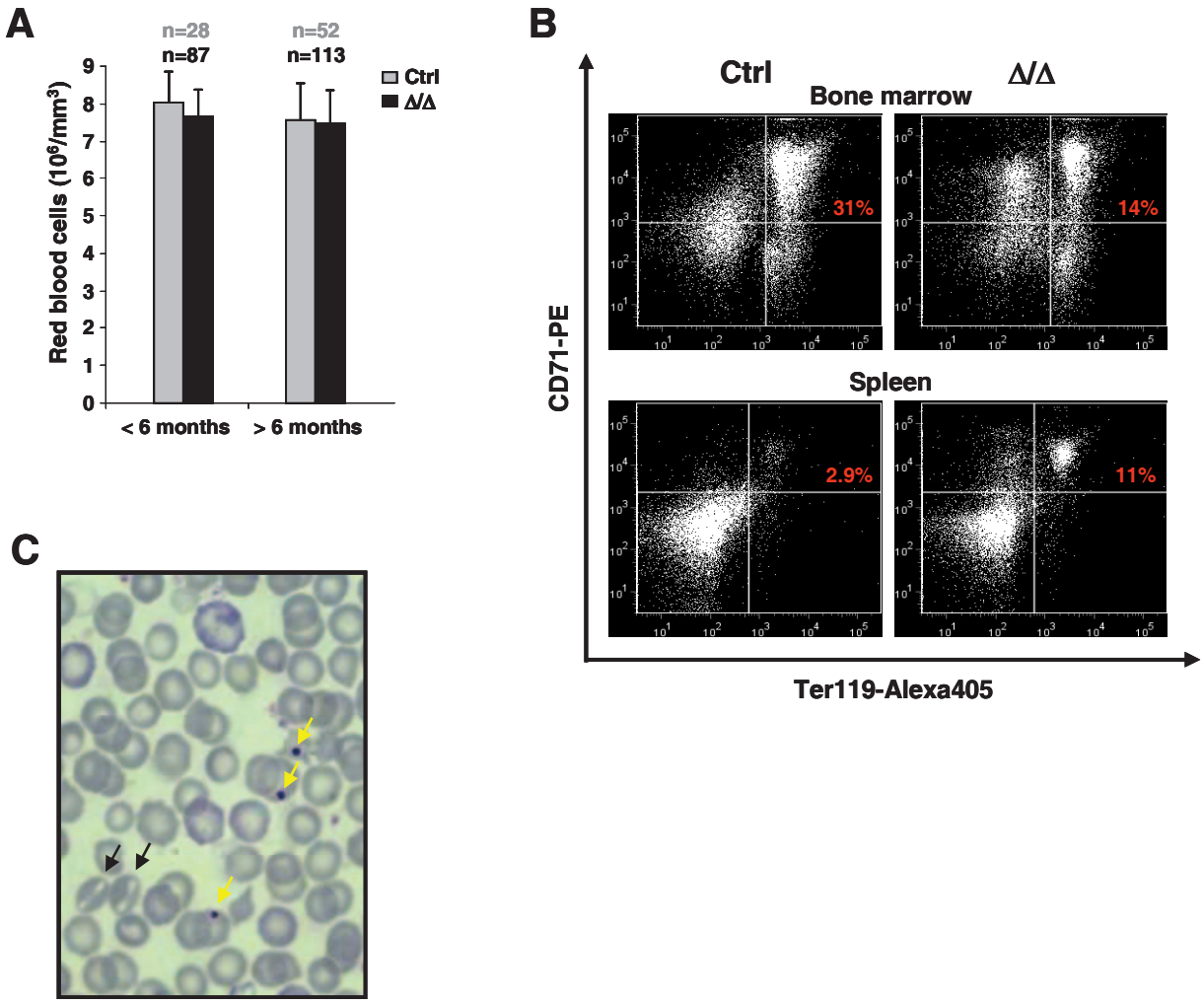
transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(12):970–982.
23. Arteaga CL, Hurd SD, Winnier AR, Johnson MD, Fendly BM, Forbes JT. Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J Clin Invest*. 1993; 92(6):2569–2576.
24. Biswas S, et al. Inhibition of TGF-beta with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1305–1313.
25. Karlic R, Chung HR, Lasserre J, Vlahovicek K, Vingron M. Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(7):2926–2931.
26. Kantarjian H, et al. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2007;109(1):52–57.
27. Emanuel PD. Juvenile myelomonocytic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2008; 22(7):1335–1342.
28. Passegue E, Wagner EF, Weissman IL. JunB deficiency leads to a myeloproliferative disorder arising from hematopoietic stem cells. *Cell*. 2004;119(3):431–443.
29. Walkley CR, et al. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell*. 2007;129(6):1097–1110.
30. Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell*. 2007;129(6):1081–1095.
31. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003; 113(6):685–700.
32. Challen GA, Boles NC, Chambers SM, Goodell MA. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell*. 2010; 6(3):265–278.
33. Langer JC, Henckaerts E, Orenstein J, Snoeck HW. Quantitative trait analysis reveals transforming growth factor-beta2 as a positive regulator of early hematopoietic progenitor and stem cell function. *J Exp Med*. 2004;199(1):5–14.
34. Capron C, et al. A major role of TGF-beta1 in the homing capacities of murine hematopoietic stem cell/progenitors. *Blood*. 2010;116(8):1244–1253.
35. Kosmider O, et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2009;94(12):1676–1681.
36. Gelsi-Boyer V, et al. Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes. *BMC Cancer*. 2008;8:299.
37. Kuo MC, et al. RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation. *Leukemia*. 2009; 23(8):1426–1431.
38. Gelsi-Boyer V, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;145(6):788–800.
39. Tyner JW, et al. High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients. *Blood*. 2009;113(8):1749–1755.
40. Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*. 1994;77(2):307–316.
41. Steensma DP, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2005;106(4):1207–1209.
42. Jelinek J, et al. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(10):3370–3373.
43. Lee BH, et al. FLT3 mutations confer enhanced proliferation and survival properties to multipotent progenitors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2007;12(4):367–380.
44. Jankowska A, et al. Mutational Spectrum In Chronic Myelomonocytic Leukemia Includes Genes Associated with Epigenetic Regulation Such as UTX and EZH2. *ASH Annual Meeting 2010*. December 6, 2010. Orlando, Florida, USA.
45. Szpurka H, et al. UTX Mutations and Epigenetic Changes In MDS/MPN and Related Myeloid Malignancies. *ASH Annual Meeting 2010*. December 5, 2010. Orlando, Florida, USA.
46. Grossmann V, et al. Analyses of 81 chronic myelomonocytic leukemia (CMML) for EZH2, TET2, ASXL1, CBL, KRAS, NRAS, RUNX1, IDH1, IDH2, and NPM1 revealed mutations in 86.4% of all patients with TET2 and EZH2 being of high prognostic relevance. *ASH Annual Meeting 2010*. December 6, 2010. Orlando, Florida, USA.
47. Kosmider O, et al. Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010;24(5):1094–1096.
48. Dunbar AJ, et al. 250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies. *Cancer Res*. 2008;68(24):10349–10357.
49. Fenaux P, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009;10(3):223–232.
50. Figueroa ME, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18(6):553–567.
51. Ko M, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010;468(7325):839–843.
52. Smith AE, et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood*. 2010;116(19):3923–3932.
53. Kohlmann A, et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J Clin Oncol*. 2010; 28(24):3858–3865.
54. Vincent DF, et al. Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet*. 2009;5(7):e1000575.
55. Candelaria M, et al. Hydralazine and magnesium valproate as epigenetic treatment for myelodysplastic syndrome. Preliminary results of a phase-II trial [published online ahead of print October 5, 2010]. *Ann Hematol*. doi:10.1007/s00277-010-1090-2.
56. Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet*. 2000;24(1):88–91.
57. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693–705.
58. Paggetti J, et al. Crosstalk between leukemia-associated proteins MOZ and MLL regulates HOX gene expression in human cord blood CD34+ cells. *Oncogene*. 2010;29(36):5019–5031.

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213



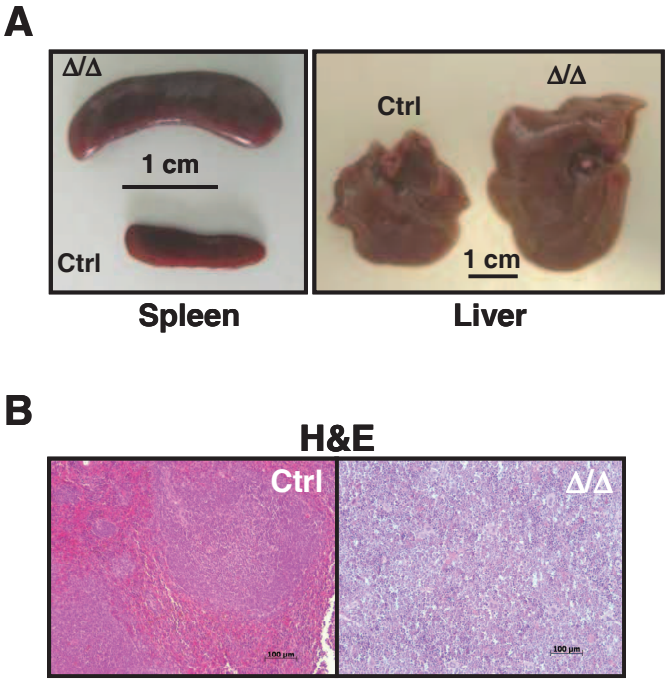
Supplemental figure 1. Genotyping and *Tif1γ* expression in *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ mice. (**A**) Representative PCR analysis of genomic DNA from tail or blood of wild type (WT), *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ), and *Tif1γ*$^{f/f}$ mice using a mixture of two primers. Amplification of the WT allele by forward and reverse primers AFM257 and AFI125 produces a 498 bp DNA fragment (lower band) while amplification of the floxed (*f*) allele results in a 531 bp DNA fragment (upper band), and amplification of the deleted (Δ) allele by forward and reverse primers AFI124 and AFI125 produces a 360 bp DNA fragment. (**B**) Q-PCR analysis of the *Tif1γ* floxed exons in peripheral blood cells from control (Ctrl) or *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mice. Data are the means ± s.d. of the values from experiments performed in triplicate. (**C**) *Tif1γ* deletion, by Q-PCR analysis, in various hematopoietic tissues or cells. (**D**) RQ-PCR analysis of *Tif1γ* from total BM or spleen cells of control (Ctrl) or *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mice. Data are the means ± s.d. of the values from independent experiments (**p* values are defined in Methods). (**E**) Tif1γ expression is decreased in *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mice. Protein extracts were prepared from BM cells of control (Ctrl) or *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mice then were electrophoresed on SDS-PAGE and immunoblotted with anti-Tif1γ antibody. Equivalent loading of lanes was controlled by the use of an anti-Hsc70 antibody.

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213



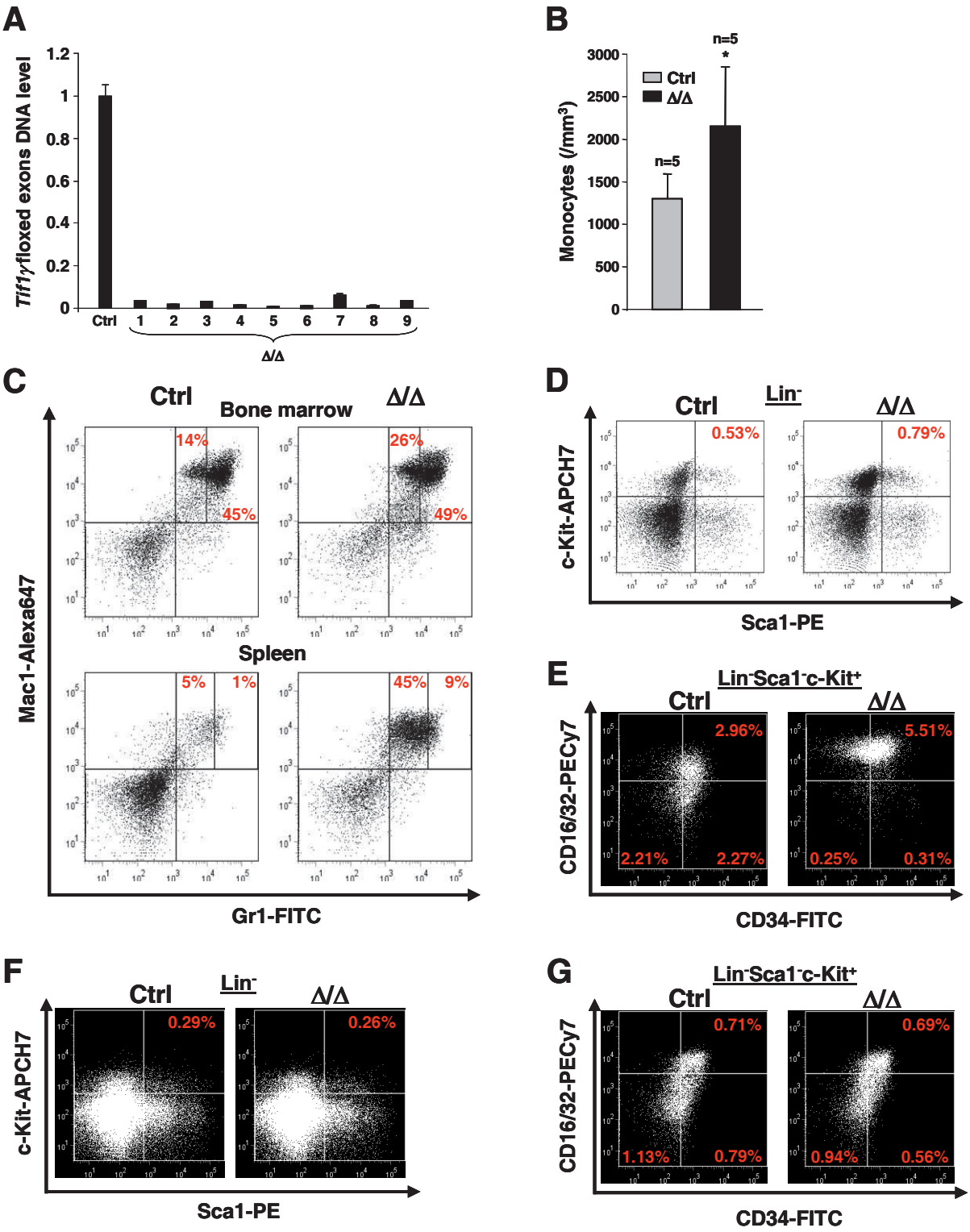
Supplemental figure 2. Erythroid defects in *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ mice. (**A**) Peripheral erythrocyte counts in control (Ctrl) and *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mice, younger or older than 6 months. The results are shown as the means ± s.d. (**B**) FACS analysis of cell populations from BM and spleen of representative control (Ctrl) and *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mice, older than 6 months demonstrated a decrease in BM associated with an increase in spleen of erythroblastic populations (Ter119^{+}CD71^{+}) in *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ mice. (**C**) Representative MGG stained peripheral blood smears (×100) from *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mice, older than 6 months, demonstrated the presence of Howell-Joly bodies (yellow arrows) and stomatocytes (black arrows).

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213



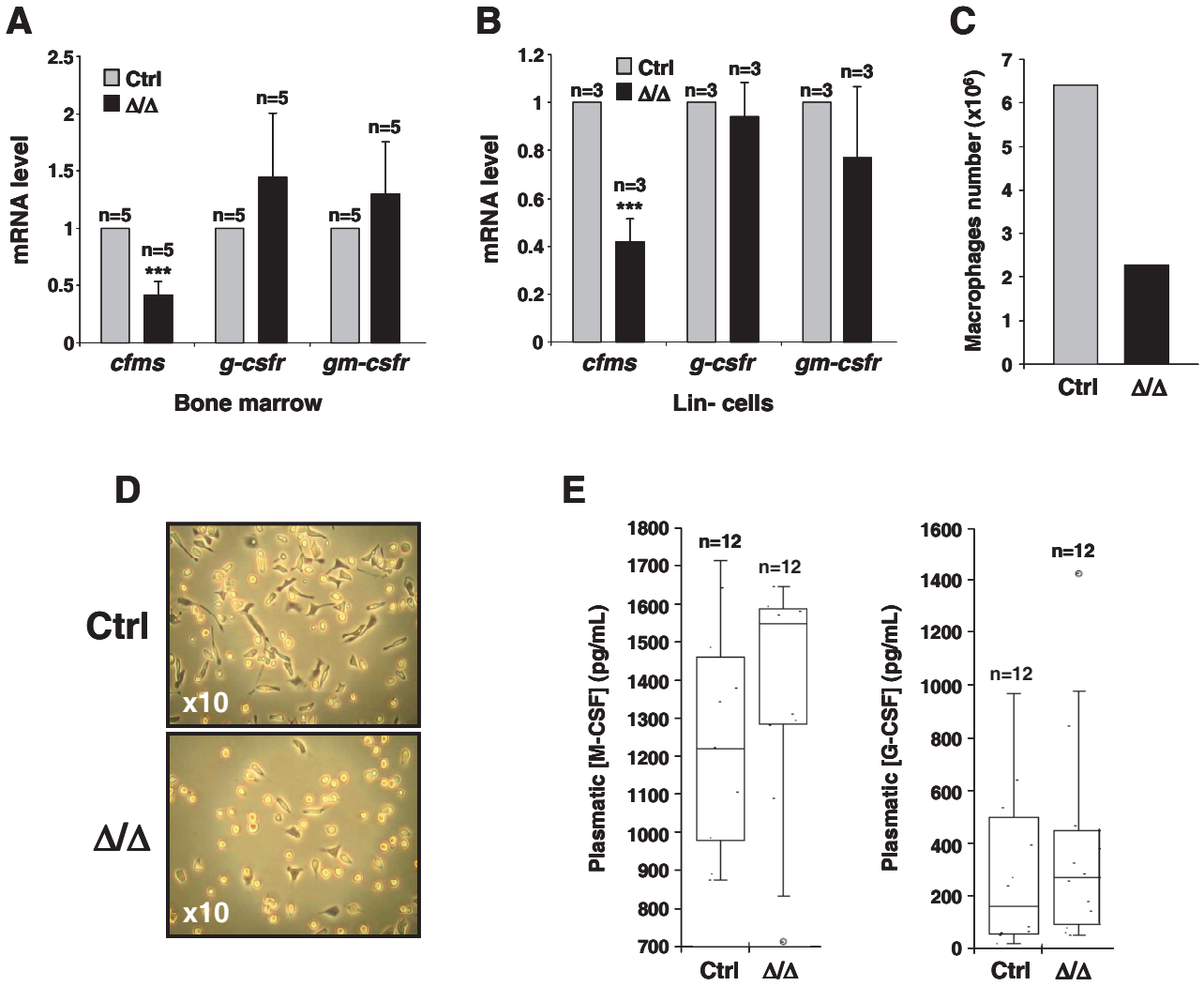
Supplemental figure 3. Hepatosplenomegaly in *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ mice. (**A**) Marked splenomegaly (left panel) in a *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mouse (top) as compared with the spleen of a wild-type sex and age-matched control (Ctrl) mouse (bottom). Marked hepatomegaly (right panel) in a *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mouse (right) as compared with the liver of a wild-type sex and age-matched control (Ctrl) mouse (left). (**B**) H&E staining of paraffin-embedded spleen sections from representative control (Ctrl) or *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mice demonstrated the infiltration of hematopoietic populations in *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ mice.

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213



Supplemental figure 4. Mice transplanted with *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ bone marrow develop a myeloproliferative disease. (**A**) Q-PCR analysis of the *Tif1γ* floxed exons in PB from control (Ctrl) or *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) transplanted mice. Data are the means ± s.d. of the values from experiments performed in triplicate. (**B**) Peripheral monocyte counts in Ctrl or Δ/Δ transplanted mice. The results are shown as the means ± s.d. (**C**) (Upper panel) Flow cytometry analysis of cell populations from total BM cells of mice transplanted with BM from representative Ctrl or Δ/Δ mice. (Lower panel) Flow cytometry analysis of cell populations from spleen of mice transplanted with BM from representative Ctrl or Δ/Δ mice. (**D**) Flow cytometry analysis of cell populations from total BM cells of mice transplanted with BM from representative Ctrl or Δ/Δ mice. (**E**) Representative FACS staining profiles of the progenitor populations, including CMPs (lower right panel), MEPs (lower left panel), and GMPs (upper right panel), from the respective Ctrl or Δ/Δ transplanted mice. (**F** and **G**) *Tif1γ*$^{\Delta/\Delta}$ mice transplanted with control BM cells do not develop a myeloproliferative disease. Control BM cells were transplanted into lethally irradiated Δ/Δ or Ctrl recipient mice. Differences observed in the distribution of LSK cells and progenitors of control mice between panels D, E and F, G may be explained by the genetic background of the recipient mice. Flow cytometry analysis of cell populations from total BM of representative control Ctrl or Δ/Δ mice.

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213



Supplemental figure 5. Tif1γ deficiency decreases *cfms* expression and alterates macrophage differentiation. (**A**) (**B**) RQ-PCR analysis of *cfms*, *g-csfr*, *and gm-csfr* from total BM (left panel) or Lin- cells (right panel) of control (Ctrl) or *Tif1*$\gamma^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mice. Data are the means ± s.d. of the values from independent experiments (**p* values are defined in Methods). (**C**) ***Tif1γ*** deletion results in decreased macrophages in the peritoneum. The total number of intraperitoneal macrophages from control (Ctrl) and *Tif1*$\gamma^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mice is summarized. (**D**) Photomicrographs of control (Ctrl) or *Tif1*$\gamma^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) peritoneal macrophages cultured during 24h. (**E**) Plasmatic concentration of M-CSF and G-CSF from control (Ctrl) and *Tif1*$\gamma^{\Delta/\Delta}$ (Δ/Δ) mice.

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213

	Low Tif1γ	Normal Tif1γ
Number of cases	21	39
Mean age [range]	73.2 [51-91]	72.1 [50-84]
Sex ratio	2	2.1
At diagnosis		
Mean hemoglobin g/L [range]	119 [71-149]	117 [84-140]
Mean platelet count 10^9/L [range]	155 [10-300]	137 [3-379]
Mean leucocyte count 10^9/L [range]	19.0 [3.8-92.7]	14.4 [2.0-85.6]
Mean monocyte count 10^9/L [range]	5.1 [1-46]	4.4 [1-30.8]
>13.10^9 monocyte/L (%)	53%	32%

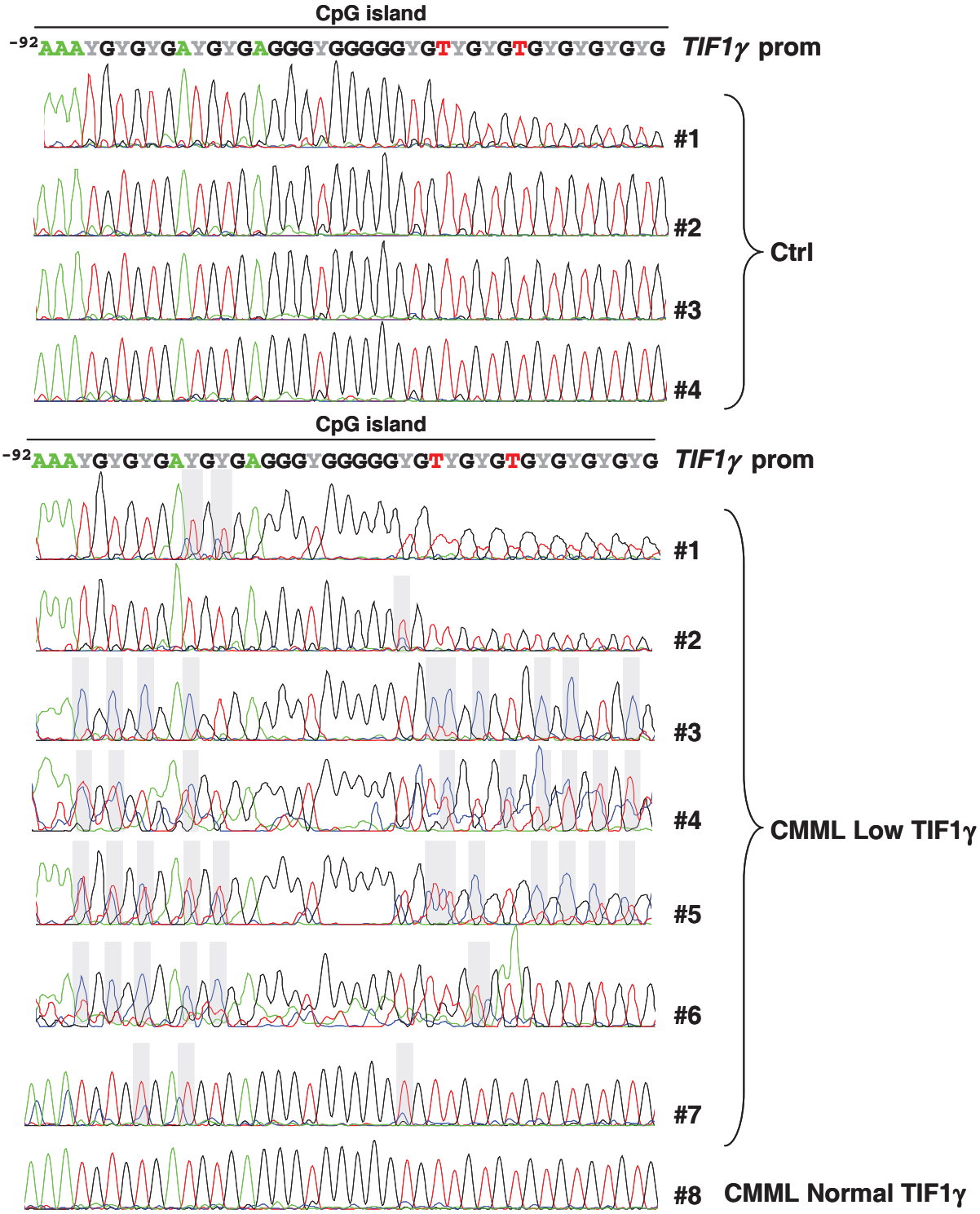
Supplemental table 1. Clinical and biological characteristics of the CMML patients in whom *Tif1γ* mRNA expression was analyzed.

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213

	All
Number of cases	66
Mean age [range]	70.37 [50-93]
Sex ratio	2.14
At diagnosis	
Mean hemoglobin g/L [range]	116 [52-163]
Mean platelet count 10^9/L [range]	163 [3-411]
Mean leucocyte count 10^9/L [range]	14.3 [3.5-85.6]
Mean monocyte count 10^9/L [range]	3.3 [1-30.8]
>13.10^9 monocyte/L (%)	46%

Supplemental table 2. Clinical and biological characteristics of the CMML cohort used for *TIF1γ* sequencing.

Downloaded on April 23, 2013. The Journal of Clinical Investigation. More information at www.jci.org/articles/view/45213



Supplemental figure 6. *TIF1γ* is an epigenetically-regulated tumor suppressor gene in CMML. Sequencing of the bisulfite modified *TIF1γ* promoter sequence from normal monocytes of healthy donors (Ctrl) or CMML patients. CMML patient #8 is a representative patient who harbors a normal level of TIF1γ.

Biochimica et Biophysica Acta 1833 (2013) 1936–1946

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr

A role for miR-142-3p in colony-stimulating factor 1-induced monocyte differentiation into macrophages

Brice Lagrange [a,1,2], Romain Z. Martin [a,1], Nathalie Droin [b], Romain Aucagne [a,3], Jérôme Paggetti [a,4], Anne Largeot [a], Raphaël Itzykson [b], Eric Solary [b], Laurent Delva [a,*,1], Jean-Noël Bastie [a,c,1]

[a] Inserm U866, Labex LipSTIC team, Faculté de Médecine, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France
[b] Inserm U1009, Labex LipSTIC team, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France
[c] Hôpital Universitaire (CHU Le Bocage), Department of Clinical Hematology, 21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 6 December 2012
Received in revised form 1 April 2013
Accepted 9 April 2013
Available online 17 April 2013

Keywords:
Molecular circuitry
Monocyte–macrophage differentiation
MiR-142-3p
Egr2
Chronic myelomonocytic leukemia

ABSTRACT

The differentiation of human peripheral blood monocytes into macrophages can be reproduced ex vivo by culturing the cells in the presence of colony-stimulating factor 1 (CSF1). Using microarray profiling to explore the role of microRNAs (miRNAs), we identified a dramatic decrease in the expression of the hematopoietic specific miR-142-3p. Up- and down-regulation of this miRNA in primary human monocytes altered CSF1-induced differentiation of monocytes, as demonstrated by changes in the expression of the cell surface markers CD16 and CD163. One of the genes whose expression is repressed by miR-142-3p encodes the transcription factor Early Growth Response 2 (Egr2). In turn, Egr2 associated with its co-repressor NGFI-A (Nerve Growth Factor-Induced gene-A) binding protein 2 (NAB2) binds to the pre-miR-142-3p promoter to negatively regulate its expression. Interestingly, the expression of miR-142-3p is abnormally low in monocytes from patients with the most proliferative forms of chronic myelomonocytic leukemia (CMML), and miR-142-3p re-expression in CMML dysplastic monocytes can improve their differentiation potential. Altogether, miR-142-3p which functions in a molecular circuitry with Egr2 is an actor of CSF1-induced differentiation of human monocytes whose expression could be altered in CMML.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Human peripheral blood monocytes are seminal effectors and regulators of the host inflammatory and innate immune responses. They are produced in the bone marrow, circulate in the blood, and enter into tissues under inflammatory conditions to give rise to a variety of macrophages and inflammatory dendritic cells, depending on their environment [1]. *Ex vivo* exposure of monocytes to colony-stimulating factor 1 (CSF1), also known as macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), induces their differentiation into macrophages.

CSF1 signals through the CSF1 receptor tyrosine kinase (CSF1R), encoded by the *C-FMS* proto-oncogene [2], to trigger a series of phosphorylation cascades that mediate this cellular response [3,4]. The interaction of CSF1 with its receptor generates waves of phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)/Akt activation, leading after 2–3 days to the activation of caspases that actively contribute to the formation of resting macrophages [3,5,6]. These signaling pathways may also connect CSF1R to the transcription machinery [7]. For example, MafB and c-Maf could prevent the proliferation of differentiated monocytes and macrophages [8] whereas Egr2 (early growth response 2, also known as Krox20) activates macrophage-specific genes such as *C-FMS*, in cooperation with Spi-1/PU.1 [9–11].

A role for microRNAs (miRNAs) in the complex regulatory network that governs monocyte differentiation into macrophages has been identified. When inducing the differentiation of human monocytes into macrophages with a so-called M1, pro-inflammatory phenotype, GM–CSF provokes a decrease in the expression of miR-223, miR-15a, and miR-16, which may contribute to this specific phenotype [12]. The miRNAs involved in the CSF1-induced differentiation of monocytes, leading to macrophages with a M2 anti-inflammatory phenotype, are less known, even though *C-FMS* expression has been shown to be

Abbreviations: cAMP, cyclic 3′5′-adenosine monophosphate; CCNT2, cyclin T2; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; CSF1, colony-stimulating factor 1; CUX1, cut-like homeobox 1; EGR2, early growth response 2; GFI-1, growth factor independent-1; KLF4, Krüppel-like factor 4; MAFB, musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B; M-CSF, macrophage-colony stimulating factor; miRNA, microRNA; NAB2, nerve growth factor-induced gene-A binding protein 2; NR3C1, nuclear receptor subfamily 3 group C member 1 glucocorticoid receptor; PI3K, phosphatidyl inositol 3-kinase; RTK, CSF1 receptor tyrosine kinase; RAC1, ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; Spi-1, spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene; TAB2, TGF-β activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2

* Corresponding author at: Inserm U866, Faculté de Médecine, Université de Bourgogne, 7, boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France. Tel.: +33 380393440; fax: +33 380393434.
E-mail address: Laurent.Delva@u-bourgogne.fr (L. Delva).

[1] These authors contributed equally to this work.
[2] Present address: Inserm U851, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Université Claude Bernard Lyon I, 69000 Lyon, France.
[3] Present address: IRIC, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.
[4] Present address: CRP-Santé Laboratoire d'Hémato-Cancérologie Expérimentale, 1526 Luxembourg, Luxembourg.

0167-4889/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.007

indirectly regulated by miRNAs 17-5p-20a-106a that repress the transcription factor RUNX1 and by miR-155 that targets Spi-1/PU.1 and C/EBPβ [13,14].

We report here that miR-142-3p is a regulator of CSF1-induced macrophage differentiation and forms with Egr2 a positive feedback loop. More precisely, exposure of human monocytes to CSF1 induces a decrease in the expression of miR-142-3p, which enhances the expression of the transcription factor Egr2. In turn, Egr2 interacts with the miR-142-3p promoter to down-regulate its expression. The expression of this miRNA can be down-regulated in monocytes from patients with chronic myelomonocytic leukemia (CMML), a myeloproliferative/myelodysplastic syndrome which main characteristic is the accumulation of monocytes in peripheral blood, bone marrow and spleen [15].

2. Material and methods

2.1. Cell culture, differentiation and treatment

The human erythroleukemic K562 cell line (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and human purified monocytes were grown in RPMI 1640 Glutamax medium (BioWhittaker, Cologne, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (BioWhittaker), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μg/mL), and amphotericin B (0.25 μg/mL) (BioWhittaker). Mononucleated cells were selected by Ficoll Hypaque (Eurobio, Les Ulis, France). The AutoMacs system (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) was then used to perform cell enrichment. Positive selection with CD14+ magnetic isolation kit (Miltenyi Biotec) was performed for monocyte enrichment for the purpose of miR-142-3p and Egr2 expression analyses. Concerning monocyte transfection, negative selection was used (Miltenyi Biotec). Monocytes were plated at 0.5×10^6 cells/mL and incubated for different times in the presence or absence of CSF1 (100 ng/ml) (Miltenyi Biotec), at 37 °C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Cell morphology was analyzed on cytospin slide preparations stained with May–Grünwald–Giemsa.

2.2. Constructs

A fragment of 1210 bp, encompassing the entire human Egr2 3′UTR, was PCR-amplified with the following sense (5′-GATGAGACTCAGGCTG ATACACCAGCTCCC-3′) and antisense (5′-ATTGTTGAAAAGTATTTATTTA CACTATAGTCACAAACCATCC-3′) primers using standard procedures and a proofreading polymerase (Platinum Pfu) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The cDNA clone, which contains the full length of Egr2 3′ UTR was used as template. The PCR product was sub-cloned into the pCR 2.1 vector (Invitrogen). The Egr2 3′UTR inserts were removed from the pCR 2.1 plasmid by XbaI digestion and ligated into a XbaI site located downstream of the firefly luciferase (f-luc) reporter gene (pGL3-Promoter vector) (Promega, Madison, WI, USA) driven by a 202 bp 5′ flanking region from human SV40 gene. The authenticity and orientation of the inserts relative to the luciferase gene were confirmed by sequencing. The resulting plasmids were designated pEgr2 3′UTR. Point mutations in miR-142-3p seed region were introduced with the QuikChange site-directed mutagenesis kit II (Stratagene, Santa Clara, CA, USA) by using the pEGR2 3′UTR vector as template, and by following the protocol provided in the kit. Mutagenesis was performed with the following sense (5′-GCACAACGACCCC GAGCACCCTTTCCTGTCC-3′) and antisense (5′-GGACAGGAAAGGGT GCTCGGGGTCGTTGTGC-3′) primers. Mutations were confirmed by sequencing.

2.3. MicroRNA microarray analysis

In order to prepare RNA samples for miRNA microarray or miRNA quantification, total RNA enriched with small RNAs was isolated using mirVana miRNA isolation kit (Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's protocol. RNA preparations from monocytes and CSF1-treated monocytes were sent to LC Sciences™ (Houston, TX, USA) for miRNA microarray analysis using the mParaflo microfluidic chips and detailed process can be found at http://www.lcsciences.com. The microarray data reported in this study have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ (accession number GSE31306).

2.4. Flow cytometry analysis

Fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis was performed on untreated or CSF1-treated monocytes. In brief, single-cell suspension was prepared and stained with primary antibodies. The cells were washed twice in PBS and re-suspended in PBS/0.1% bovine serum albumin (BSA 1%). Antibodies were added and incubated on ice. Antibodies CD16-PE, CD14-PE, CD163-PE, and CD71-APC were purchased from BD Biosciences. Flow cytometry was performed on LSRII (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) using DIVA software (Becton Dickinson), and automatically compensations were applied. The results were analyzed using FlowJO software.

2.5. RNA isolation, reverse transcription, quantitative real-time PCR, 5′-RACE

Total RNA was extracted with TRI Reagent® (Ambion, Austin, TX, USA) and reverse transcribed with random primer (Promega). Quantitative real-time PCR was performed in triplicates in an Applied Biosystems 7500 Fast thermocycler (Foster City, CA, USA). For Pri-miRNA expression, commercial ready-to-use primers/Taqman probe mixes were used (Applied Biosystems) (pri-miR-142: Hs03303162_pri). Expression of mature miR-142-3p was determined using miRNA-specific quantitative real-time PCR assay (Applied Biosystems, 000464). Human *cyclophilin A* (Hs99999904_m1*) and *RNU6B* (Applied Biosystems, 0001093) were used as endogenous controls. For *EGR2* expression, quantitative real-time PCR was performed using SyBr Green detection protocol as outlined by the manufacturer. Briefly, 15 ng of total complementary DNA, 50 nM of each primer and 1× SyBr Green mix were used in a total volume of 20 μl. The human specific forward and reverse primers were: *L32*, 5′-TGTCCTGAATGTGGTCA CCTGA-3′ and 5′-CTGCAGTCTCCTTGCACACCT-3′ used as a standardizing control, *EGR2*, 5′-GCCCTTCGCCTGTGACTACT-3′ and 5′-GTGG CGCTTCCTCTCATCA-3′. *L32* was used as internal control. 5′ Rapid amplification of cDNA ends (5′-RACE) was carried out using the TaKaRa 5-Full RACE Kit (TaKaRa Bio. Inc., Shiga, Japan) according to the manufacturer's instructions. Two rounds of 5′ RACE-PCR were performed. The 5′ RACE product was gel purified, cloned into the pMD19-T vector (TaKaRa Bio. Inc.), then sequenced. The human 5′ end-phosphorylated RT primer was 5′-CCACATGTCCAG-3′. The specific primers used for RACE were the following: A1, 5′-AGACAG GCAGCCGCACATGAGAA-3′; S1, 5′-TTCGGAGATCACGCCACTGCT-3′; A2, 5′-CCGACGGGTCCGGAGGACTGA-3′; S2, 5′-CCACCATCTTCCTCG GCGCTC-3′.

2.6. Western-blot analysis

Untreated or CSF1-treated monocytes were re-suspended in cooled lysis buffer (1% SDS, 1 mM sodium vanadate, 10 mM Tris pH 7.4, protease inhibitor cocktail). Samples were incubated on ice for 30 min. Total protein extracts were boiled in Laemmli buffer then separated by SDS-PAGE and electro-blotted to a nitrocellulose membrane. Equivalent loading of lanes was controlled with Ponceau Red Stain (data not shown). Membranes were blocked in 1× PBS-T (0.1%) and fat-free dry milk (5%) during 1 h at room temperature. Membranes were incubated with anti-Egr2 (Aviva Systems Biology LLC, San Diego, CA, USA), anti-Egr1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-HSC70 (Santa Cruz Biotechnology) or anti-Actin

(Santa Cruz Biotechnology) diluted in blocking buffer at 4 °C overnight, then washed three times in 1× PBS-T (0.1%) during 10 min each. The secondary anti-rabbit antibodies conjugated with horseradish peroxidase were added, and the membranes were incubated at room temperature during 1 h. Membranes were washed three times in 1X PBS-T (0.1%) during 10 min each. ECL Western blotting reagent kit (Millipore, Billerica, MA, USA) was used for protein detection.

2.7. Transfections

Partially double-stranded RNAs that mimic miR-142-3p endogenous precursor or anti-miR™ miRNA inhibitor and miRNA negative control (scrambled) were obtained from Ambion. Five millions of monocytes or 3 to 5 × 10^6 of K562 cells were transfected with 500 pmol of precursor or siRNA, by nucleoporation, according to the manufacturer's protocol (Amaxa, Lonza, Cologne, Germany). For the luciferase activity assay, K562 cells were co-transfected by nucleoporation with 1 μg of mutated or non-mutated pEgr2 3′UTR vector and 100 ng of pCMV-β-Gal vector. Cells were harvested 24 h post-transfection, assayed with Luciferase Assay System and normalized with Beta-Galactosidase Enzyme Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. The siRNA, synthesized by Invitrogen, targets human Egr2 (siEgr2) (sense: 5′-*GGAUCUCCCAUAUCCCAGCAGCUUU*-3′). A luciferase siRNA (siLUC) was used as a negative control (sense: 5′-*CUUACGCUGAGUACUUCG Att*-3′).

2.8. ChIP assays

Briefly, 5 × 10^6 (or 0.5 × 10^6 for ChIP with anti-Me_3H3K4) of treated and untreated monocytes were fixed with 1% formaldehyde to cross-link DNA with proteins, lysed and sonicated to obtain DNA fragments of 200–1000 bp. After pre-clearing with salmon sperm DNA/protein A agarose beads, the samples underwent immunoprecipitation with antibodies specific to Egr2, NAB2, IgG, IgA (Santa Cruz Biotechnology), Me_3H3K4 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), or no antibody (Control ChIP) at 4 °C overnight. Beads were washed, protein/DNA complexes eluted, then cross-links reversed by heating at 65 °C overnight. After RNA and protein digestions, DNA was purified on a spin column (NucleoSpin Extract II: Macherey-Nagel, Düren, Germany). For sequential ChIP assays, the primary immunoprecipitation (IP) was done using Egr2 or NAB2 antibody. The immunoprecipitated complexes were eluted with ChIP buffer. The eluate from Egr2 or NAB2 IP was re-immunoprecipitated with the antibody corresponding to the other protein. Quantization by quantitative real-time PCR of co-immunoprecipitated *pre-miR-142* promoter fragments, encompassing the putative Egr2 binding site, was performed in triplicate using the SYBR green dye detection method with the following primers, designed by the Primer Express software (Applied Biosystems), 5′-ACCCTCAATGCCCTGAGTCA-3′ (forward) and 5′-CGTG GCACCAGCTCCAA-3′ (reverse); input corresponding to total sonicated DNA was used as cell number control. Delta–delta Ct values of each immunoprecipitated sample were normalized with those obtained from the amplification of their respective input and by subtracting the values obtained in the corresponding samples incubated without antibodies.

2.9. Statistical analysis

Mann–Whitney *U* test and two-tailed *t*-test were used for statistical analysis. Differences were considered significant when *p* was less than .05. In all cases, * represents *p* less than .05; **, *p* less than .01; and ***, *p* less than .001.

3. Results

3.1. MiR-142-3p is down-regulated during human macrophage differentiation

In order to identify miRNAs that could be involved in CSF1-driven differentiation of human monocytes into macrophages, we sorted peripheral blood monocytes from healthy donors and treated these cells during six days with CSF1 to generate resting macrophages, identified by cytologic (not shown) and phenotypic criteria (Supplemental Fig. 1). We then compared by microarray analysis the miRNA profile in monocytes and derived macrophages. Clustering analysis showed significant changes in the expression of 88 miRNAs. Among those, 43 miRNAs showed an increased expression whereas 45 were decreased (Fig. 1 and Supplemental Table 1) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ (accession number GSE31306)). We focused our investigation on miR-142-3p, which was the most down-regulated miRNAs in this analysis. Quantitative real-time PCR validated the differentiation-associated gradual and dramatic decrease in miR-142-3p expression upon CSF1-induced differentiation of monocytes into macrophages (Fig. 1).

To get insights into the role of miR-142-3p in CSF1-induced differentiation of monocytes, we expressed a synthetic pre-miRNA and an antagomir in these primary cells before exposure to CSF1. The changes induced in miR-142-3p were validated 24 h later, and the changes induced in surface marker expression were examined 48 h later. Modulation of miR-142-3p expression affected some of the phenotypic changes associated with CSF1-induced differentiation. Down-regulation of miR-142-3p with an antagomir provoked a decrease in the expression of CD16 and CD163 without affecting the differentiation associated changes in CD14 and CD71 expression (Fig. 2A). Conversely, enforced expression of miR-142-3p induced an increase in the expression of CD16 and CD163 at the cell surface (Fig. 2B). Enforced expression of miR-142-3p also down-regulated the expression of 2 of 30 myeloid specific genes screened by quantitative real-time PCR after 24 h of CSF1 treatment (Supplemental Table 2), namely *CUX1* (*cut-like homeobox 1*) and *KLF4* (*Krüppel-like factor 4*) genes (Fig. 2C).

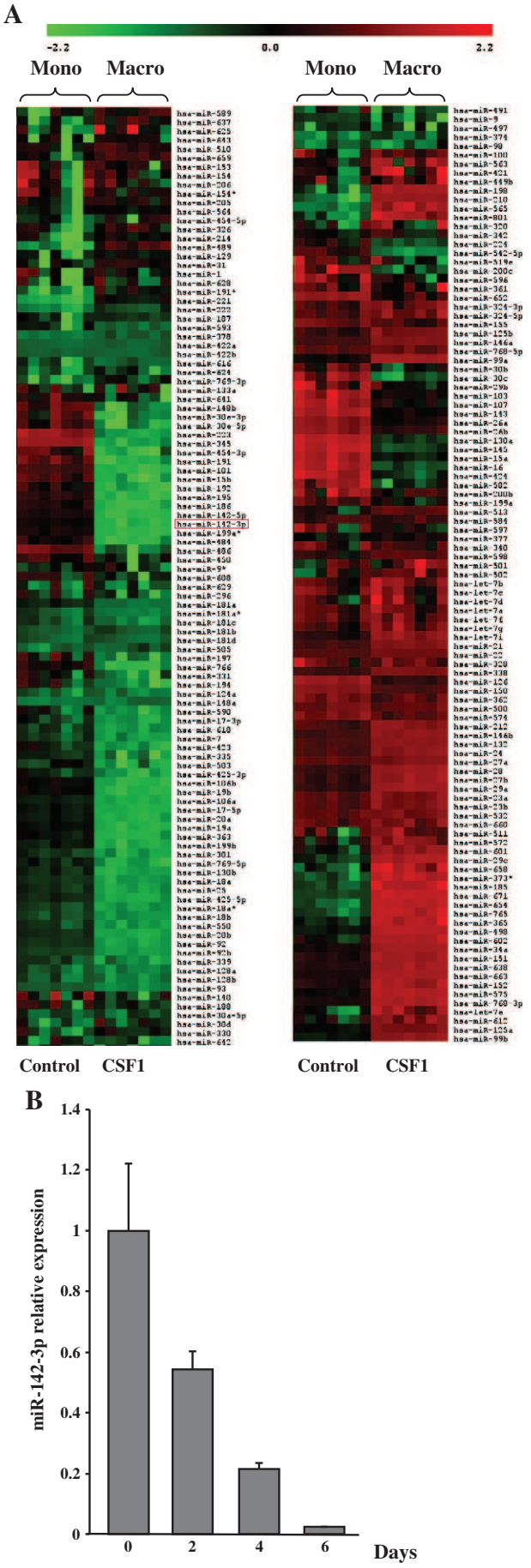
These results argued for a contribution of miR-142-3p to CSF1-induced differentiation of primary monocytes into macrophages.

3.2. MiR-142-3p inhibits Egr2

In silico analysis identified a miR-142-3p complementary seed sequence in the 3′UTR of Egr2 gene (Fig. 3A). Egr2 gene encodes a transcription factor involved in myeloid cell differentiation. More precisely, Egr2 inhibits granulocytic differentiation by repressing GFI-1 transcription factor expression, while promoting monocyte differentiation in cooperation with Spi-1/PU.1 by increasing the expression of *cFMS* gene [9,10]. In turn, CSF1 enhances the expression of Egr2 in peripheral blood monocytes [11].

Using quantitative real-time PCR analysis, we observed that exposure of primary monocytes to CSF1 induced a rapid increase in Egr2 gene expression, reaching a peak 2 h after the beginning of cell treatment, then decreasing within a few hours to return to its basal level (Fig. 3B). The corresponding protein, which was hardly detected in untreated monocytes, accumulated within a few hours upon CSF1 treatment (Fig. 3C, upper panels). Meanwhile, the expression of miR-142-3p and that of its precursor pri-miR-142-3p progressively declined (Fig. 3B).

To determine whether Egr2 was a direct target of miR-142-3p, reporter plasmids containing the Egr2 3′UTR with the binding site for miR-142-3p and the mutated internal control were co-transfected with pre-miR-142-3p into K562 cells. MiR-142-3p produced from pre-miR-142-3p repressed the expression of luciferase fused to the WT Egr2 3′UTR (Fig. 3D), and failed to repress the Egr2 3′UTR containing a mutated miR-142-3p seed sequence (Fig. 3A, D), indicating that miR-142-3p directly targets the Egr2 3′UTR. Expression of an antagomir specifically targeting miR-142-3p in primary human



monocytes induced a 30–40% increase in the expression of Egr2 at the mRNA and protein levels, respectively (Fig. 3E, F). Conversely, transient overexpression of the pre-miR-142-3p in these cells (Supplemental Fig. 2) decreased the expression of Egr2 mRNA or protein (Fig. 3C lower panels, G). The effect of overexpressed miR-142-3p on Egr2 protein levels was observed 3 h after CSF1 treatment, when Egr2 protein level reaches a peak. Egr1 expression was also downregulated (Supplemental Fig. 3), confirming the association of both genes, particularly in macrophage differentiation [9].

Altogether, these data indicate that miR-142-3p down-regulates Egr2 expression through specific 3′UTR binding site.

3.3. MiR-142-3p expression is regulated by Egr2

TESS software was used to analyze all possible binding sites of Egr2. One canonical 5′-GCGGGGGCGG-3′ Egr2 binding site within 997 bp of the transcriptional start of the human miR-142 gene was found. 5′ RACE-PCR analysis performed on genomic DNA from human monocytes identified the putative transcription start site and the promoter region (Fig. 4A and Supplemental Fig. 4A, B). It was already reported using human K562 cells overexpressing miR-223 [16], with a slight difference concerning the location of the putative transcription start site. Therefore, the Egr2 binding site is located in the human promoter miR-142 gene.

In order to investigate whether Egr2 physically interacted with the *pre-miR-142* promoter region *in vivo*, we carried out ChIP analyses on CSF1-treated human monocytes. Sonicated chromatin prepared from these cells were subjected to chromatin immunoprecipitation using anti-Egr2. After crosslink reversal, a segment of the *pre-miR-142* promoter containing the Egr2 binding site, increasing 2 h after the beginning of CSF1 treatment, was amplified by quantitative real-time PCR (Fig. 4B). The transcription partner of Egr2, NAB2 (NGFI-A-binding protein 2), which regulates the transactivation activity of Egr2 [17,18] and behaves as a co-repressor, was also bound in *pre-miR-142* promoter (Fig. 4C), and ChIP/re-ChIP experiments indicated that both proteins were recruited simultaneously (Fig. 4D). Then we assessed by ChIP the level of the H3K4 trimethylation (Me_3H3K4) epigenetic mark that correlates with mammalian gene activation. A fall in the enrichment of this histone post-translational modification was observed after 1 h of CSF1 treatment (Fig. 4E and Supplemental Fig. 5), correlated with the decrease of miR-142-3p and pri-miR-142-3p expression (Fig. 3B). RNAi-mediated down-regulation of EGR2 in CSF1-treated monocytes (Fig. 4F) induced a 2-fold increase in miR-142-3p expression (Fig. 4G).

These results indicate that Egr2 and its co-regulator NAB2 interact with the *pre-miR-142* promoter in CSF1-treated human monocytes to provoke its down-regulation.

Altogether, these data show that a feedback loop between miR-142-3p and Egr2 is operating during early CSF1-induced macrophage differentiation.

3.4. MiR-142-3p is down-regulated in a high number of chronic myelomonocytic leukemia patients

Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a myelodysplastic/myeloproliferative syndrome in which monocytes and dysplastic immature granulocytes accumulate in the bone marrow, peripheral blood (PB), and spleen [15]. Clonal cytogenetic abnormalities have been observed in ~30% of the patients, uniparental disomy in more

Fig 1. CSF1 induces down-regulation of miR-142-3p in human primary CD14+ monocytes. (A) Heatmap representation of differentially regulated miRNAs in monocytes before and after 6 days after CSF1 exposure. Red denotes high expression and green low expression. Total RNA was divided in 7 samples. Hybridization experiments were performed by the LC Sciences™ company. (B) MiR-142-3p expression (quantitative real-time PCR) in CSF1-treated monocytes after 2, 4, and 6 days of treatment. Data are means ± standard deviation of the values from one representative experiment performed in triplicate out of three.

than 50% of cases, and gene mutations in all the cases in which exome sequencing was performed ([19,20], and personal data). However, none of these aberrations is specific of the disease and how they contribute to CMML emergence and progression remains a matter of active investigation (Itzykson et al., submitted).

The expression of miR-142-3p was measured in peripheral blood monocytes sorted from 103 patients with a CMML and healthy donors (Supplemental Table 3). This analysis revealed a significant lower level of miR-142-3p in CMML patients compared with healthy donors (Fig. 5A). The CMML patients were separated into two groups, based on the distribution of miR-142-3p expression (Supplemental Fig. 6). The white blood cell count and the monocyte count (Fig. 5B) were significantly higher in CMML patients harboring low level of miR-142-3p. Since leukocyte count is a negative prognostic factor in this chronic leukemia [21] (and Itzykson et al., submitted), these results suggest that the decrease in miR-142-3p expression likely affects the disease outcome.

Immunoblot analysis indicated that monocytes from CMML patients with low miR-142-3p expressed high levels of Egr2 protein whereas the expression of Egr2 mRNA was similar between CMML patients and healthy donors (Fig. 5C, D).

Re-expression of miR-142-3p in CMML monocytes through transfection with a synthetic precursor followed by the exposure of the cells to CSF1 *ex vivo*, increased the number of cells with a fibroblast-like shape that is characteristic of CSF1-driven monocyte differentiation (Fig. 6A), and increased the expression of CD163 and CD16 at the surface of differentiated cells (Fig. 6B). Altogether, these results indicated that the dysplastic status of CMML monocytes included a decreased expression of miR-142-3p and confirmed the contribution of this miRNA to some phenotypic aspects of CSF1-induced differentiation.

4. Discussion

Our study identifies the contribution of miR-142-3p to CSF1-induced differentiation of human monocytes and demonstrates that this miRNA is part of a molecular circuitry that also involves the transcription factor Egr2 (Fig. 7). The decreased expression of miR-142-3p in the monocytes of the most proliferative CMML patients enforces the demonstration that these leukemic monocytes are dysplastic with altered differentiation capabilities.

MiR-142-3p was identified as a hematopoietic specific miRNA [22] and its expression was detected in several hematopoietic cell lineages [23]. MiR-142-3p expression increases when human primitive stem/progenitor CD133^{+} hematopoietic cells differentiate into more committed CD133^{-} cells [24]. In this context, miR-142-3p directly represses CD133 expression [25]. In zebrafish, miR-142-3p was involved in the conversion from hematopoietic progenitor cells to mature erythrocytes [26]. Several functions of miR-142-3p in differentiated cells have been established, *i.e.* miR-142-3p restricts the production of cyclic 3′5′-adenosine monophosphate (cAMP) by targeting adenylyl cyclase (AC) 9 mRNA in T cells [27] and macrophages [28], negatively affects interleukin-6 production in dendritic cells exposed to lipopolysaccharides [29], and represses the glucocorticoid receptor *NR3C1* gene [30] and the RAC1 human small GTPase [31]. The down-regulation of miR-142-3p allows the elimination of regulatory T cells induced by low doses of cyclophosphamide [32]. Interestingly, it was proposed to introduce miR-142-3p target sequences in constructs used for gene

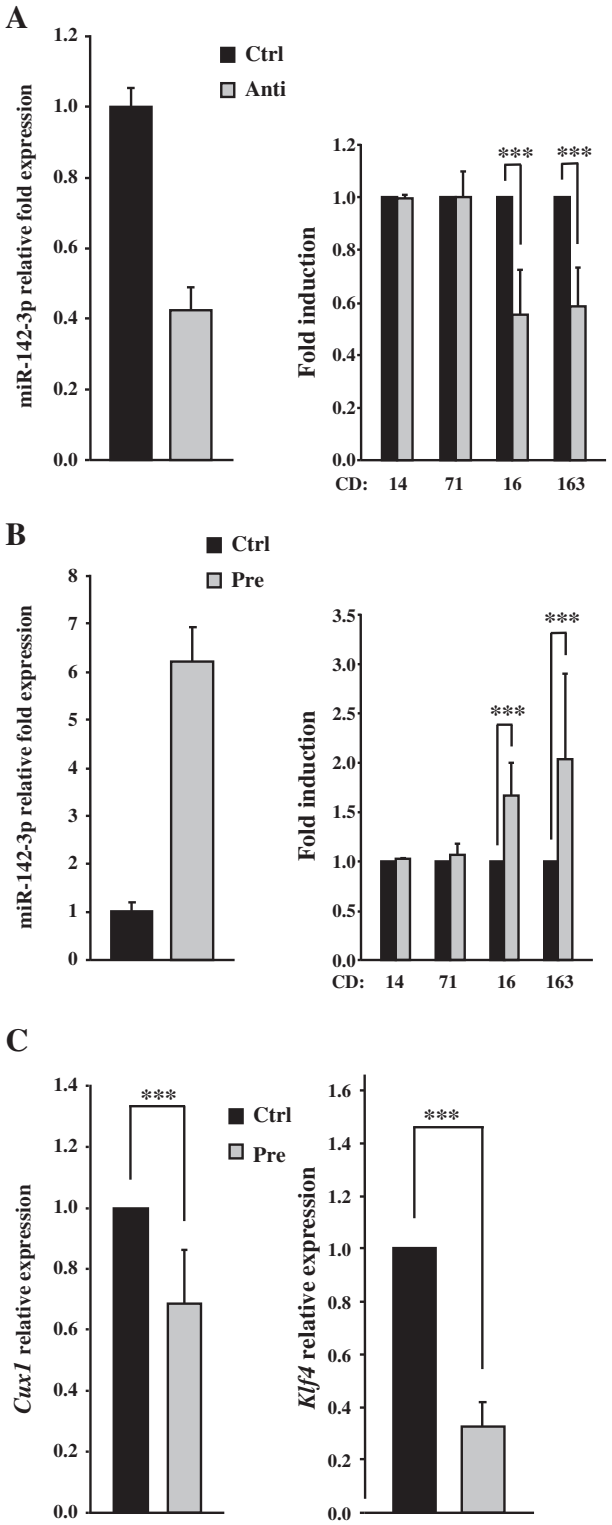


Fig. 2. Modulation of miR-142-3p expression provokes immunophenotypic changes during CSF1-mediated differentiation of normal CD14+ monocytes. (A) Expression of miR-142-3p, by quantitative real-time PCR, in monocytes 24 h after transfection with control Anti-miR (Ctrl) or Anti-miR-142-3p (Anti) (left panel). Data are means ± standard deviation of the values from one representative experiment performed in triplicate out of three. Monocytes transfected either with control Anti-miR (Ctrl) or Anti-miR-142-3p (Anti) were treated during 48 h with CSF1. FACS analysis of CD14, CD71, CD16, and CD163 of corresponding cells is shown (right panel). Error bars represent standard deviation and were obtained from three independent experiments. (B) Expression of miR-142-3p, by quantitative real-time PCR, in monocytes 24 h after transfection with control Pre-miR (Ctrl) or Pre-miR-142-3p (Pre) (left panel). Data are means ± standard deviation of the values from one representative experiment performed in triplicate out of three. Monocytes transfected either with control Pre-miR (Ctrl) or Pre-miR-142-3p (Pre) were treated during 48 h with CSF1. FACS analysis of CD14, CD71, CD16, and CD163 of corresponding cells are shown (right panel). Error bars represent standard deviation and were obtained from three independent experiments. (C) Expression (quantitative real-time PCR) of *Cux1* and *Klf4* in monocytes, treated with CSF1 during 24 h of treatment. Black columns represent control pre-miR (Ctrl) transfected cells whereas grey columns represent pre-miR-142-3p (Pre) transfected cells. Error bars represent standard deviation and were obtained from four independent experiments.

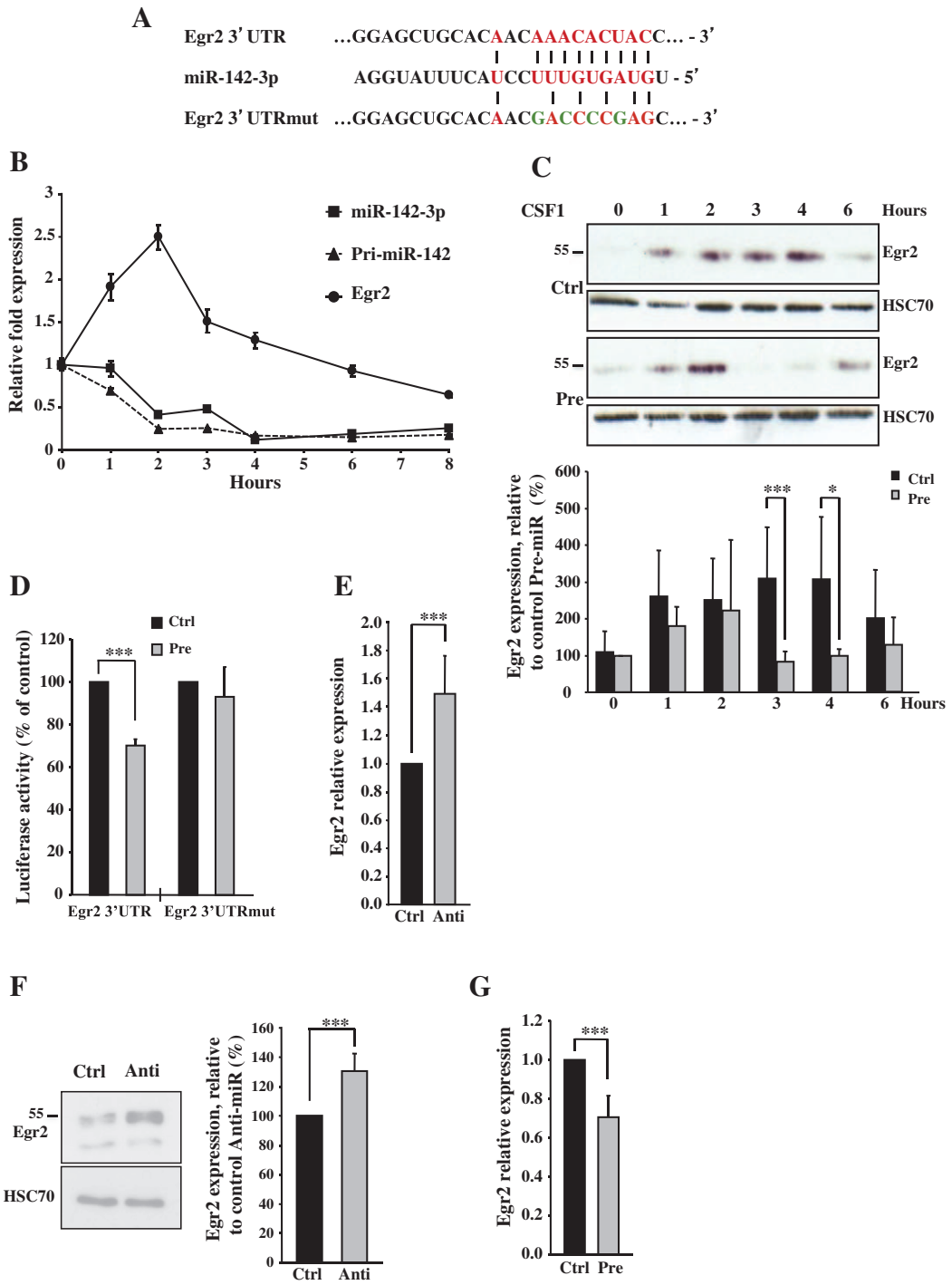


Fig. 3. MiR-142-3p inhibits Egr2. (A) Sites of miR-142-3p seed match in the Egr2 3′UTR, and description of the Egr2 3′UTR mutant (mut). The four nucleotides in site 71 in green font were mutated from AAAU to GCCG in the Egr2 3′UTR mutant plasmid. (B) Expression (quantitative real-time PCR) of miR-142-3p, Pri-miR-142, and Egr2 in CD14+ monocytes treated with CSF1. Data are means ± standard deviation of the values from one representative experiment performed in triplicate out of three. (C) CD14+ monocytes were transfected with control Pre-miR (Ctrl) or Pre-miR-142-3p (Pre). Twelve hours after, monocytes were treated during 6 h with CSF1. Total protein extracts obtained from the cells were run on a 10% SDS-PAGE, transferred, and probed with anti-Egr2 or anti-HSC70 (loading control). Quantitation of Egr2 protein from three independent experiments is also shown (lower panel). (D) Luciferase reporter assays were performed by transiently transfecting K562 cells with a control Pre-miR (Ctrl) or a Pre-miR-142-3p (Pre), the indicated 3′UTR luciferase reporter plasmids, and a plasmid producing β-galactosidase. Luciferase values were normalized to β-galactosidase, and the percent of luciferase activity in cells transfected with Pre-miR-142-3p is presented. Error bars represent standard deviation and were obtained from three independent experiments. (E) Expression of Egr2 by quantitative real-time PCR in CD14+ monocytes 24 h after transfection with control Anti-miR (Ctrl) or Anti-miR-142-3p (Anti). Error bars represent standard deviation and were obtained from four independent experiments. (F) Expression of Egr2 by immunoblotting in CD14+ monocytes 24 h after transfection with control Anti-miR (Ctrl) or Anti-miR-142-3p (Anti). Total extracts obtained from the cells were run on a 10% SDS-PAGE, transferred, and probed with anti-EGR2 or anti-HSC70 (loading control) (left panel). Quantitation of Egr2 protein from three independent experiments is also shown (right panel). (G) Expression of Egr2 (quantitative real-time PCR) in CD14+ monocytes 24 h after transfection with control Pre-miR (Ctrl) or Pre-miR-142-3p (Pre). Error bars represent standard deviation and were obtained from five independent experiments.

therapy to prevent transgene expression in hematopoietic lineages while permitting high levels of expression in non-hematopoietic cells [33].

In CSF1-treated human monocytes, we identified a dramatic down-regulation of miR-142-3p, as compared to other miRNAs. We then observed that changes in miR-142-3p expression level could

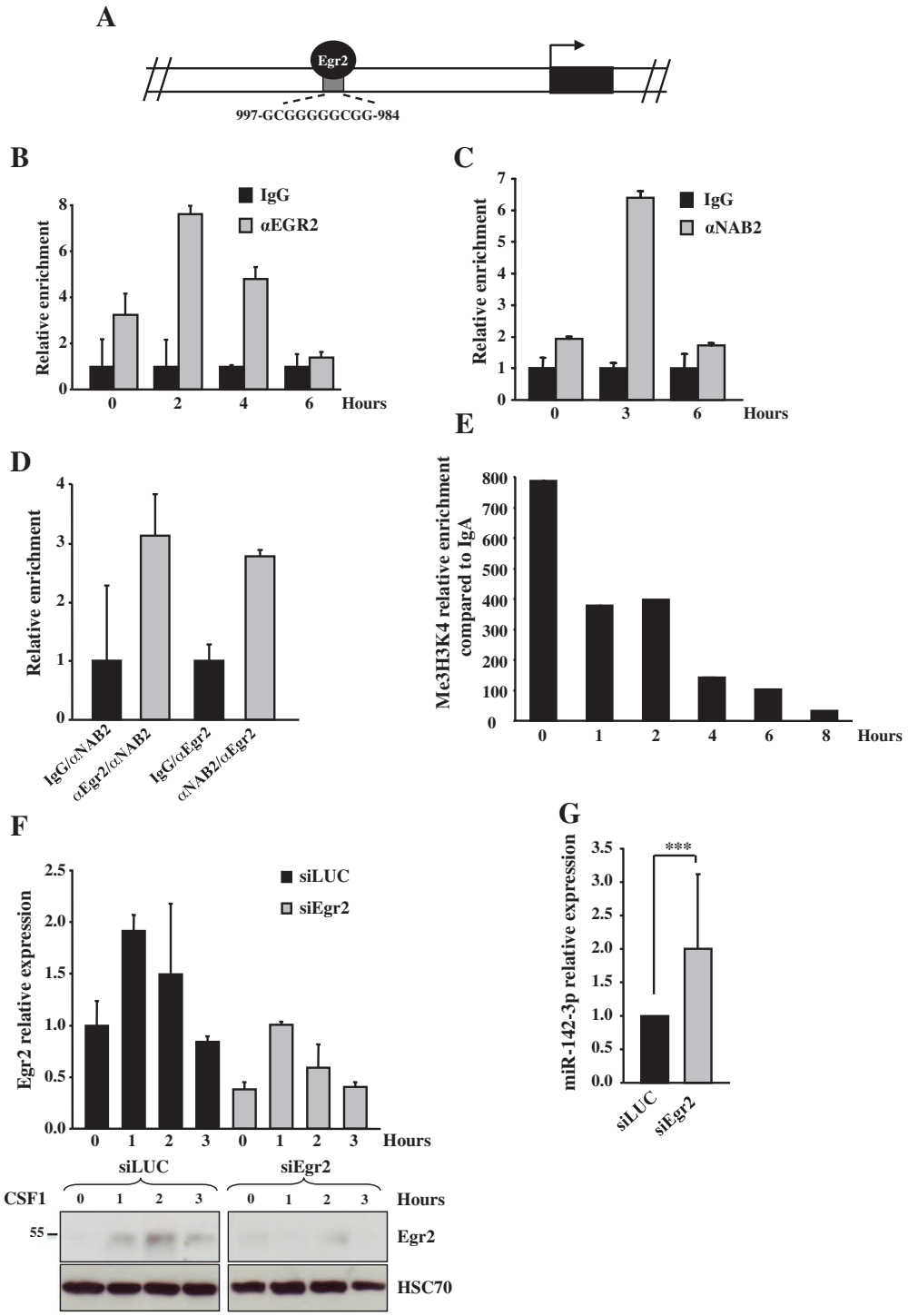


Fig. 4. Egr2 is recruited onto the *pre-miR-142* promoter. (A) Schematic representation of the *Pri-miR-142* genomic promoter. Arrow: the transcriptional start site. The sequence and location of the Egr2-binding site are indicated. (B) Chromatin from CD14+ monocytes at different times of induction was immunoprecipitated with an anti-Egr2 or an irrelevant IgG antibody, and the recovered DNA was submitted to quantitative real-time PCR using *pre-miR-142* promoter primers. Data are means ± standard deviation of the values from one representative experiment performed in triplicate out of three. (C) Chromatin from CD14+ monocytes at different times of induction was immunoprecipitated with an anti-NAB2 antibody or an irrelevant IgG antibody, and the recovered DNA was submitted to quantitative real-time PCR using *pre-miR-142* promoter primers. Data are means ± standard deviation of the values from one representative experiment performed in triplicate out of three. (D) ChIP-re-ChIP showing the occupancy of Egr2-NAB2 on the *pre-miR-142* promoter. Antibodies used for the first and second IP are indicated. Data are means ± standard deviation of the values from one representative experiment performed in triplicate out of three. (E) Chromatin from CD14+ monocytes at different times of induction was immunoprecipitated with an anti-Me_3H3K4 antibody or an irrelevant IgA antibody, and the recovered DNA was submitted to quantitative real-time PCR using *pre-miR-142* promoter primers. Data are means ± standard deviation of the values from one representative experiment performed in triplicate out of three. (F) CD14+ monocytes transfected either with control siRNA (siLUC) or siEgr2 were treated with CSF1. The expression of Egr2 (RQ-PCR) was examined in monocytes 24 h after transfection (upper panel). Error bars represent standard deviation and were obtained from three independent experiments. Total extracts obtained from the cells were run on a 10% SDS-PAGE, transferred, and probed with the anti-Egr2 antibody. HSC70 was used as loading control (lower panel). (G) Expression of miR-142-3p (quantitative real-time PCR) in CD14+ monocytes transfected either with control siLUC or siEgr2 treated for 6 h with CSF1. Error bars represent standard deviation and were obtained from five independent experiments.

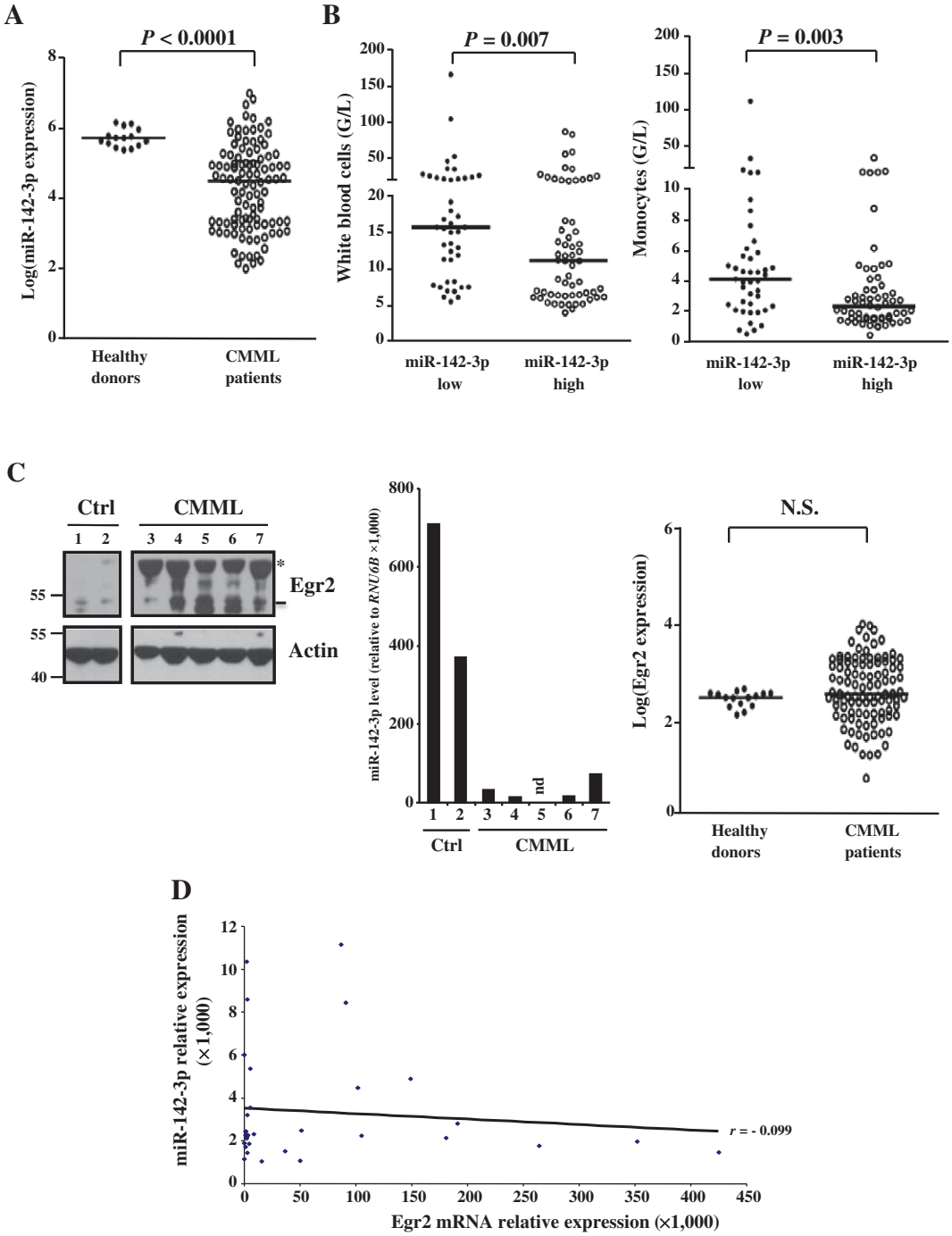


Fig. 5. MiR-142-3p is down-regulated in a high number of chronic myelomonocytic leukemia patients. (A) MiR-142-3p expression analysis (quantitative real-time PCR) (relative to *RNU6B* expression) in purified monocytes (CD14+ cells) from healthy donors (N = 15) or CMML patients (N = 103). Log-transformed expressions are displayed. (B) White blood cell (upper panel) and CD14+ monocyte (lower panel) counts from CMML patients with low (N = 43) or high (N = 60) miR-142-3p expression (according to the 4.0 log threshold, see Supplemental Fig. S2), showing increased counts in patients with low miR-142-3p expression. (C) Analysis of Egr2 (upper panel) and miR-142-3p (central panel) in CD14+ monocytes from healthy donors (lanes 1 and 2) or CMML patients (lanes 3 to 7). Upper panel: Total protein extracts were run on a 10% SDS-PAGE, transferred, and probed with anti-Egr2 or anti-Actin (loading control). * indicates dimers. Central panel: quantitative real-time PCR analysis of miR-142-3p expression (relative to *RNU6B* expression). Lower panel: analysis of Egr2 expression (quantitative real-time PCR) (relative to *L32* expression) in purified monocytes (CD14+ cells) from healthy donors (N = 15) or CMML patients (N = 103). Log-transformed expressions are displayed. N.S. (not significant). (D) Correlation analysis of miR-142-3p and Egr2 expression in CD14+ monocytes of 103 individuals with CMML. The scatter plot shows miR-142-3p and Egr2 mRNA expression. Expression values are expressed in arbitrary units. A linear regression curve and the correlation coefficient are indicated.

affect the differentiation process, as demonstrated by the altered expression of the surface markers CD16 and CD163. These observations led us to explore the possibility that miR-142-3p may regulate the expression of genes involved in the response to the cytokine, and *in silico* analyses led us to focus on Egr2 gene and identify a feedback-induced regulatory mechanism of Egr2 involving miR-142-3p. EGR proteins are transcription factors involved in both lymphoid and myeloid hematopoiesis [34]. Egr2 inhibits granulocytic differentiation by repressing GFI-1 expression and promotes the expression of *CSF1R* gene in cooperation with Spi-1/PU.1 [9,10]. In turn, CSF1 induces a rapid increase in Egr2 expression in monocytes [11]. The Egr2/miR-142-3p regulation is reminiscent of a recently described miR-17-92 circuitry

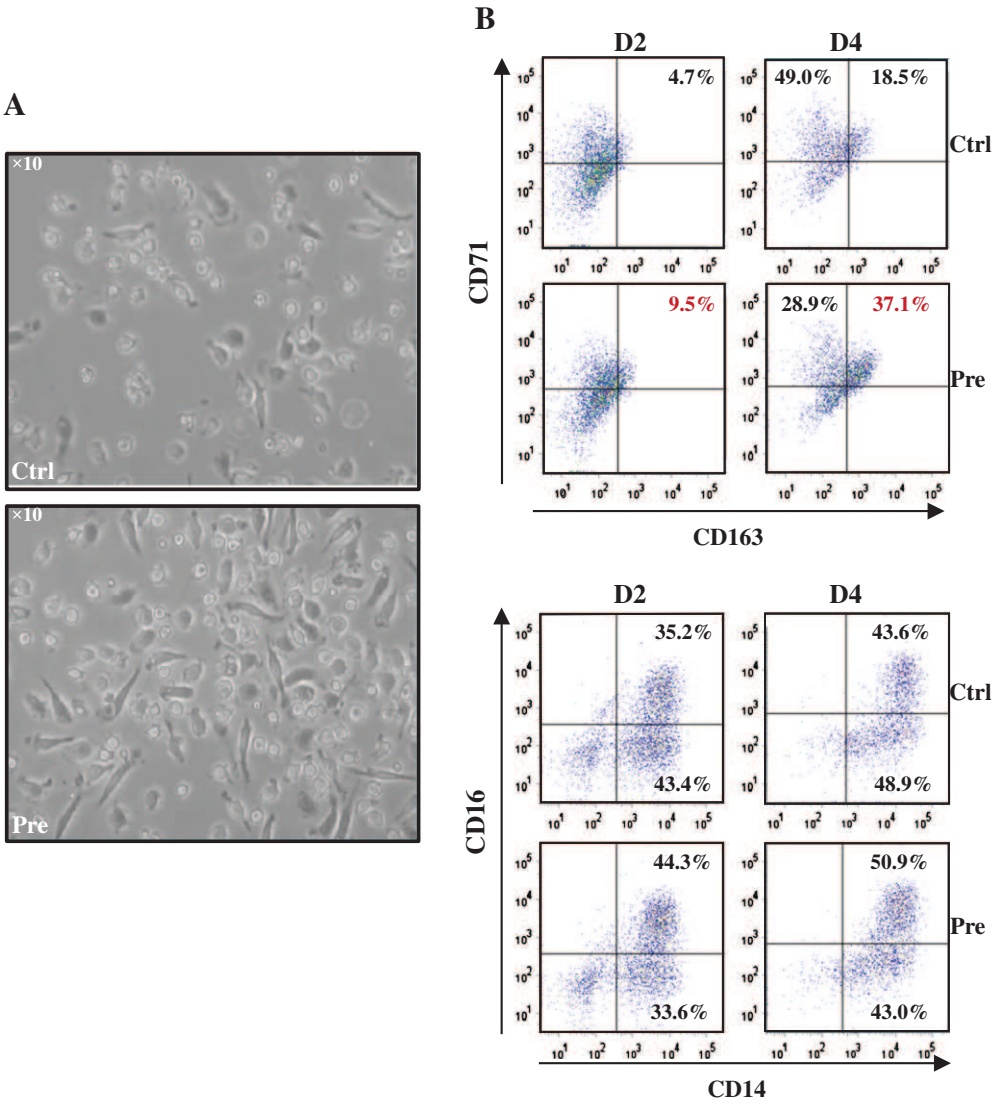


Fig. 6. MiR-142-3p is involved in CMML CSF1-induced macrophage differentiation *in vitro*. Monocytes (CD14+ cells) from CMML patients, transfected either with control Pre-miR (Ctrl) or Pre-miR-142-3p (Pre) were treated during 4 days with CSF1. (A) Phase contrast microscopy analysis. (B) FACS analysis of CD71, CD163, CD16, and CD14 of corresponding cells is shown.

driven by Spi-1/PU.1 transcription factor during earlier steps of the monocyte/macrophage differentiation [35], and of the one involving miR-223 and NFI-A during human granulopoiesis [36].

The decrease expression of miR-142-3p in monocytes of patients with a CMML did not correlate with mutations in *TET2*, *SRSF2* and *ASXL1* genes, the three most frequently mutated genes in CMML (Itzykson et al., submitted), nor with any other less frequent gene mutations (data not shown). The mechanisms that decrease the expression of miR-142-3p in leukemic monocytes remain to be identified. The correlation between a decreased expression of miR-142-3p in CMML monocytes and the number of white blood cells and monocytes in the peripheral blood could indicate that abnormally activated signaling pathways that are responsible for the proliferative form of the disease, play a role in miR-142-3p expression decrease. Interestingly, miR-142-3p expression is increased in peripheral blood mononucleated cells from patients with a chronic myelogenous leukemia [37], and in blast cells of those with a B-cell [38] or a T-cell [39] acute lymphoblastic leukemia. On the contrary miR-142-3p expression is decreased in mantle cell lymphoma cells [40] and in blast cells from patients with acute myeloid leukemia [41]. In this later context, miR-142-3p was demonstrated to suppress the expression of cyclin T2 (CCNT2) and TGF-β activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2 (TAB2) [41]. Again, the molecular mechanisms responsible for the deregulated expression of miR-142-3p in various hematological malignancies remain to be identified.

To the best of our knowledge, miR-142-3p is the first miRNA whose role in monocyte terminal differentiation upon CSF1 exposure has been identified. Our initial microarray analysis indicates up- and down-regulation of several other miRNAs in CSF1-treated monocytes, some of them being probably involved in this process. In addition, the miR-142-3p/Egr2 circuitry depicted in differentiating monocytes may play a role at earlier steps of hematopoietic cell differentiation, when Egr2 is involved in lineage choices, and miR-142-3p may target other genes involved in hematopoietic cell differentiation. Better understanding of the networks that implicate miR-142-3p will indicate the importance of its deregulated expression observed in several hematological diseases.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge all the clinicians who provided human CMML samples and the Etablissement Français du Sang (EFS) of Bourgogne Franche-Comté which kindly supplied the cord blood buffy coats. We also thank Dr. Magali Belt for English correction of the manuscript.

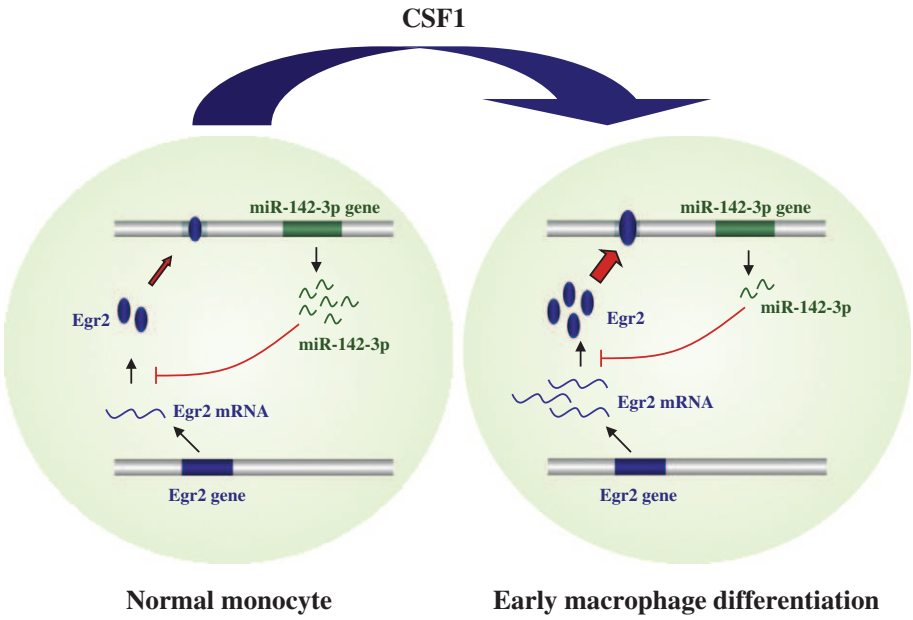


Fig. 7. Schematic model depicting the possible role of miR-142-3p and Egr2 in human CSF1-driven differentiation of CD14+ monocytes into macrophages. In human normal CD14+ monocytes, miR-142-3p binds the 3′UTR of Egr2 mRNA and represses translation leading to low expression of Egr2 protein. Egr2 which acts as a transcription repressor of miR-142-3p gene, is highly expressed upon CSF1, inhibiting in turn miR-142-3p expression, thus promoting early normal macrophage differentiation.

This study was supported by the Ligue Contre le Cancer (Conférence de coordination inter-départementale, Comité de Saône-et-Loire) (to J.-N.B.), the Conseil Régional de Bourgogne (PARI to RGHL team), the ANR (to E.S. and L.D.), the Ligue Nationale Contre le Cancer (to E.S.), the INCa (to E.S.-LACAM), the Fondation de France (Comité Leucémie) (to N.D.), and the Association Laurette Fugain (to N.D.). B.L. was supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of France (MESR), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), and the Société Française d'Hématologie (SFH), R.Z.M. by fellowships from the MESR, R.A. by fellowships from the Ligue de Saône-et-Loire contre le Cancer, the ARC, and the SFH, J.P. by fellowships from the MESR and the ARC, A.L. by fellowships from the Inserm associated with the Conseil Régional de Bourgogne and the SFH, and R.I. by Inserm.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.007.

References

[1] F. Geissmann, M.G. Manz, S. Jung, M.H. Sieweke, M. Merad, K. Ley, Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells, Science 327 (2010) 656–661.
[2] N. Heisterkamp, J. Groffen, J.R. Stephenson, Isolation of v-fms and its human cellular homolog, Virology 126 (1983) 248–258.
[3] A. Jacquel, N. Benikhlef, J. Paggetti, N. Lalaoui, L. Guery, E.K. Dufour, M. Ciudad, C. Racoeur, O. Micheau, L. Delva, N. Droin, E. Solary, Colony-stimulating factor-1-induced oscillations in phosphatidylinositol-3 kinase/AKT are required for caspase activation in monocytes undergoing differentiation into macrophages, Blood 114 (2009) 3633–3641.
[4] Y. Xiong, D. Song, Y. Cai, W. Yu, Y.G. Yeung, E.R. Stanley, A CSF-1 receptor phosphotyrosine 559 signaling pathway regulates receptor ubiquitination and tyrosine phosphorylation, J. Biol. Chem. 286 (2011) 952–960.
[5] S. Gobert Gosse, C. Bourgin, W.Q. Liu, C. Garbay, G. Mouchiroud, M-CSF stimulated differentiation requires persistent MEK activity and MAPK phosphorylation independent of Grb2-Sos association and phosphatidylinositol 3-kinase activity, Cell. Signal. 17 (2005) 1352–1362.
[6] C. Rebe, S. Cathelin, S. Launay, R. Filomenko, L. Prevotat, C. L'Ollivier, E. Gyan, O. Micheau, S. Grant, A. Dubart-Kupperschmitt, M. Fontenay, E. Solary, Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation, Blood 109 (2007) 1442–1450.
[7] A.D. Friedman, Transcriptional control of granulocyte and monocyte development, Oncogene 26 (2007) 6816–6828.
[8] A. Aziz, E. Soucie, S. Sarrazin, M.H. Sieweke, MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages, Science 326 (2009) 867–871.
[9] P. Laslo, C.J. Spooner, A. Warmflash, D.W. Lancki, H.J. Lee, R. Sciammas, B.N. Gantner, A.R. Dinner, H. Singh, Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates, Cell 126 (2006) 755–766.
[10] H. Krysinska, M. Hoogenkamp, R. Ingram, N. Wilson, H. Tagoh, P. Laslo, H. Singh, C. Bonifer, A two-step, PU.1-dependent mechanism for developmentally regulated chromatin remodeling and transcription of the c-fms gene, Mol. Cell. Biol. 27 (2007) 878–887.
[11] S. Kharbanda, T. Nakamura, R. Stone, R. Hass, S. Bernstein, R. Datta, V.P. Sukhatme, D. Kufe, Expression of the early growth response 1 and 2 zinc finger genes during induction of monocytic differentiation, J. Clin. Invest. 88 (1991) 571–577.
[12] T. Li, M.J. Morgan, S. Choksi, Y. Zhang, Y.S. Kim, Z.G. Liu, MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation, Nat. Immunol. 11 (2010) 799–805.
[13] R.M. O'Connell, D.S. Rao, A.A. Chaudhuri, M.P. Boldin, K.D. Taganov, J. Nicoll, R.L. Paquette, D. Baltimore, Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder, J. Exp. Med. 205 (2008) 585–594.
[14] L. Fontana, E. Pelosi, P. Greco, S. Racanicchi, U. Testa, F. Liuzzi, C.M. Croce, E. Brunetti, F. Grignani, C. Peschle, MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation, Nat. Cell Biol. 9 (2007) 775–787.
[15] N. Droin, A. Jacquel, J.B. Hendra, C. Racoeur, C. Truntzer, D. Pecqueur, N. Benikhlef, M. Ciudad, L. Guery, V. Jooste, E. Dufour, P. Fenaux, B. Quesnel, O. Kosmider, M. Fontenay, P. Ducoroy, E. Solary, Alpha-defensins secreted by dysplastic granulocytes inhibit the differentiation of monocytes in chronic myelomonocytic leukemia, Blood 115 (2010) 78–88.
[16] W. Sun, W. Shen, S. Yang, F. Hu, H. Li, T.H. Zhu, miR-223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and miR-223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP-beta, Cell Res. 20 (2010) 1158–1169.
[17] J. Svaren, B.R. Sevetson, E.D. Apel, D.B. Zimonjic, N.C. Popescu, J. Milbrandt, NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli, Mol. Cell. Biol. 16 (1996) 3545–3553.
[18] J. Kumbrink, K.H. Kirsch, J.P. Johnson, EGR1, EGR2, and EGR3 activate the expression of their coregulator NAB2 establishing a negative feedback loop in cells of neuroectodermal and epithelial origin, J. Cell. Biochem. 111 (2010) 207–217.
[19] J.N. Bastie, R. Aucagne, N. Droin, E. Solary, L. Delva, Heterogeneity of molecular markers in chronic myelomonocytic leukemia: a disease associated with several gene alterations, Cell. Mol. Life Sci. 69 (2012) 2853–2861.
[20] K. Yoshida, M. Sanada, Y. Shiraishi, D. Nowak, Y. Nagata, R. Yamamoto, Y. Sato, A. Sato-Otsubo, A. Kon, M. Nagasaki, G. Chalkidis, Y. Suzuki, M. Shiosaka, R. Kawahata, T. Yamaguchi, M. Otsu, N. Obara, M. Sakata-Yanagimoto, K. Ishiyama, H. Mori, F. Nolte, W.K. Hofmann, S. Miyawaki, S. Sugano, C. Haferlach, H.P. Koeffler, L.Y. Shih, T. Haferlach, S. Chiba, H. Nakauchi, S. Miyano, S. Ogawa, Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia, Nature 478 (2011) 64–69.
[21] S.A. Parikh, A. Tefferi, Chronic myelomonocytic leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management, Am. J. Hematol. 87 (2012) 610–619.
[22] P. Landgraf, M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A.O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N.D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foa, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R.U. Muller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D.B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H.I.

Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. Di Lauro, P. Wernet, G. Macino, C.E. Rogler, J.W. Nagle, J. Ju, F.N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M.J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J.J. Russo, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl, A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing, Cell 129 (2007) 1401–1414.

[23] C.Z. Chen, L. Li, H.F. Lodish, D.P. Bartel, MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation, Science 303 (2004) 83–86.

[24] M. Merkerova, M. Belickova, H. Bruchova, Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages, Eur. J. Haematol. 81 (2008) 304–310.

[25] U. Bissels, S. Wild, S. Tomiuk, M. Hafner, H. Scheel, A. Mihailovic, Y.H. Choi, T. Tuschl, A. Bosio, Combined characterization of microRNA and mRNA profiles delineates early differentiation pathways of CD133+ and CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells, Stem Cells 29 (2011) 847–857.

[26] T. Nishiyama, R. Kaneda, T. Ono, S. Tohyama, H. Hashimoto, J. Endo, H. Tsuruta, S. Yuasa, M. Ieda, S. Makino, K. Fukuda, miR-142-3p is essential for hematopoiesis and affects cardiac cell fate in zebrafish, Biochem. Biophys. Res. Commun. 425 (2012) 755–761.

[27] B. Huang, J. Zhao, Z. Lei, S. Shen, D. Li, G.X. Shen, G.M. Zhang, Z.H. Feng, miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+ CD25− T cells and CD4+ CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA, EMBO Rep. 10 (2009) 180–185.

[28] P.K. Risoe, U. Ryg, Y.Y. Wang, A. Rutkovskiy, B. Smedsrod, G. Valen, M.K. Dahle, Cecal ligation and puncture sepsis is associated with attenuated expression of adenylyl cyclase 9 and increased miR142-3p, Shock 36 (2011) 390–395.

[29] Y. Sun, S. Varambally, C.A. Maher, Q. Cao, P. Chockley, T. Toubai, C. Malter, E. Nieves, I. Tawara, Y. Wang, P.A. Ward, A. Chinnaiyan, P. Reddy, Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality, Blood 117 (2011) 6172–6183.

[30] A. Riester, O. Issler, A. Spyroglou, S.H. Rodrig, A. Chen, F. Beuschlein, ACTH-dependent regulation of microRNA as endogenous modulators of glucocorticoid receptor expression in the adrenal gland, Endocrinology 153 (2012) 212–222.

[31] L. Wu, C. Cai, X. Wang, M. Liu, X. Li, H. Tang, MicroRNA-142-3p, a new regulator of RAC1, suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells, FEBS Lett. 585 (2011) 1322–1330.

[32] J. Zhao, Y. Cao, Z. Lei, Z. Yang, B. Zhang, B. Huang, Selective depletion of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels, Cancer Res. 70 (2010) 4850–4858.

[33] B.D. Brown, M.A. Venneri, A. Zingale, L. Sergi Sergi, L. Naldini, Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer, Nat. Med. 12 (2006) 585–591.

[34] D. Gomez-Martin, M. Diaz-Zamudio, M. Galindo-Campos, J. Alcocer-Varela, Early growth response transcription factors and the modulation of immune response: implications towards autoimmunity, Autoimmun. Rev. 9 (2010) 454–458.

[35] V. Pospisil, K. Vargova, J. Kokavec, J. Rybarova, F. Savvulidi, A. Jonasova, E. Necas, J. Zavadil, P. Laslo, T. Stopka, Epigenetic silencing of the oncogenic miR-17-92 cluster during PU.1-directed macrophage differentiation, EMBO J. 30 (2011) 4450–4464.

[36] F. Fazi, A. Rosa, A. Fatica, V. Gelmetti, M.L. De Marchis, C. Nervi, I. Bozzoni, A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis, Cell 123 (2005) 819–831.

[37] S. Flamant, W. Ritchie, J. Guilhot, J. Holst, M.L. Bonnet, J.C. Chomel, F. Guilhot, A.G. Turhan, J.E. Rasko, Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia, Haematologica 95 (2010) 1325–1333.

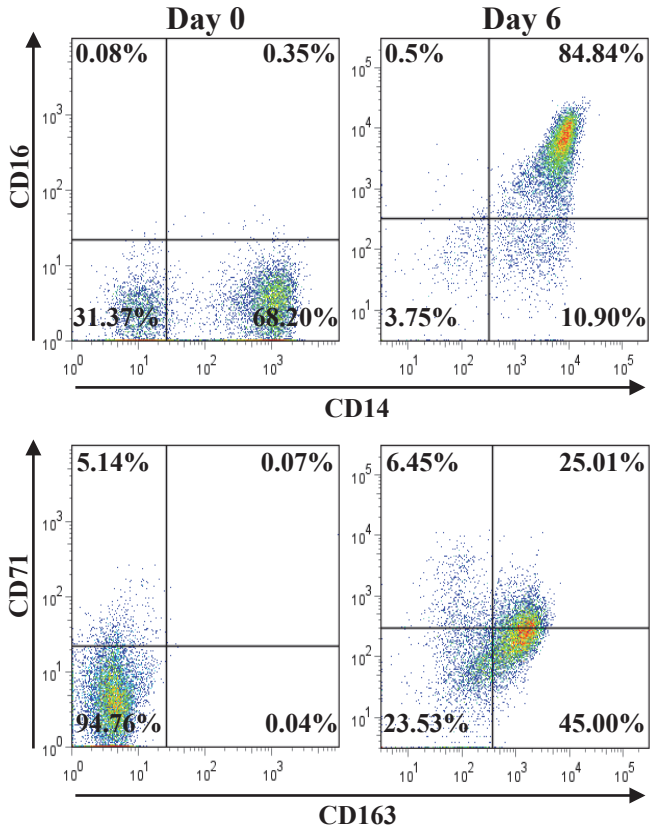
[38] X. Ju, D. Li, Q. Shi, H. Hou, N. Sun, B. Shen, Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, Pediatr. Hematol. Oncol. 26 (2009) 1–10.

[39] M. Lv, X. Zhang, H. Jia, D. Li, B. Zhang, H. Zhang, M. Hong, T. Jiang, Q. Jiang, J. Lu, X. Huang, B. Huang, An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor-alpha and cAMP/PKA pathways, Leukemia 26 (2012) 769–777.

[40] J.J. Zhao, J. Lin, T. Lwin, H. Yang, J. Guo, W. Kong, S. Dessureault, L.C. Moscinski, D. Rezania, W.S. Dalton, E. Sotomayor, J. Tao, J.Q. Cheng, microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma, Blood 115 (2010) 2630–2639.

[41] X.S. Wang, J.N. Gong, J. Yu, F. Wang, X.H. Zhang, X.L. Yin, Z.Q. Tan, Z.M. Luo, G.H. Yang, C. Shen, J.W. Zhang, MicroRNA-29a and microRNA-142-3p are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia, Blood (2012).

Supplemental Fig. 1



Supplemental Fig. 1. FACS analysis of CD14, CD16, CD71, and CD163 on monocytes and macrophages obtained 6 days after CSF1 treatment.

Supplemental Table 1

miRNA	Sample A Signal	Sample B Signal	log2 (Sample B / Sample A)
miR-654	12.08	1,027.88	6.33
miR-498	65.98	2,530.49	5.21
miR-198	11.25	257.63	4.65
miR-34a	126.63	2,668.67	4.39
miR-210	25.75	398.31	3.99
miR-765	40.37	500.78	3.84
miR-373*	11.69	148.17	3.57
miR-365	30.47	309.67	3.50
miR-671	242.60	2,598.98	3.44
miR-602	39.82	204.87	2.37
miR-663	2,705.63	13,660.81	2.33
miR-146b	4,869.63	23,217.93	2.25
miR-99a	52.47	243.30	2.22
miR-338	224.49	1,089.23	2.21
miR-575	208.38	942.65	2.19
miR-99b	1,456.87	6,386.98	2.16
miR-152	151.38	635.15	2.01
miR-565	175.05	653.22	1.90
miR-151	148.26	536.97	1.86
miR-768-3p	564.90	1,671.42	1.56
miR-125a	3,027.56	8,375.69	1.53
miR-638	13,986.15	37,168.30	1.40
miR-212	136.37	315.71	1.21
miR-146a	13,961.27	31,756.15	1.19
miR-132	974.54	2,078.57	1.13
miR-21	32,169.98	65,686.47	0.95
miR-185	6,206.52	10,911.40	0.94
miR-29c	1,149.60	2,137.97	0.90
miR-28	802.16	1,404.86	0.87
let-7e	5,675.12	9,066.12	0.86
miR-221	5,557.52	8,438.63	0.71
miR-29a	11,846.06	18,695.28	0.66
let-7i	11,629.99	18,033.88	0.63
miR-421	432.11	607.53	0.57
miR-23a	29,361.67	42,260.38	0.54
miR-23b	27,348.70	38,767.30	0.52
miR-24	15,441.08	22,580.50	0.47
miR-22	5,089.23	6,629.37	0.43
let-7a	21,612.11	27,059.98	0.31
miR-27a	14,240.25	17,697.84	0.28
let-7g	15,970.05	19,178.35	0.27
let-7f	20,945.42	25,745.83	0.26
let-7d	12,596.74	14,386.95	0.24

miRNA	Sample A Signal	Sample B Signal	log2 (Sample B / Sample A)
miR-142-3p	2,787.58	211.49	-3.80
miR-199a*	395.58	50.65	-2.96
miR-19a	2,079.21	286.06	-2.92
miR-195	6,628.88	1,095.75	-2.53
miR-145	676.85	126.63	-2.39
miR-345	740.50	143.46	-2.39
miR-142-5p	6,503.62	1,251.16	-2.38
miR-101	2,055.29	410.97	-2.34
miR-130a	206.31	47.32	-2.33
miR-143	302.08	84.73	-1.86
miR-126	283.68	70.29	-2.23
miR-20b	4,017.68	1,277.22	-1.66
miR-363	311.73	106.61	-1.55
miR-766	199.70	64.03	-1.50
miR-150	827.81	287.54	-1.49
miR-19b	11,537.18	4,602.96	-1.32
miR-92b	2,446.41	987.77	-1.29
miR-106a	8,439.51	3,675.10	-1.26
miR-186	869.23	334.18	-1.25
miR-20a	10,397.51	4,567.28	-1.19
miR-92	6,247.76	2,821.91	-1.13
miR-223	41,105.02	20,654.02	-0.99
miR-17-5p	10,875.02	4,991.02	-1.12
miR-106b	5,508.89	2,565.79	-1.12
miR-424	1,652.73	847.29	-0.96
miR-425-5p	3,923.86	2,003.65	-0.94
miR-30e-5p	1,784.10	913.64	-0.90
miR-484	818.66	460.00	-0.87
miR-18a	510.94	301.38	-0.87
miR-15b	12,631.62	7,000.48	-0.85
miR-15a	12,761.41	7,708.01	-0.76
miR-454-3p	504.24	298.88	-0.75
miR-25	8,780.14	5,129.48	-0.74
miR-155	5,545.04	3,624.55	-0.66
miR-181a	8,462.37	5,999.14	-0.50
miR-30c	10,878.05	7,755.58	-0.45
miR-191	20,467.51	14,379.44	-0.43
miR-107	13,623.72	10,682.95	-0.40
miR-16	32,180.73	24,877.22	-0.40
miR-93	3,758.56	2,915.25	-0.39
miR-103	14,646.52	11,532.45	-0.39
miR-361	4,817.71	3,618.63	-0.36
miR-26b	20,635.87	15,961.70	-0.35
miR-26a	27,876.30	23,307.64	-0.27
miR-30b	12,768.70	11,325.36	-0.18

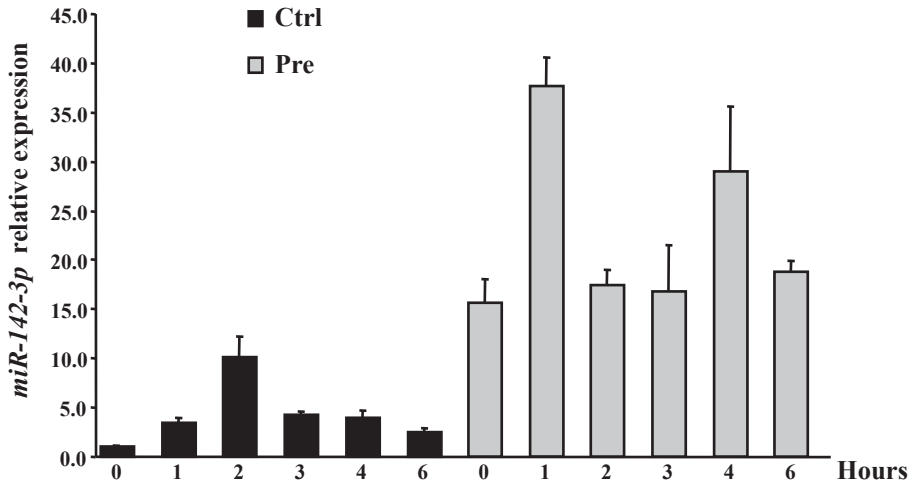
Supplemental Table 1. List of differentially expressed miRNAs with p-value < 0.01.

Supplemental Table 2

TaqMan® Gene Expression Assays	Official symbol	Name	Value
Hs00169122_g1*	CD14	CD14 molecule	0.847
Hs00174705_m1*	CD163	CD163 molecule	1.218
Hs00269972_s1	CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	0.901
Hs00270923_s1*	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	0.874
Hs00357657_m1*	CEBPE	CAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon	0.934
Hs00174164_m1*	CSF-1	colony stimulating factor-1 (macrophage)	1.065
Hs00911250_m1*	CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor	1.126
Hs00929873_m1*	CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	ND
Hs00538900_m1	CSF2R	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)	0.977
Hs99999083_m1	CSF3	colony stimulating factor 3 (granulocyte)	ND
Hs01114427_m1*	CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	0.713
Hs00738848_m1	CUX1	cut-like homeobox 1	0.685
Hs01569121_m1*	FCGR3A	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)	ND
Hs00170630_m1*	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	0.924
Hs00382207_m1*	GFI1	growth factor independent 1 transcription repressor	0.732
Hs00172012_m1*	HOXA10	homeobox A10	1.498
Hs01128710_m1*	IRF8	interferon regulatory factor 8	0.952
Hs99999141_s1	JUN	jun proto-oncogene	0.649
Hs00357891_s1*	JUNB	jun B proto-oncogene	0.606
Hs00358836_m1*	KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)	0.324
Hs00534343_s1*	MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	1.107
Hs00195573_m1*	NAB2	NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2)	0.629
Hs99999904_m1*	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Endo
Hs00940446_m1*	RARa	retinoic acid receptor, alpha	0.822
Hs00977140_m1*	RARb	retinoic acid receptor, beta	ND
Hs01559234_m1*	RARg	retinoic acid receptor, gamma	0.749
Hs02786711_m1*	SPI1	spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1	0.822
Hs00951083_m1*	TFRC	transferrin receptor (p90, CD71)	0.964
Hs01045840_m1*	VDR	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	0.903
Hs99999901_s1	RN18S1	RNA, 18S ribosomal 1	Endo

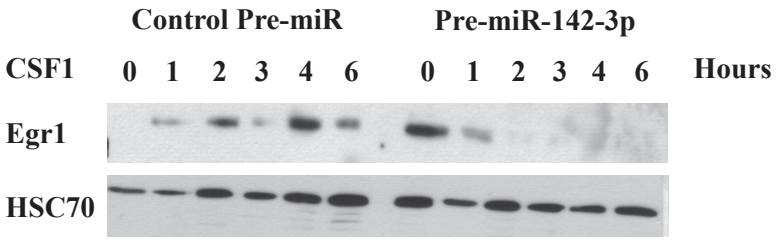
Supplemental Table 2. List of human myeloid genes. Monocytes transfected either with control Pre-miR or Pre-miR-142-3p were treated for 24 hrs with CSF1. Changes in gene transcription of transcription factors and co-factors as well as differentiation markers from control Pre-miR- or Pre-miR-142-3p-transfected monocytes were measured by RQ-PCR by using TaqMan® real time PCR assays. The two transcription factors displaying a significant deregulation are shown in red. The transcript levels were internally normalized to that of *cyclophilin A*.

Supplemental Fig. 2



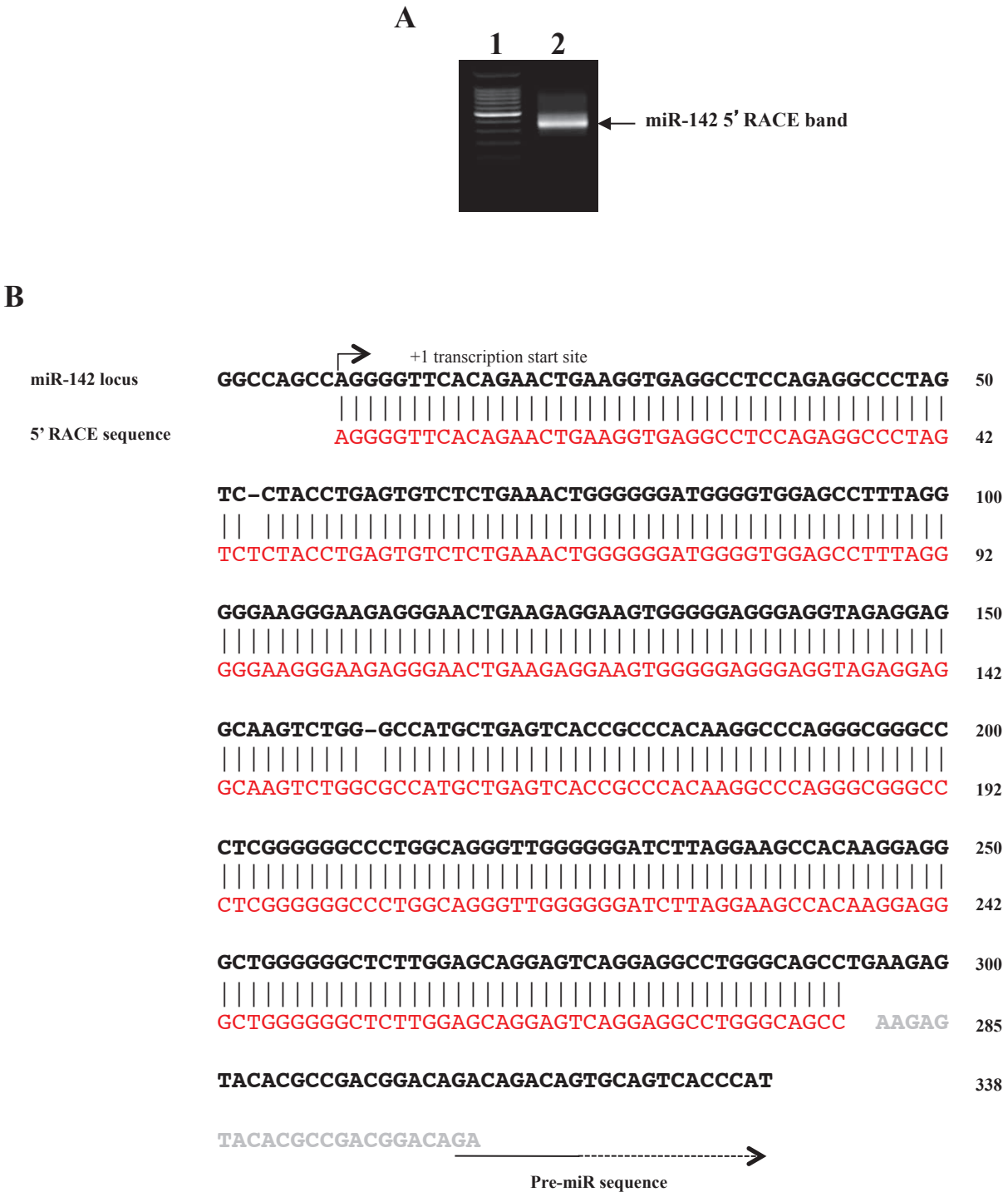
Supplemental Fig. 2. CD14+ monocytes were transfected with control Pre-miR (Ctrl) or Pre-miR-142-3p (Pre). Twelve hours after, monocytes were treated during 6 hours with CSF1. Mir-142-3p expression was measured by RQ-PCR. Data are means ± standard deviation of the values from one representative experiment (corresponding to Fig. 3C) performed in triplicate out of three.

Supplemental Fig. 3



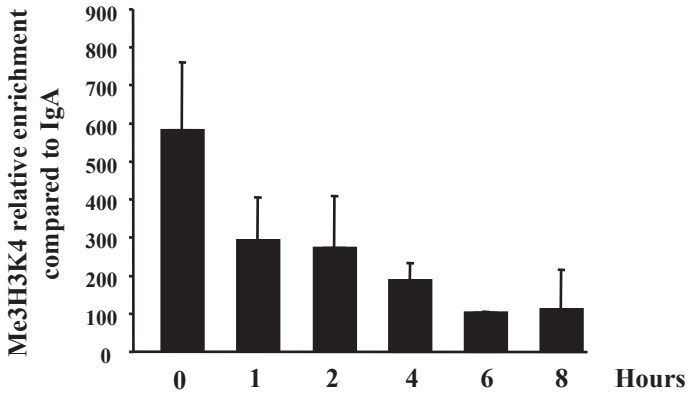
Supplemental Fig. 3. CD14+ monocytes were transfected with control Pre-miR (Ctrl) or Pre-miR-142-3p (Pre). Twelve hours after, monocytes were treated during 6 hours with CSF1. Total protein extracts obtained from the cells were run on a 10% SDS-PAGE, transferred, and probed with anti-Egr1 or anti-HSC70 (loading control).

Supplemental Fig. 4



Supplemental Fig. 4. Mapping of putative transcription start site of miR-142 gene by 5'-RACE. (A) DNase-treated total RNA from CD14+ monocytes was used. Lane 1: Marker size is indicated. The location of the band in lane 2 is indicated by an arrow. (B) The sequence of the primary miR-142. The bent arrow indicates the putative transcription start site.

Supplemental Fig. 5



Supplemental Fig. 5. Chromatin from CD14+ monocytes at different times of induction was immunoprecipitated with an anti-Me_3H3K4 antibody or an irrelevant IgA antibody, and the recovered DNA was submitted to Q-PCR using *pre-miR-142* promoter primers. Graphs correspond to the average of the percentage of variations compared to the recruitment measured in the IgA sample (n=3).

Supplemental Table 3

	Median (range) or N (%)
N=	103
Age, years	77 (52-93)
Gender (M/F)	68/35 (66%/34%)
WHO diagnosis	
CMML-1	82 (80%)
CMML-2	21 (20%)
WBC (G/L)	12.9 (4.0-169.4)
Monocytes (G/L)	2.81 (1.0-110.0)
Hb (g/dL)	11.4 (6.5-16.4)
Cytogenetics	
Normal	73 (71%)
Abnormal	20 (19%)
N/A	10 (10%)
Mutations	
TET2	66 (64%)
SRSF2	40 (39%)
ASXL1	48 (47%)

WHO: World Health Organization

CMML: Chronic Myelomonocytic Leukemia

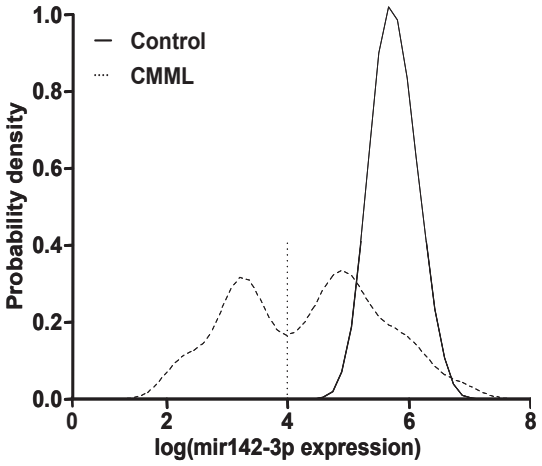
WBC: White Blood Cells

Hb: Hemoglobin

N/A: Not available

Supplemental Table 3. Clinical and biological characteristics of the CMML patients in whom miR-142-3p and Egr2 expressions were analyzed.

Supplemental Fig. 6



Supplemental Fig. 6. Probability density of log-transformed miR-142-3p expression showing modal distribution in healthy donors (Control, N=15), and dichotomic expression in chronic myelomonocytic leukemia patients (CMML, N=103), with a cut-off value at 4.0 log (analysis with R2.14.1 software).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, Kos CH, Pollak MR, Brown EM, Scadden DT. 2006. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* **439**: 599-603.

Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA et al. 2005. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**: 295-306.

Agarwal SK, Guru SC, Heppner C, Erdos MR, Collins RM, Park SY, Saggar S, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM et al. 1999. Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell* **96**: 143-152.

Aikawa Y, Katsumoto T, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H et al. 2010. PU.1-mediated upregulation of CSF1R is crucial for leukemia stem cell potential induced by MOZ-TIF2. *Nat Med* **16**: 580-585, 581p following 585.

Aikawa Y, Nguyen LA, Isono K, Takakura N, Tagata Y, Schmitz ML, Koseki H, Kitabayashi I. 2006. Roles of HIPK1 and HIPK2 in AML1- and p300-dependent transcription, hematopoiesis and blood vessel formation. *EMBO J* **25**: 3955-3965.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**: 193-197.

Akhtar A, Becker PB. 2001. The histone H4 acetyltransferase MOF uses a C2HC zinc finger for substrate recognition. *EMBO Rep* **2**: 113-118.

Ali M, Yan K, Lalonde ME, Degerny C, Rothbart SB, Strahl BD, Cote J, Yang XJ, Kutateladze TG. 2012. Tandem PHD fingers of MORF/MOZ acetyltransferases display selectivity for acetylated histone H3 and are required for the association with chromatin. *J Mol Biol* **424**: 328-338.

Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. 1964. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 786-794.

Allfrey VG, Mirsky AE. 1964. Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science* **144**: 559.

Ansari A, Hampsey M. 2005. A role for the CPF 3'-end processing machinery in RNAP II-dependent gene looping. *Genes Dev* **19**: 2969-2978.

Ansari KI, Kasiri S, Hussain I, Mandal SS. 2009. Mixed lineage leukemia histone methylases play critical roles in estrogen-mediated regulation of HOXC13. *FEBS J* **276**: 7400-7411.

Ansari KI, Mandal SS. 2010. Mixed lineage leukemia: roles in gene expression, hormone signaling and mRNA processing. *FEBS J* **277**: 1790-1804.

Apiou F, Flagiello D, Cillo C, Malfoy B, Poupon MF, Dutrillaux B. 1996. Fine mapping of human HOX gene clusters. *Cytogenet Cell Genet* **73**: 114-115.

Arai Y, Hosoda F, Kobayashi H, Arai K, Hayashi Y, Kamada N, Kaneko Y, Ohki M. 1997. The inv(11)(p15q22) chromosome translocation of de novo and therapy-related myeloid malignancies results in fusion of the nucleoporin gene, NUP98, with the putative RNA helicase gene, DDX10. *Blood* **89**: 3936-3944.

Argiropoulos B, Humphries RK. 2007. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* **26**: 6766-6776.

Argiropoulos B, Yung E, Humphries RK. 2007. Unraveling the crucial roles of Meis1 in leukemogenesis and normal hematopoiesis. *Genes Dev* **21**: 2845-2849.

Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, Pieters R, den Boer ML, Minden MD, Sallan SE, Lander ES, Golub TR, Korsmeyer SJ. 2002. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet* **30**: 41-47.

Ayton PM, Cleary ML. 2003. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev* **17**: 2298-2307.
Azcoitia V, Aracil M, Martinez AC, Torres M. 2005. The homeodomain protein Meis1 is essential for definitive hematopoiesis and vascular patterning in the mouse embryo. *Dev Biol* **280**: 307-320.
Bannister AJ, Kouzarides T. 1996. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**: 641-643.
Bao Y, Shen X. 2007. INO80 subfamily of chromatin remodeling complexes. *Mutat Res* **618**: 18-29.
Barbouti A, Hoglund M, Johansson B, Lassen C, Nilsson PG, Hagemeijer A, Mitelman F, Fioretos T. 2003. A novel gene, MSI2, encoding a putative RNA-binding protein is recurrently rearranged at disease progression of chronic myeloid leukemia and forms a fusion gene with HOXA9 as a result of the cryptic t(7;17)(p15;q23). *Cancer Res* **63**: 1202-1206.
Barnard DC, Ryan K, Manley JL, Richter JD. 2004. Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation. *Cell* **119**: 641-651.
Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**: 823-837.
Baylin S. 2001. DNA methylation and epigenetic mechanisms of carcinogenesis. *Dev Biol (Basel)* **106**: 85-87; discussion 143-160.
Becker AJ, Mc CE, Till JE. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **197**: 452-454.
Bedford DC, Brindle PK. 2012. Is histone acetylation the most important physiological function for CBP and p300? *Aging (Albany NY)* **4**: 247-255.
Bensaude O. 2011. Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription* **2**: 103-108.
Benveniste P, Frelin C, Janmohamed S, Barbara M, Herrington R, Hyam D, Iscove NN. 2010. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell* **6**: 48-58.
Benz C, Copley MR, Kent DG, Wohrer S, Cortes A, Aghaeepour N, Ma E, Mader H, Rowe K, Day C et al. 2012. Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell Stem Cell* **10**: 273-283.
Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K et al. 2006. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**: 315-326.
Bernstein E, Hake SB. 2006. The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem Cell Biol* **84**: 505-517.
Birke M, Schreiner S, Garcia-Cuellar MP, Mahr K, Titgemeyer F, Slany RK. 2002. The MT domain of the proto-oncoprotein MLL binds to CpG-containing DNA and discriminates against methylation. *Nucleic Acids Res* **30**: 958-965.
Birney E Stamatoyannopoulos JA Dutta A Guigo R Gingeras TR Margulies EH Weng Z Snyder M Dermitzakis ET Thurman RE et al. 2007. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**: 799-816.
Blank U, Karlsson G, Karlsson S. 2008. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* **111**: 492-503.
Blatt C, Aberdam D, Schwartz R, Sachs L. 1988. DNA rearrangement of a homeobox gene in myeloid leukaemic cells. *EMBO J* **7**: 4283-4290.

Bonnet D, Dick JE. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**: 730-737.
Borrow J, Shearman AM, Stanton VP, Jr., Becher R, Collins T, Williams AJ, Dube I, Katz F, Kwong YL, Morris C et al. 1996a. The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat Genet* **12**: 159-167.
Borrow J, Stanton VP, Jr., Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RS, Civin CI, Disteche C, Dube I, Frischauf AM et al. 1996b. The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* **14**: 33-41.
Boucherat O, Guillou F, Aubin J, Jeannotte L. 2009. [Hoxa5: a master gene with multifaceted roles]. *Med Sci (Paris)* **25**: 77-82.
Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG et al. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**: 947-956.
Bristow CA, Shore P. 2003. Transcriptional regulation of the human MIP-1alpha promoter by RUNX1 and MOZ. *Nucleic Acids Res* **31**: 2735-2744.
Brock HW, Hodgson JW, Petruk S, Mazo A. 2009. Regulatory noncoding RNAs at Hox loci. *Biochem Cell Biol* **87**: 27-34.
Brooke NM, Garcia-Fernandez J, Holland PW. 1998. The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* **392**: 920-922.
Brown SJ, Stoilov P, Xing Y. 2012. Chromatin and epigenetic regulation of pre-mRNA processing. *Hum Mol Genet* **21**: R90-96.
Brownell JE, Allis CD. 1995. An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in Tetrahymena macronuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6364-6368.
Broxmeyer HE. 2008. Chemokines in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* **15**: 49-58.
Buchert M, Darido C, Lagerqvist E, Sedello A, Cazevieille C, Buchholz F, Bourgaux JF, Pannequin J, Joubert D, Hollande F. 2009. The symplekin/ZONAB complex inhibits intestinal cell differentiation by the repression of AML1/Runx1. *Gastroenterology* **137**: 156-164, 164 e151-153.
Buchert M, Papin M, Bonnans C, Darido C, Raye WS, Garambois V, Pelegrin A, Bourgaux JF, Pannequin J, Joubert D et al. 2010. Symplekin promotes tumorigenicity by up-regulating claudin-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 2628-2633.
Cai M, Langer EM, Gill JG, Satpathy AT, Albring JC, Kc W, Murphy TL, Murphy KM. 2012. Dual actions of Meis1 inhibit erythroid progenitor development and sustain general hematopoietic cell proliferation. *Blood* **120**: 335-346.
Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR et al. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**: 841-846.
Camos M, Esteve J, Jares P, Colomer D, Rozman M, Villamor N, Costa D, Carrio A, Nomdedeu J, Montserrat E et al. 2006. Gene expression profiling of acute myeloid leukemia with translocation t(8;16)(p11;p13) and MYST3-CREBBP rearrangement reveals a distinctive signature with a specific pattern of HOX gene expression. *Cancer Res* **66**: 6947-6954.
Cao R, Zhang Y. 2004. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 155-164.
Carapeti M, Aguiar RC, Goldman JM, Cross NC. 1998. A novel fusion between MOZ and the nuclear receptor coactivator TIF2 in acute myeloid leukemia. *Blood* **91**: 3127-3133.

Carninci P Kasukawa T Katayama S Gough J Frith MC Maeda N Oyama R Ravasi T Lenhard B Wells C et al. 2005. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* **309**: 1559-1563.
Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Cote J. 2003. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* **19**: 321-329.
Casas S, Nagy B, Elonen E, Aventin A, Larramendy ML, Sierra J, Ruutu T, Knuutila S. 2003. Aberrant expression of HOXA9, DEK, CBL and CSF1R in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* **44**: 1935-1941.
Celetti A, Barba P, Cillo C, Rotoli B, Boncinelli E, Magli MC. 1993. Characteristic patterns of HOX gene expression in different types of human leukemia. *Int J Cancer* **53**: 237-244.
Chaffanet M, Gressin L, Preudhomme C, Soenen-Cornu V, Birnbaum D, Pebusque MJ. 2000. MOZ is fused to p300 in an acute monocytic leukemia with t(8;22). *Genes Chromosomes Cancer* **28**: 138-144.
Champagne KS, Saksouk N, Pena PV, Johnson K, Ullah M, Yang XJ, Cote J, Kutateladze TG. 2008. The crystal structure of the ING5 PHD finger in complex with an H3K4me3 histone peptide. *Proteins* **72**: 1371-1376.
Champagne N, Pelletier N, Yang XJ. 2001. The monocytic leukemia zinc finger protein MOZ is a histone acetyltransferase. *Oncogene* **20**: 404-409.
Chan EM, Chan RJ, Comer EM, Goulet RJ, 3rd, Crean CD, Brown ZD, Fruehwald AM, Yang Z, Boswell HS, Nakshatri H et al. 2007. MOZ and MOZ-CBP cooperate with NF-kappaB to activate transcription from NF-kappaB-dependent promoters. *Exp Hematol* **35**: 1782-1792.
Chan SK, Popperl H, Krumlauf R, Mann RS. 1996. An extradenticle-induced conformational change in a HOX protein overcomes an inhibitory function of the conserved hexapeptide motif. *EMBO J* **15**: 2476-2487.
Chang CP, Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Largman C, Cleary ML. 1995. Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. *Genes Dev* **9**: 663-674.
Chang PY, Hom RA, Musselman CA, Zhu L, Kuo A, Gozani O, Kutateladze TG, Cleary ML. 2010. Binding of the MLL PHD3 finger to histone H3K4me3 is required for MLL-dependent gene transcription. *J Mol Biol* **400**: 137-144.
Chase A, Reiter A, Burci L, Cazzaniga G, Biondi A, Pickard J, Roberts IA, Goldman JM, Cross NC. 1999. Fusion of ETV6 to the caudal-related homeobox gene CDX2 in acute myeloid leukemia with the t(12;13)(p13;q12). *Blood* **93**: 1025-1031.
Chen F, Greer J, Capecchi MR. 1998. Analysis of Hoxa7/Hoxb7 mutants suggests periodicity in the generation of the different sets of vertebrae. *Mech Dev* **77**: 49-57.
Chen Q, Dowhan DH, Liang D, Moore DD, Overbeek PA. 2002. CREB-binding protein/p300 co-activation of crystallin gene expression. *J Biol Chem* **277**: 24081-24089.
Chen Y, Sprung R, Tang Y, Ball H, Sangras B, Kim SC, Falck JR, Peng J, Gu W, Zhao Y. 2007. Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Mol Cell Proteomics* **6**: 812-819.
Chen Z, Krug RM. 2000. Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells. *Trends Microbiol* **8**: 376-383.
Cho KW, De Robertis EM. 1990. Differential activation of Xenopus homeo box genes by mesoderm-inducing growth factors and retinoic acid. *Genes Dev* **4**: 1910-1916.
Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Mendez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, Battista M, Leboeuf M, Prophete C, van Rooijen N et al. 2011. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med* **208**: 261-271.

Chow J, Ogunshola O, Fan SY, Li Y, Ment LR, Madri JA. 2001. Astrocyte-derived VEGF mediates survival and tube stabilization of hypoxic brain microvascular endothelial cells in vitro. *Brain Res Dev Brain Res* **130**: 123-132.
Collins EC, Pannell R, Simpson EM, Forster A, Rabbitts TH. 2000. Inter-chromosomal recombination of Mll and Af9 genes mediated by cre-loxP in mouse development. *EMBO Rep* **1**: 127-132.
Collins HM, Kindle KB, Matsuda S, Ryan C, Troke PJ, Kalkhoven E, Heery DM. 2006. MOZ-TIF2 alters cofactor recruitment and histone modification at the RARbeta2 promoter: differential effects of MOZ fusion proteins on CBP- and MOZ-dependent activators. *J Biol Chem* **281**: 17124-17133.
Copley MR, Beer PA, Eaves CJ. 2012. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage. *Cell Stem Cell* **10**: 690-697.
Corral J, Lavenir I, Impey H, Warren AJ, Forster A, Larson TA, Bell S, McKenzie AN, King G, Rabbitts TH. 1996. An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* **85**: 853-861.
Cozzio A, Passegue E, Ayton PM, Karsunky H, Cleary ML, Weissman IL. 2003. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* **17**: 3029-3035.
Crooks GM, Fuller J, Petersen D, Izadi P, Malik P, Pattengale PK, Kohn DB, Gasson JC. 1999. Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. *Blood* **94**: 519-528.
Crump JG, Swartz ME, Eberhart JK, Kimmel CB. 2006. Moz-dependent Hox expression controls segment-specific fate maps of skeletal precursors in the face. *Development* **133**: 2661-2669.
D'Andrea AD. 1994. Hematopoietic growth factors and the regulation of differentiative decisions. *Curr Opin Cell Biol* **6**: 804-808.
Daftary GS, Taylor HS. 2006. Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev* **27**: 331-355.
Dantonel JC, Murthy KG, Manley JL, Tora L. 1997. Transcription factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature* **389**: 399-402.
Daser A, Rabbitts TH. 2004. Extending the repertoire of the mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis. *Genes Dev* **18**: 965-974.
-. 2005. The versatile mixed lineage leukaemia gene MLL and its many associations in leukaemogenesis. *Semin Cancer Biol* **15**: 175-188.
Daury L, Chailleux C, Bonvallet J, Trouche D. 2006. Histone H3.3 deposition at E2F-regulated genes is linked to transcription. *EMBO Rep* **7**: 66-71.
Davidson AJ, Ernst P, Wang Y, Dekens MP, Kingsley PD, Palis J, Korsmeyer SJ, Daley GQ, Zon LI. 2003. cdx4 mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple hox genes. *Nature* **425**: 300-306.
Davidson AJ, Zon LI. 2006. The caudal-related homeobox genes cdx1a and cdx4 act redundantly to regulate hox gene expression and the formation of putative hematopoietic stem cells during zebrafish embryogenesis. *Dev Biol* **292**: 506-518.
Davis AP, Capecchi MR. 1994. Axial homeosis and appendicular skeleton defects in mice with a targeted disruption of hoxd-11. *Development* **120**: 2187-2198.
Davis AP, Witte DP, Hsieh-Li HM, Potter SS, Capecchi MR. 1995. Absence of radius and ulna in mice lacking hoxa-11 and hoxd-11. *Nature* **375**: 791-795.
Deguchi K, Ayton PM, Carapeti M, Kutok JL, Snyder CS, Williams IR, Cross NC, Glass CK, Cleary ML, Gilliland DG. 2003. MOZ-TIF2-induced acute myeloid leukemia requires the MOZ nucleosome binding motif and TIF2-mediated recruitment of CBP. *Cancer Cell* **3**: 259-271.

Dejardin J, Cavalli G. 2004. Chromatin inheritance upon Zeste-mediated Brahma recruitment at a minimal cellular memory module. *EMBO J* **23**: 857-868.
Delva L, Gallais I, Guillouf C, Denis N, Orvain C, Moreau-Gachelin F. 2004. Multiple functional domains of the oncoproteins Spi-1/PU.1 and TLS are involved in their opposite splicing effects in erythroleukemic cells. *Oncogene* **23**: 4389-4399.
Demarest SJ, Martinez-Yamout M, Chung J, Chen H, Xu W, Dyson HJ, Evans RM, Wright PE. 2002. Mutual synergistic folding in recruitment of CBP/p300 by p160 nuclear receptor coactivators. *Nature* **415**: 549-553.
Desplan C, Theis J, O'Farrell PH. 1988. The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell* **54**: 1081-1090.
Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**: 491-496.
Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X. 2005. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* **6**: 227.
Dintilhac A, Bihan R, Guerrier D, Deschamps S, Pellerin I. 2004. A conserved non-homeodomain Hoxa9 isoform interacting with CBP is co-expressed with the 'typical' Hoxa9 protein during embryogenesis. *Gene Expr Patterns* **4**: 215-222.
Dobson CL, Warren AJ, Pannell R, Forster A, Lavenir I, Corral J, Smith AJ, Rabbitts TH. 1999. The mll-AF9 gene fusion in mice controls myeloproliferation and specifies acute myeloid leukaemogenesis. *EMBO J* **18**: 3564-3574.
Dou Y, Milne TA, Ruthenburg AJ, Lee S, Lee JW, Verdine GL, Allis CD, Roeder RG. 2006. Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 713-719.
Dou Y, Milne TA, Tackett AJ, Smith ER, Fukuda A, Wysocka J, Allis CD, Chait BT, Hess JL, Roeder RG. 2005. Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* **121**: 873-885.
Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. 2010. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* **11**: 585-593.
Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. 2012. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* **10**: 120-136.
Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ, Cote J. 2006. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* **21**: 51-64.
Dreijerink KM, Mulder KW, Winkler GS, Hoppener JW, Lips CJ, Timmers HT. 2006. Menin links estrogen receptor activation to histone H3K4 trimethylation. *Cancer Res* **66**: 4929-4935.
Duboule D, Dolle P. 1989. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *EMBO J* **8**: 1497-1505.
Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, Yoon K, Cook JM, Willert K, Gaiano N et al. 2005. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* **6**: 314-322.
Dupé V, Davenne M, Brocard J, Dolle P, Mark M, Dierich A, Chambon P, Rijli FM. 1997. In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* **124**: 399-410.
Efeyan A, Serrano M. 2007. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* **6**: 1006-1010.
Ehninger A, Trumpp A. 2011. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med* **208**: 421-428.

Ehrenhofer-Murray AE. 2004. Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur J Biochem* **271**: 2335-2349.
Eissenberg JC. 2012. Structural biology of the chromodomain: form and function. *Gene* **496**: 69-78.
Ekici AB, Strissel PL, Oppelt PG, Renner SP, Brucker S, Beckmann MW, Strick R. 2013. HOXA10 and HOXA13 sequence variations in human female genital malformations including congenital absence of the uterus and vagina. *Gene* **518**: 267-272.
Erfurth FE, Popovic R, Grembecka J, Cierpicki T, Theisler C, Xia ZB, Stuart T, Diaz MO, Bushweller JH, Zeleznik-Le NJ. 2008. MLL protects CpG clusters from methylation within the Hoxa9 gene, maintaining transcript expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 7517-7522.
Ernst P, Fisher JK, Avery W, Wade S, Foy D, Korsmeyer SJ. 2004. Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Dev Cell* **6**: 437-443.
Ernst P, Wang J, Huang M, Goodman RH, Korsmeyer SJ. 2001. MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein. *Mol Cell Biol* **21**: 2249-2258.
Esteyries S, Perot C, Adelaide J, Imbert M, Lagarde A, Pautas C, Olschwang S, Birnbaum D, Chaffanet M, Mozziconacci MJ. 2008. NCOA3, a new fusion partner for MOZ/MYST3 in M5 acute myeloid leukemia. *Leukemia* **22**: 663-665.
Ezeokonkwo C, Ghazy MA, Zhelkovsky A, Yeh PC, Moore C. 2012. Novel interactions at the essential N-terminus of poly(A) polymerase that could regulate poly(A) addition in Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett* **586**: 1173-1178.
Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, Zhang Y. 2002. Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol* **12**: 1052-1058.
Fernandez-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. 2004. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* **3**: 959-967.
Ferrell CM, Dorsam ST, Ohta H, Humphries RK, Derynck MK, Haqq C, Largman C, Lawrence HJ. 2005. Activation of stem-cell specific genes by HOXA9 and HOXA10 homeodomain proteins in CD34+ human cord blood cells. *Stem Cells* **23**: 644-655.
Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H, Allis CD. 2005. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**: 1116-1122.
Forster A, Pannell R, Drynan LF, McCormack M, Collins EC, Daser A, Rabbitts TH. 2003. Engineering de novo reciprocal chromosomal translocations associated with Mll to replicate primary events of human cancer. *Cancer Cell* **3**: 449-458.
Fortier JM, Graubert TA. 2010. Murine models of human acute myeloid leukemia. *Cancer Treat Res* **145**: 183-196.
Fromental-Ramain C, Warot X, Lakkaraju S, Favier B, Haack H, Birling C, Dierich A, Doll e P, Chambon P. 1996. Specific and redundant functions of the paralogous Hoxa-9 and Hoxd-9 genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development* **122**: 461-472.
Fry CJ, Peterson CL. 2001. Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr Biol* **11**: R185-197.
Fuchs SM, Krajewski K, Baker RW, Miller VL, Strahl BD. 2011. Influence of combinatorial histone modifications on antibody and effector protein recognition. *Curr Biol* **21**: 53-58.
Fujimoto S, Araki K, Chisaka O, Araki M, Takagi K, Yamamura K. 1998. Analysis of the murine Hoxa-9 cDNA: an alternatively spliced transcript encodes a truncated protein lacking the homeodomain. *Gene* **209**: 77-85.

Fujino T, Yamazaki Y, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Hirokawa K, Nakamura T. 2001. Inhibition of myeloid differentiation by Hoxa9, Hoxb8, and Meis homeobox genes. *Exp Hematol* **29**: 856-863.
Gan T, Jude CD, Zaffuto K, Ernst P. 2010. Developmentally induced Mll1 loss reveals defects in postnatal haematopoiesis. *Leukemia* **24**: 1732-1741.
Gaunt SJ. 1988. Mouse homeobox gene transcripts occupy different but overlapping domains in embryonic germ layers and organs: a comparison of Hox-3.1 and Hox-1.5. *Development* **103**: 135-144.
Ghannam G, Takeda A, Camarata T, Moore MA, Viale A, Yaseen NR. 2004. The oncogene Nup98-HOXA9 induces gene transcription in myeloid cells. *J Biol Chem* **279**: 866-875.
Ghazy MA, He X, Singh BN, Hampsey M, Moore C. 2009. The essential N terminus of the Pta1 scaffold protein is required for snoRNA transcription termination and Ssu72 function but is dispensable for pre-mRNA 3'-end processing. *Mol Cell Biol* **29**: 2296-2307.
Globisch D, Munzel M, Muller M, Michalakis S, Wagner M, Koch S, Bruckl T, Biel M, Carell T. 2010. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One* **5**: e15367.
Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA et al. 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**: 531-537.
Goto NK, Zor T, Martinez-Yamout M, Dyson HJ, Wright PE. 2002. Cooperativity in transcription factor binding to the coactivator CREB-binding protein (CBP). The mixed lineage leukemia protein (MLL) activation domain binds to an allosteric site on the KIX domain. *J Biol Chem* **277**: 43168-43174.
Grienenberger A, Miotto B, Sagnier T, Cavalli G, Schramke V, Geli V, Mariol MC, Berenger H, Graba Y, Pradel J. 2002. The MYST domain acetyltransferase Chameau functions in epigenetic mechanisms of transcriptional repression. *Curr Biol* **12**: 762-766.
Growney JD, Shigematsu H, Li Z, Lee BH, Adelsperger J, Rowan R, Curley DP, Kutok JL, Akashi K, Williams IR et al. 2005. Loss of Runx1 perturbs adult hematopoiesis and is associated with a myeloproliferative phenotype. *Blood* **106**: 494-504.
Guan X, Rastogi N, Parthun MR, Freitas MA. 2013. Discovery of Histone Modification Crosstalk Networks by SILAC Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*.
Guenther MG, Jenner RG, Chevalier B, Nakamura T, Croce CM, Canaani E, Young RA. 2005. Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8603-8608.
Guidez F, Howell L, Isalan M, Cebrat M, Alani RM, Ivins S, Hormaeche I, McConnell MJ, Pierce S, Cole PA et al. 2005. Histone acetyltransferase activity of p300 is required for transcriptional repression by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol Cell Biol* **25**: 5552-5566.
Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D, Grimes B, Howard DS, Rizzieri DA, Luger SM, Jordan CT. 2001. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* **98**: 2301-2307.
Haferlach T, Kohlmann A, Klein HU, Ruckert C, Dugas M, Williams PM, Kern W, Schnittger S, Bacher U, Loffler H et al. 2009. AML with translocation t(8;16)(p11;p13) demonstrates unique cytomorphological, cytogenetic, molecular and prognostic features. *Leukemia* **23**: 934-943.
Hallier M, Lerga A, Barnache S, Tavitian A, Moreau-Gachelin F. 1998. The transcription factor Spi-1/PU.1 interacts with the potential splicing factor TLS. *J Biol Chem* **273**: 4838-4842.

Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P. 2002. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood* **99**: 394.
Hart SM, Foroni L. 2002. Core binding factor genes and human leukemia. *Haematologica* **87**: 1307-1323.
Hassan AH, Prochasson P, Neely KE, Galasinski SC, Chandy M, Carrozza MJ, Workman JL. 2002. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* **111**: 369-379.
Haynes SR, Dollard C, Winston F, Beck S, Trowsdale J, Dawid IB. 1992. The bromodomain: a conserved sequence found in human, Drosophila and yeast proteins. *Nucleic Acids Res* **20**: 2603.
He M, Chen P, Arnovitz S, Li Y, Huang H, Neilly MB, Wei M, Rowley JD, Chen J, Li Z. 2012. Two isoforms of HOXA9 function differently but work synergistically in human MLL-rearranged leukemia. *Blood Cells Mol Dis* **49**: 102-106.
He X, Khan AU, Cheng H, Pappas DL, Jr., Hampsey M, Moore CL. 2003. Functional interactions between the transcription and mRNA 3' end processing machineries mediated by Ssu72 and Sub1. *Genes Dev* **17**: 1030-1042.
He X, Moore C. 2005. Regulation of yeast mRNA 3' end processing by phosphorylation. *Mol Cell* **19**: 619-629.
Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C. 1988. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* **7**: 1395-1402.
Heppner C, Bilimoria KY, Agarwal SK, Kester M, Whitty LJ, Guru SC, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Marx SJ et al. 2001. The tumor suppressor protein menin interacts with NF-kappaB proteins and inhibits NF-kappaB-mediated transactivation. *Oncogene* **20**: 4917-4925.
Hess JL. 2004. Mechanisms of transformation by MLL. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **14**: 235-254.
Hess JL, Bittner CB, Zeisig DT, Bach C, Fuchs U, Borkhardt A, Frampton J, Slany RK. 2006. c-Myb is an essential downstream target for homeobox-mediated transformation of hematopoietic cells. *Blood* **108**: 297-304.
Hess JL, Yu BD, Li B, Hanson R, Korsmeyer SJ. 1997. Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* **90**: 1799-1806.
Hirose Y, Manley JL. 1998. RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature* **395**: 93-96.
Hisa T, Spence SE, Rachel RA, Fujita M, Nakamura T, Ward JM, Devor-Henneman DE, Saiki Y, Kutsuna H, Tessarollo L et al. 2004. Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *EMBO J* **23**: 450-459.
Holbert MA, Sikorski T, Carten J, Snowflack D, Hodawadekar S, Marmorstein R. 2007. The human monocytic leukemia zinc finger histone acetyltransferase domain contains DNA-binding activity implicated in chromatin targeting. *J Biol Chem* **282**: 36603-36613.
Holland PW, Booth HA, Bruford EA. 2007. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biol* **5**: 47.
Holliday R, Pugh JE. 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**: 226-232.
Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM. 1993. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem* **268**: 305-314.
Horn PJ, Peterson CL. 2002. Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science* **297**: 1824-1827.

Hornstein E, Shomron N. 2006. Canalization of development by microRNAs. *Nat Genet* **38 Suppl**: S20-24.
Hsieh JJ, Cheng EH, Korsmeyer SJ. 2003. Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* **115**: 293-303.
Hsin JP, Manley JL. 2012. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev* **26**: 2119-2137.
Huang G, Zhao X, Wang L, Elf S, Xu H, Sashida G, Zhang Y, Liu Y, Lee J, Menendez S et al. 2011. The ability of MLL to bind RUNX1 and methylate H3K4 at PU.1 regulatory regions is impaired by MDS/AML-associated RUNX1/AML1 mutations. *Blood* **118**: 6544-6552.
Huang Y, Sitwala K, Bronstein J, Sanders D, Dandekar M, Collins C, Robertson G, MacDonald J, Cezard T, Bilenky M et al. 2012. Identification and characterization of Hoxa9 binding sites in hematopoietic cells. *Blood* **119**: 388-398.
Hudson BP, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. 2000. Solution structure and acetyl-lysine binding activity of the GCN5 bromodomain. *J Mol Biol* **304**: 355-370.
Hughes CM, Rozenblatt-Rosen O, Milne TA, Copeland TD, Levine SS, Lee JC, Hayes DN, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Biondi CA et al. 2004. Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the hoxc8 locus. *Mol Cell* **13**: 587-597.
Huntly BJ, Gilliland DG. 2005. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer* **5**: 311-321.
Huntly BJ, Shigematsu H, Deguchi K, Lee BH, Mizuno S, Duclos N, Rowan R, Amaral S, Curley D, Williams IR et al. 2004. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* **6**: 587-596.
Ikeda T, Ikeda K, Sasaki K, Kawakami K, Takahara J. 1999. The inv(11)(p15q22) chromosome translocation of therapy-related myelodysplasia with NUP98-DDX10 and DDX10-NUP98 fusion transcripts. *Int J Hematol* **69**: 160-164.
Imamura T, Kakazu N, Hibi S, Morimoto A, Fukushima Y, Ijuin I, Hada S, Kitabayashi I, Abe T, Imashuku S. 2003. Rearrangement of the MOZ gene in pediatric therapy-related myelodysplastic syndrome with a novel chromosomal translocation t(2;8)(p23;p11). *Genes Chromosomes Cancer* **36**: 413-419.
In der Rieden PM, Mainguy G, Woltering JM, Durston AJ. 2004. Homeodomain to hexapeptide or PBC-interaction-domain distance: size apparently matters. *Trends Genet* **20**: 76-79.
Isaacs HV, Pownall ME, Slack JM. 1998. Regulation of Hox gene expression and posterior development by the Xenopus caudal homologue Xcad3. *EMBO J* **17**: 3413-3427.
Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez EA, Iwasaki-Arai J, Mizuno S, Arinobu Y, Geary K, Zhang P, Dayaram T et al. 2005. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* **106**: 1590-1600.
Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Eldredge JH. 1951. Recovery from radiation injury. *Science* **113**: 510-511.
Jacobson RH, Ladurner AG, King DS, Tjian R. 2000. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* **288**: 1422-1425.
Jan M, Majeti R. 2013. Clonal evolution of acute leukemia genomes. *Oncogene* **32**: 135-140.
Jang YY, Sharkis SJ. 2007. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* **110**: 3056-3063.
Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080.

Jeppesen P, Turner BM. 1993. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* **74**: 281-289.
Jin C, Felsenfeld G. 2006. Distribution of histone H3.3 in hematopoietic cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 574-579.
Jin J, Cai Y, Li B, Conaway RC, Workman JL, Conaway JW, Kusch T. 2005. In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Sci* **30**: 680-687.
Jones PA. 1999. The DNA methylation paradox. *Trends Genet* **15**: 34-37.
Jude CD, Climer L, Xu D, Artinger E, Fisher JK, Ernst P. 2007. Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell* **1**: 324-337.
Kalkhoven E. 2004. CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* **68**: 1145-1155.
Kamps MP, Murre C, Sun XH, Baltimore D. 1990. A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* **60**: 547-555.
Kastner P, Chan S. 2008. PU.1: a crucial and versatile player in hematopoiesis and leukemia. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 22-27.
Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS. 2006. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* **124**: 407-421.
Katsani KR, Arredondo JJ, Kal AJ, Verrijzer CP. 2001. A homeotic mutation in the trithorax SET domain impedes histone binding. *Genes Dev* **15**: 2197-2202.
Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I. 2006. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev* **20**: 1321-1330.
Kavanagh E, Buchert M, Tsapara A, Choquet A, Balda MS, Hollande F, Matter K. 2006. Functional interaction between the ZO-1-interacting transcription factor ZONAB/DbpA and the RNA processing factor symplekin. *J Cell Sci* **119**: 5098-5105.
Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. 1999. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* **13**: 687-698.
Kennedy SA, Frazier ML, Steiniger M, Mast AM, Marzluff WF, Redinbo MR. 2009. Crystal structure of the HEAT domain from the Pre-mRNA processing factor Symplekin. *J Mol Biol* **392**: 115-128.
Keon BH, Schafer S, Kuhn C, Grund C, Franke WW. 1996. Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol* **134**: 1003-1018.
Kessel M, Gruss P. 1991. Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* **67**: 89-104.
Kharchenko PV, Alekseyenko AA, Schwartz YB, Minoda A, Riddle NC, Ernst J, Sabo PJ, Larschan E, Gorchakov AA, Gu T et al. 2011. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in Drosophila melanogaster. *Nature* **471**: 480-485.
Khochbin S. 2001. Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* **271**: 1-12.
Khorasanizadeh S. 2004. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* **116**: 259-272.
Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Terhorst C, Morrison SJ. 2005. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* **121**: 1109-1121.

Kim HG, de Guzman CG, Swindle CS, Cotta CV, Gartland L, Scott EW, Klug CA. 2004. The ETS family transcription factor PU.1 is necessary for the maintenance of fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood* **104**: 3894-3900.
Kim SJ, Letterio J. 2003. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia* **17**: 1731-1737.
Kindle KB, Troke PJ, Collins HM, Matsuda S, Bossi D, Bellodi C, Kalkhoven E, Salomoni P, Pelicci PG, Minucci S et al. 2005. MOZ-TIF2 inhibits transcription by nuclear receptors and p53 by impairment of CBP function. *Mol Cell Biol* **25**: 988-1002.
Kitabayashi I, Aikawa Y, Nguyen LA, Yokoyama A, Ohki M. 2001. Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein. *EMBO J* **20**: 7184-7196.
Kleff S, Andrulis ED, Anderson CW, Sternglanz R. 1995. Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J Biol Chem* **270**: 24674-24677.
Klinakis A, Lobry C, Abdel-Wahab O, Oh P, Haeno H, Buonamici S, van De Walle I, Cathelin S, Trimarchi T, Araldi E et al. 2011. A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia. *Nature* **473**: 230-233.
Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. 2006. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* **7**: 715-727.
Knoepfler PS, Calvo KR, Chen H, Antonarakis SE, Kamps MP. 1997. Meis1 and pKnox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14553-14558.
Kocabas F, Zheng J, Thet S, Copeland NG, Jenkins NA, DeBerardinis RJ, Zhang C, Sadek HA. 2012. Meis1 regulates the metabolic phenotype and oxidant defense of hematopoietic stem cells. *Blood* **120**: 4963-4972.
Kolev NG, Steitz JA. 2005. Symplekin and multiple other polyadenylation factors participate in 3'-end maturation of histone mRNAs. *Genes Dev* **19**: 2583-2592.
Kondo M, Weissman IL, Akashi K. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**: 661-672.
Kongsuwan K, Webb E, Housiaux P, Adams JM. 1988. Expression of multiple homeobox genes within diverse mammalian haemopoietic lineages. *EMBO J* **7**: 2131-2138.
Kouzarides T. 2007. SnapShot: Histone-modifying enzymes. *Cell* **131**: 822.
Krause DS, Van Etten RA. 2007. Right on target: eradicating leukemic stem cells. *Trends Mol Med* **13**: 470-481.
Kriaucionis S, Heintz N. 2009. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* **324**: 929-930.
Krishnamurthy S, He X, Reyes-Reyes M, Moore C, Hampsey M. 2004. Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol Cell* **14**: 387-394.
Krivtsov AV, Armstrong SA. 2007. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* **7**: 823-833.
Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG et al. 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* **442**: 818-822.
Kroon E, Krosl J, Thorsteinsdottir U, Baban S, Buchberg AM, Sauvageau G. 1998. Hoxa9 transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with Meis1a but not Pbx1b. *EMBO J* **17**: 3714-3725.
Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T, Sauvageau G. 2001. NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *EMBO J* **20**: 350-361.
Kubota Y, Takubo K, Suda T. 2008. Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche. *Biochem Biophys Res Commun* **366**: 335-339.

Kuhn U, Wahle E. 2004. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1678**: 67-84.
La P, Schnepp RW, C DP, A CS, Hua X. 2004. Tumor suppressor menin regulates expression of insulin-like growth factor binding protein 2. *Endocrinology* **145**: 3443-3450.
Lacaud G, Gore L, Kennedy M, Kouskoff V, Kingsley P, Hogan C, Carlsson L, Speck N, Palis J, Keller G. 2002. Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro. *Blood* **100**: 458-466.
Ladurner AG, Inouye C, Jain R, Tjian R. 2003. Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell* **11**: 365-376.
Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW, Jr., Lott IT et al. 1985. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* **313**: 837-841.
Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, Allen T, Kouskoff V, Lacaud G. 2009. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature* **457**: 892-895.
Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**: 645-648.
Largaespada DA, Shaughnessy JD, Jr., Jenkins NA, Copeland NG. 1995. Retroviral integration at the Evi-2 locus in BXH-2 myeloid leukemia cell lines disrupts Nf1 expression without changes in steady-state Ras-GTP levels. *J Virol* **69**: 5095-5102.
LaRonde-LeBlanc NA, Wolberger C. 2003. Structure of HoxA9 and Pbx1 bound to DNA: Hox hexapeptide and DNA recognition anterior to posterior. *Genes Dev* **17**: 2060-2072.
Lau PN, Cheung P. 2013. Elucidating combinatorial histone modifications and crosstalks by coupling histone-modifying enzyme with biotin ligase activity. *Nucleic Acids Res* **41**: e49.
Laue K, Daujat S, Crump JG, Plaster N, Roehl HH, Kimmel CB, Schneider R, Hammerschmidt M. 2008. The multidomain protein Brpf1 binds histones and is required for Hox gene expression and segmental identity. *Development* **135**: 1935-1946.
Lawrence HJ, Christensen J, Fong S, Hu YL, Weissman I, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. 2005. Loss of expression of the Hoxa-9 homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. *Blood* **106**: 3988-3994.
Lawrence HJ, Helgason CD, Sauvageau G, Fong S, Izon DJ, Humphries RK, Largman C. 1997. Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* **89**: 1922-1930.
Leffak IM, Grainger R, Weintraub H. 1977. Conservative assembly and segregation of nucleosomal histones. *Cell* **12**: 837-845.
Lenasi T, Barboric M. 2013. Mutual relationships between transcription and pre-mRNA processing in the synthesis of mRNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**: 139-154.
Lengerke C, Daley GQ. 2012. Caudal genes in blood development and leukemia. *Ann N Y Acad Sci* **1266**: 47-54.
Leo C, Chen JD. 2000. The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* **245**: 1-11.
Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. 1992. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* **71**: 865-873.
Lewis EB. 1978. A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature* **276**: 565-570.
Li L, Piloto O, Nguyen HB, Greenberg K, Takamiya K, Racke F, Huso D, Small D. 2008. Knock-in of an internal tandem duplication mutation into murine FLT3 confers myeloproliferative disease in a mouse model. *Blood* **111**: 3849-3858.

Li Z, Zhang Z, Li Y, Arnovitz S, Chen P, Huang H, Jiang X, Hong GM, Kunjamma RB, Ren H et al. 2013. PBX3 is an important cofactor of HOXA9 in leukemogenesis. *Blood* **121**: 1422-1431.

Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL. 2000. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* **5**: 917-926.

Lorenz E, Congdon CC. 1954. Modification of lethal irradiation injury in mice by injection of homologous or heterologous bone. *J Natl Cancer Inst* **14**: 955-965.

Lu Q, Knoepfler PS, Scheele J, Wright DD, Kamps MP. 1995. Both Pbx1 and E2A-Pbx1 bind the DNA motif ATCAATCAA cooperatively with the products of multiple murine Hox genes, some of which are themselves oncogenes. *Mol Cell Biol* **15**: 3786-3795.

Lufkin T, Dierich A, LeMeur M, Mark M, Chambon P. 1991. Disruption of the Hox-1.6 homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell* **66**: 1105-1119.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature* **389**: 251-260.

Luo Z, Lin C, Shilatifard A. 2012. The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 543-547.

Majeti R, Park CY, Weissman IL. 2007. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* **1**: 635-645.

Malhotra S, Kincade PW. 2009. Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. *Cell Stem Cell* **4**: 27-36.

Maloof JN, Whangbo J, Harris JM, Jongeward GD, Kenyon C. 1999. A Wnt signaling pathway controls hox gene expression and neuroblast migration in C. elegans. *Development* **126**: 37-49.

Mamo A, Krosl J, Kroon E, Bijl J, Thompson A, Mayotte N, Girard S, Bisaillon R, Beslu N, Featherstone M et al. 2006. Molecular dissection of Meis1 reveals 2 domains required for leukemia induction and a key role for Hoxa gene activation. *Blood* **108**: 622-629.

Mancini SJ, Mantei N, Dumortier A, Suter U, MacDonald HR, Radtke F. 2005. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* **105**: 2340-2342.

Mandel CR, Bai Y, Tong L. 2008. Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell Mol Life Sci* **65**: 1099-1122.

Mann RS, Chan SK. 1996. Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet* **12**: 258-262.

Mansfield JH, McGlinn E. 2012. Evolution, expression, and developmental function of Hox-embedded miRNAs. *Curr Top Dev Biol* **99**: 31-57.

Marshall H, Studer M, Popperl H, Aparicio S, Kuroiwa A, Brenner S, Krumlauf R. 1994. A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene Hoxb-1. *Nature* **370**: 567-571.

Matthews W, Jordan CT, Wiegand GW, Pardoll D, Lemischka IR. 1991. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* **65**: 1143-1152.

McCormack E, Bruserud O, Gjertsen BT. 2005. Animal models of acute myelogenous leukaemia - development, application and future perspectives. *Leukemia* **19**: 687-706.

McGonigle GJ, Lappin TR, Thompson A. 2008. Grappling with the HOX network in hematopoiesis and leukemia. *Front Biosci* **13**: 4297-4308.

McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, Klemsz M, Feeney AJ, Wu GE, Paige CJ et al. 1996. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* **15**: 5647-5658.

McKinney-Freeman SL, Lengerke C, Jang IH, Schmitt S, Wang Y, Philitas M, Shea J, Daley GQ. 2008. Modulation of murine embryonic stem cell-derived CD41+c-kit+ hematopoietic progenitors by ectopic expression of Cdx genes. *Blood* **111**: 4944-4953.
McMahon KA, Hiew SY, Hadjur S, Veiga-Fernandes H, Menzel U, Price AJ, Kioussis D, Williams O, Brady HJ. 2007. Mll has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* **1**: 338-345.
Meijsing SH, Ehrenhofer-Murray AE. 2001. The silencing complex SAS-I links histone acetylation to the assembly of repressed chromatin by CAF-I and Asf1 in Saccharomyces cerevisiae. *Genes Dev* **15**: 3169-3182.
Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**: 829-834.
Mercader N, Leonardo E, Azpiazu N, Serrano A, Morata G, Martinez C, Torres M. 1999. Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature* **402**: 425-429.
Metcalf D. 2008. Hematopoietic cytokines. *Blood* **111**: 485-491.
Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, Ben Abdelali R, Macintyre E, De Braekeleer E, De Braekeleer M et al. 2009. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* **23**: 1490-1499.
Miller CT, Maves L, Kimmel CB. 2004. moz regulates Hox expression and pharyngeal segmental identity in zebrafish. *Development* **131**: 2443-2461.
Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD, Hess JL. 2002. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* **10**: 1107-1117.
Milne TA, Hughes CM, Lloyd R, Yang Z, Rozenblatt-Rosen O, Dou Y, Schnepp RW, Krankel C, Livolsi VA, Gibbs D et al. 2005. Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 749-754.
Milner LA, Kopan R, Martin DI, Bernstein ID. 1994. A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood* **83**: 2057-2062.
Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D. 2003. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev* **17**: 71-97.
Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T et al. 1996. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**: 1261-1270.
Moggs JG, Orphanides G. 2001. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Rep* **2**: 775-781.
Mohan M, Lin C, Guest E, Shilatifard A. 2010. Licensed to elongate: a molecular mechanism for MLL-based leukaemogenesis. *Nat Rev Cancer* **10**: 721-728.
Monica K, Galili N, Nourse J, Saltman D, Cleary ML. 1991. PBX2 and PBX3, new homeobox genes with extensive homology to the human proto-oncogene PBX1. *Mol Cell Biol* **11**: 6149-6157.
Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S. 2001. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann N Y Acad Sci* **938**: 36-45; discussion 45-37.
Moreau I, Duvert V, Caux C, Galmiche MC, Charbord P, Banchereau J, Saeland S. 1993. Myofibroblastic stromal cells isolated from human bone marrow induce the proliferation of both early myeloid and B-lymphoid cells. *Blood* **82**: 2396-2405.

Morgan R, Begum R, Theti D, Chansa M, Pettengell R, Sohal J. 2005. HOXA9 expression increases with age in human haemopoietic cells. *Leuk Res* **29**: 1221-1222.
Morgan R, Pirard PM, Shears L, Sohal J, Pettengell R, Pandha HS. 2007. Antagonism of HOX/PBX dimer formation blocks the in vivo proliferation of melanoma. *Cancer Res* **67**: 5806-5813.
Morrison A, Moroni MC, Ariza-McNaughton L, Krumlauf R, Mavilio F. 1996. In vitro and transgenic analysis of a human HOXD4 retinoid-responsive enhancer. *Development* **122**: 1895-1907.
Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. 1997. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* **124**: 1929-1939.
Moskow JJ, Bullrich F, Huebner K, Daar IO, Buchberg AM. 1995. Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol Cell Biol* **15**: 5434-5443.
Mossadegh-Keller N, Sarrazin S, Kandalla PK, Espinosa L, Stanley ER, Nutt SL, Moore J, Sieweke MH. 2013. M-CSF instructs myeloid lineage fate in single haematopoietic stem cells. *Nature*.
Muller-Sieburg CE, Sieburg HB, Bernitz JM, Cattarossi G. 2012. Stem cell heterogeneity: implications for aging and regenerative medicine. *Blood* **119**: 3900-3907.
Müller M, Affolter M, Leupin W, Otting G, Wuthrich K, Gehring WJ. 1988. Isolation and sequence-specific DNA binding of the Antennapedia homeodomain. *EMBO J* **7**: 4299-4304.
Muntean AG, Hess JL. 2012. The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. *Annu Rev Pathol* **7**: 283-301.
Münzel M, Globisch D, Carell T. 2011. 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**: 6460-6468.
Murati A, Brecqueville M, Devillier R, Mozziconacci MJ, Gelsi-Boyer V, Birnbaum D. 2012. Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer* **12**: 304.
Na Nakorn T, Traver D, Weissman IL, Akashi K. 2002. Myeloerythroid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S. *J Clin Invest* **109**: 1579-1585.
Nagel S, Venturini L, Marquez VE, Meyer C, Kaufmann M, Scherr M, MacLeod RA, Drexler HG. 2010. Polycomb repressor complex 2 regulates HOXA9 and HOXA10, activating ID2 in NK/T-cell lines. *Mol Cancer* **9**: 151.
Nakamura T, Largaespada DA, Lee MP, Johnson LA, Ohyashiki K, Toyama K, Chen SJ, Willman CL, Chen IM, Feinberg AP et al. 1996a. Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat Genet* **12**: 154-158.
Nakamura T, Largaespada DA, Shaughnessy JD, Jr., Jenkins NA, Copeland NG. 1996b. Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nat Genet* **12**: 149-153.
Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R, Dubois G, Mazo A, Croce CM, Canaani E. 2002. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* **10**: 1119-1128.
Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* **292**: 110-113.
Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. 2009. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* **460**: 259-263.

Neff T, Sinha AU, Kluk MJ, Zhu N, Khattab MH, Stein L, Xie H, Orkin SH, Armstrong SA. 2012. Polycomb repressive complex 2 is required for MLL-AF9 leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 5028-5033.

Nguyen AT, Taranova O, He J, Zhang Y. 2011. DOT1L, the H3K79 methyltransferase, is required for MLL-AF9-mediated leukemogenesis. *Blood* **117**: 6912-6922.

Nishiyama M, Arai Y, Tsunematsu Y, Kobayashi H, Asami K, Yabe M, Kato S, Oda M, Eguchi H, Ohki M et al. 1999. 11p15 translocations involving the NUP98 gene in childhood therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* **26**: 215-220.

Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poeppl A, Jurisica I, Dick JE. 2011. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* **333**: 218-221.

Nuchprayoon I, Meyers S, Scott LM, Suzow J, Hiebert S, Friedman AD. 1994. PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells. *Mol Cell Biol* **14**: 5558-5568.

O'Connor JP, Peebles CL. 1992. PTA1, an essential gene of Saccharomyces cerevisiae affecting pre-tRNA processing. *Mol Cell Biol* **12**: 3843-3856.

Ohta K, Ohigashi M, Naganawa A, Ikeda H, Sakai M, Nishikawa J, Imagawa M, Osada S, Nishihara T. 2007. Histone acetyltransferase MOZ acts as a co-activator of Nrf2-MafK and induces tumour marker gene expression during hepatocarcinogenesis. *Biochem J* **402**: 559-566.

Ohta K, Osada S, J. N, Nishihara T. 2005. Cloning and characterization of a cDNA encoding the histone acetyltransferase Monocytic leukaelia zinc finger protein (MOZ) in Rat. *journal of health science* **51**: 3.

Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. 1996. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**: 321-330.

Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, Nagasawa T. 2010. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* **33**: 387-399.

Orkin SH, Zon LI. 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**: 631-644.

Owen DJ, Ornaghi P, Yang JC, Lowe N, Evans PR, Ballario P, Neuhaus D, Filetici P, Travers AA. 2000. The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J* **19**: 6141-6149.

Park S, Osmers U, Raman G, Schwantes RH, Diaz MO, Bushweller JH. 2010. The PHD3 domain of MLL acts as a CYP33-regulated switch between MLL-mediated activation and repression. *Biochemistry* **49**: 6576-6586.

Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. 2007. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5431-5436.

Patel A, Dharmarajan V, Vought VE, Cosgrove MS. 2009. On the mechanism of multiple lysine methylation by the human mixed lineage leukemia protein-1 (MLL1) core complex. *J Biol Chem* **284**: 24242-24256.

Peifer M, Wieschaus E. 1990. Mutations in the Drosophila gene extradenticle affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity. *Genes Dev* **4**: 1209-1223.

Pelletier N, Champagne N, Stifani S, Yang XJ. 2002. MOZ and MORF histone acetyltransferases interact with the Runt-domain transcription factor Runx2. *Oncogene* **21**: 2729-2740.

Perez-Campo FM, Borrow J, Kouskoff V, Lacaud G. 2009. The histone acetyl transferase activity of monocytic leukemia zinc finger is critical for the proliferation of hematopoietic precursors. *Blood* **113**: 4866-4874.
Perkins AC, Cory S. 1993. Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene. *EMBO J* **12**: 3835-3846.
Phelan ML, Rambaldi I, Featherstone MS. 1995. Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. *Mol Cell Biol* **15**: 3989-3997.
Phillips DM. 1963. The presence of acetyl groups of histones. *Biochem J* **87**: 258-263.
Pilon N, Oh K, Sylvestre JR, Savory JG, Lohnes D. 2007. Wnt signaling is a key mediator of Cdx1 expression in vivo. *Development* **134**: 2315-2323.
Pineault N, Helgason CD, Lawrence HJ, Humphries RK. 2002. Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Exp Hematol* **30**: 49-57.
Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, de la Cruz CC, Otte AP, Panning B, Zhang Y. 2003. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* **300**: 131-135.
Popovic R, Riesbeck LE, Velu CS, Chaubey A, Zhang J, Achille NJ, Erfurth FE, Eaton K, Lu J, Grimes HL et al. 2009. Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood* **113**: 3314-3322.
Popovic R, Zeleznik-Le NJ. 2005. MLL: how complex does it get? *J Cell Biochem* **95**: 234-242.
Pownall ME, Tucker AS, Slack JM, Isaacs HV. 1996. eFGF, Xcad3 and Hox genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in Xenopus. *Development* **122**: 3881-3892.
Preker PJ, Ohnacker M, Minvielle-Sebastia L, Keller W. 1997. A multisubunit 3' end processing factor from yeast containing poly(A) polymerase and homologues of the subunits of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor. *EMBO J* **16**: 4727-4737.
Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**: 501-512.
Putnik J, Zhang CD, Archangelo LF, Tizazu B, Bartels S, Kickstein M, Greif PA, Bohlander SK. 2007. The interaction of ETV6 (TEL) and TIP60 requires a functional histone acetyltransferase domain in TIP60. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 1211-1224.
Qiu Y, Liu L, Zhao C, Han C, Li F, Zhang J, Wang Y, Li G, Mei Y, Wu M et al. 2012. Combinatorial readout of unmodified H3R2 and acetylated H3K14 by the tandem PHD finger of MOZ reveals a regulatory mechanism for HOXA9 transcription. *Genes Dev* **26**: 1376-1391.
Ralston A, Shaw K. 2008. Gene expression regulates cell differentiation. *Nature education* **1**.
Rancourt DE, Tsuzuki T, Capecchi MR. 1995. Genetic interaction between hoxb-5 and hoxb-6 is revealed by nonallelic noncomplementation. *Genes Dev* **9**: 108-122.
Rando OJ. 2012. Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr Opin Genet Dev* **22**: 148-155.
Rangasamy D, Greaves I, Tremethick DJ. 2004. RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 650-655.
Rauskolb C, Wieschaus E. 1994. Coordinate regulation of downstream genes by extradenticle and the homeotic selector proteins. *EMBO J* **13**: 3561-3569.
Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD et al. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593-599.

Redline RW, Neish A, Holmes LB, Collins T. 1992. Homeobox genes and congenital malformations. *Lab Invest* **66**: 659-670.
Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**: 105-111.
Riggs AD. 1975. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* **14**: 9-25.
Rinn JL, Chang HY. 2012. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* **81**: 145-166.
Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E et al. 2007. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* **129**: 1311-1323.
Robertson KD. 2001. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* **20**: 3139-3155.
-. 2002. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* **21**: 5361-5379.
-. 2005. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* **6**: 597-610.
Rodriguez CR, Cho EJ, Keogh MC, Moore CL, Greenleaf AL, Buratowski S. 2000. Kin28, the TFIIH-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **20**: 104-112.
Rokudai S, Aikawa Y, Tagata Y, Tsuchida N, Taya Y, Kitabayashi I. 2009. Monocytic leukemia zinc finger (MOZ) interacts with p53 to induce p21 expression and cell-cycle arrest. *J Biol Chem* **284**: 237-244.
Rokudai S, Laptenko O, Arnal SM, Taya Y, Kitabayashi I, Prives C. 2013. MOZ increases p53 acetylation and premature senescence through its complex formation with PML. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 3895-3900.
Rosenbauer F, Tenen DG. 2007. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol* **7**: 105-117.
Rozenblatt-Rosen O, Rozovskaia T, Burakov D, Sedkov Y, Tillib S, Blechman J, Nakamura T, Croce CM, Mazo A, Canaani E. 1998. The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4152-4157.
Rozovskaia T, Feinstein E, Mor O, Foa R, Blechman J, Nakamura T, Croce CM, Cimino G, Canaani E. 2001. Upregulation of Meis1 and HoxA9 in acute lymphocytic leukemias with the t(4 : 11) abnormality. *Oncogene* **20**: 874-878.
Ryan K, Murthy KG, Kaneko S, Manley JL. 2002. Requirements of the RNA polymerase II C-terminal domain for reconstituting pre-mRNA 3' cleavage. *Mol Cell Biol* **22**: 1684-1692.
Sakabe K, Wang Z, Hart GW. 2010. Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 19915-19920.
Sarrazin S, Mossadegh-Keller N, Fukao T, Aziz A, Mourcin F, Vanhille L, Kelly Modis L, Kastner P, Chan S, Duprez E et al. 2009. MafB restricts M-CSF-dependent myeloid commitment divisions of hematopoietic stem cells. *Cell* **138**: 300-313.
Satokata I, Benson G, Maas R. 1995. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature* **374**: 460-463.
Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, Largman C, Lawrence HJ, Humphries RK. 1994. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12223-12227.
Schofield R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**: 7-25.

Schuettengruber B, Martinez AM, Iovino N, Cavalli G. 2011. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 799-814.
Schwartz YB, Pirrotta V. 2007. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet* **8**: 9-22.
Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H. 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**: 1573-1577.
Shearwin KE, Callen BP, Egan JB. 2005. Transcriptional interference--a crash course. *Trends Genet* **21**: 339-345.
Shen WF, Detmer K, Mathews CH, Hack FM, Morgan DA, Largman C, Lawrence HJ. 1992. Modulation of homeobox gene expression alters the phenotype of human hematopoietic cell lines. *EMBO J* **11**: 983-989.
Shen WF, Largman C, Lowney P, Hack FM, Lawrence HJ. 1989. Expression of homeobox genes in human erythroleukemia cells. *Adv Exp Med Biol* **271**: 211-219.
Shen WF, Montgomery JC, Rozenfeld S, Moskow JJ, Lawrence HJ, Buchberg AM, Largman C. 1997. AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol Cell Biol* **17**: 6448-6458.
Shen WF, Rozenfeld S, Kwong A, Kom ves LG, Lawrence HJ, Largman C. 1999. HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Mol Cell Biol* **19**: 3051-3061.
Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**: 941-953.
Simeone A, Acampora D, Arcioni L, Andrews PW, Boncinelli E, Mavilio F. 1990. Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* **346**: 763-766.
Simeone A, Pannese M, Acampora D, D'Esposito M, Boncinelli E. 1988. At least three human homeoboxes on chromosome 12 belong to the same transcription unit. *Nucleic Acids Res* **16**: 5379-5390.
Sims RJ, 3rd, Belotserkovskaya R, Reinberg D. 2004. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev* **18**: 2437-2468.
Sims RJ, 3rd, Millhouse S, Chen CF, Lewis BA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Manley JL, Reinberg D. 2007. Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **28**: 665-676.
Sitnicka E, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Buza-Vidas N, Adolfsson J, Jacobsen SE. 2002. Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* **17**: 463-472.
Sitwala KV, Dandekar MN, Hess JL. 2008. HOX proteins and leukemia. *Int J Clin Exp Pathol* **1**: 461-474.
Slany RK. 2005. When epigenetics kills: MLL fusion proteins in leukemia. *Hematol Oncol* **23**: 1-9.
Smith E, Lin C, Shilatifard A. 2011. The super elongation complex (SEC) and MLL in development and disease. *Genes Dev* **25**: 661-672.
Smith JE, Jr., Bollekens JA, Inghirami G, Takeshita K. 1997. Cloning and mapping of the MEIS1 gene, the human homolog of a murine leukemogenic gene. *Genomics* **43**: 99-103.
Somervaille TC, Matheny CJ, Spencer GJ, Iwasaki M, Rinn JL, Witten DM, Chang HY, Shurtleff SA, Downing JR, Cleary ML. 2009. Hierarchical maintenance of MLL myeloid leukemia stem cells employs a transcriptional program shared with embryonic rather than adult stem cells. *Cell Stem Cell* **4**: 129-140.

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**: 58-62.
Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ et al. 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**: 194-198.
Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. 2001. Stem cells find their niche. *Nature* **414**: 98-104.
St-Jacques B, McMahon AP. 1996. Early mouse development: lessons from gene targeting. *Curr Opin Genet Dev* **6**: 439-444.
Sterner DE, Berger SL. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 435-459.
Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45.
Subramanian V, Meyer BI, Gruss P. 1995. Disruption of the murine homeobox gene Cdx1 affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell* **83**: 641-653.
Sugimura R, He XC, Venkatraman A, Arai F, Box A, Semerad C, Haug JS, Peng L, Zhong XB, Suda T et al. 2012. Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell* **150**: 351-365.
Swigut T, Wysocka J. 2007. H3K27 demethylases, at long last. *Cell* **131**: 29-32.
Tabariès S, Lapointe J, Besch T, Carter M, Woollard J, Tuggle CK, Jeannotte L. 2005. Cdx protein interaction with Hoxa5 regulatory sequences contributes to Hoxa5 regional expression along the axial skeleton. *Mol Cell Biol* **25**: 1389-1401.
Takagaki Y, Manley JL. 2000. Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component. *Mol Cell Biol* **20**: 1515-1525.
Takahashi A, Satake M, Yamaguchi-Iwai Y, Bae SC, Lu J, Maruyama M, Zhang YW, Oka H, Arai N, Arai K et al. 1995. Positive and negative regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter activity by AML1-related transcription factor, PEBP2. *Blood* **86**: 607-616.
Takeda A, Goolsby C, Yaseen NR. 2006a. NUP98-HOXA9 induces long-term proliferation and blocks differentiation of primary human CD34+ hematopoietic cells. *Cancer Res* **66**: 6628-6637.
Takeda S, Chen DY, Westergard TD, Fisher JK, Rubens JA, Sasagawa S, Kan JT, Korsmeyer SJ, Cheng EH, Hsieh JJ. 2006b. Proteolysis of MLL family proteins is essential for taspase1-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev* **20**: 2397-2409.
Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, Shima H, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M et al. 2010. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **7**: 391-402.
Tan L, Xiong L, Xu W, Wu F, Huang N, Xu Y, Kong L, Zheng L, Schwartz L, Shi Y et al. 2013. Genome-wide comparison of DNA hydroxymethylation in mouse embryonic stem cells and neural progenitor cells by a new comparative hMeDIP-seq method. *Nucleic Acids Res* **41**: e84.
Tanaka Y, Kawahashi K, Katagiri Z, Nakayama Y, Mahajan M, Kioussis D. 2011. Dual function of histone H3 lysine 36 methyltransferase ASH1 in regulation of Hox gene expression. *PLoS One* **6**: e28171.
Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ. 2007. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 1025-1040.
Teitell MA, Pandolfi PP. 2009. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Annu Rev Pathol* **4**: 175-198.

Terranova R, Agherbi H, Boned A, Meresse S, Djabali M. 2006. Histone and DNA methylation defects at Hox genes in mice expressing a SET domain-truncated form of Mll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6629-6634.
Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H, Ziemin-van der Poel S, Kaneko Y, Morgan R, Sandberg AA et al. 1993. Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med* **329**: 909-914.
Thomas T, Corcoran LM, Gugasyan R, Dixon MP, Brodnicki T, Nutt SL, Metcalf D, Voss AK. 2006. Monocytic leukemia zinc finger protein is essential for the development of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Genes Dev* **20**: 1175-1186.
Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, Lawrence HJ, Humphries K, Sauvageau G. 2002. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* **99**: 121-129.
Tian B, Hu J, Zhang H, Lutz CS. 2005. A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res* **33**: 201-212.
Till JE, McCulloch E. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**: 213-222.
Trump D, Farren B, Wooding C, Pang JT, Besser GM, Buchanan KD, Edwards CR, Heath DA, Jackson CE, Jansen S et al. 1996. Clinical studies of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *QJM* **89**: 653-669.
Tsukada Y, Nakayama KI. 2010. In vitro histone demethylase assay. *Cold Spring Harb Protoc* **2010**: pdb prot5512.
Tsuzuki S, Seto M. 2012. Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem and progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood* **119**: 727-735.
Tucker KL. 2001. Methylated cytosine and the brain: a new base for neuroscience. *Neuron* **30**: 649-652.
Turner BM. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**: 285-291.
Ullah M, Pelletier N, Xiao L, Zhao SP, Wang K, Degerny C, Tahmasebi S, Cayrou C, Doyon Y, Goh SL et al. 2008. Molecular architecture of quartet MOZ/MORF histone acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol* **28**: 6828-6843.
Valor LM, Pulopulos MM, Jimenez-Minchan M, Olivares R, Lutz B, Barco A. 2011. Ablation of CBP in forebrain principal neurons causes modest memory and transcriptional defects and a dramatic reduction of histone acetylation but does not affect cell viability. *J Neurosci* **31**: 1652-1663.
Vermeulen M, Mulder KW, Denissov S, Pijnappel WW, van Schaik FM, Varier RA, Baltissen MP, Stunnenberg HG, Mann M, Timmers HT. 2007. Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* **131**: 58-69.
Vethantham V, Rao N, Manley JL. 2007. Sumoylation modulates the assembly and activity of the pre-mRNA 3' processing complex. *Mol Cell Biol* **27**: 8848-8858.
Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. 2004. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* **103**: 3258-3264.
Voss AK, Collin C, Dixon MP, Thomas T. 2009. Moz and retinoic acid coordinately regulate H3K9 acetylation, Hox gene expression, and segment identity. *Dev Cell* **17**: 674-686.
Voss AK, Vanyai HK, Collin C, Dixon MP, McLennan TJ, Sheikh BN, Scambler P, Thomas T. 2012. MOZ regulates the Tbx1 locus, and Moz mutation partially phenocopies DiGeorge syndrome. *Dev Cell* **23**: 652-663.
Walton EL, Francastel C, Velasco G. 2011. Maintenance of DNA methylation: Dnmt3b joins the dance. *Epigenetics* **6**: 1373-1377.
Wang GG, Allis CD, Chi P. 2007. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med* **13**: 363-372.

Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP. 2005. Meis1 programs transcription of FLT3 and cancer stem cell character, using a mechanism that requires interaction with Pbx and a novel function of the Meis1 C-terminus. *Blood* **106**: 254-264.
Wang J, Muntean AG, Hess JL. 2012. ECSASB2 mediates MLL degradation during hematopoietic differentiation. *Blood* **119**: 1151-1161.
Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, Lajoie BR, Protacio A, Flynn RA, Gupta RA et al. 2011. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* **472**: 120-124.
Wang Z, Song J, Milne TA, Wang GG, Li H, Allis CD, Patel DJ. 2010. Pro isomerization in MLL1 PHD3-bromo cassette connects H3K4me readout to CyP33 and HDAC-mediated repression. *Cell* **141**: 1183-1194.
Weintraub H, Worcel A, Alberts B. 1976. A model for chromatin based upon two symmetrically paired half-nucleosomes. *Cell* **9**: 409-417.
Wiederschain D, Kawai H, Shilatifard A, Yuan ZM. 2005. Multiple mixed lineage leukemia (MLL) fusion proteins suppress p53-mediated response to DNA damage. *J Biol Chem* **280**: 24315-24321.
Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, 3rd, Nusse R. 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**: 448-452.
Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**: 810-813.
Wilson A, Trumpp A. 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* **6**: 93-106.
Winkler IG, Sims NA, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, Poulton IJ, van Rooijen N, Alexander KA, Raggatt LJ et al. 2010. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* **116**: 4815-4828.
Wirbelauer C, Bell O, Schubeler D. 2005. Variant histone H3.3 is deposited at sites of nucleosomal displacement throughout transcribed genes while active histone modifications show a promoter-proximal bias. *Genes Dev* **19**: 1761-1766.
Wolffe AP, Hayes JJ. 1999. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res* **27**: 711-720.
Woodcock CL, Dimitrov S. 2001. Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 130-135.
Wysocka J, Swigut T, Milne TA, Dou Y, Zhang X, Burlingame AL, Roeder RG, Brivanlou AH, Allis CD. 2005. WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* **121**: 859-872.
Xia ZB, Anderson M, Diaz MO, Zeleznik-Le NJ. 2003. MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8342-8347.
Xiang K, Nagaike T, Xiang S, Kilic T, Beh MM, Manley JL, Tong L. 2010. Crystal structure of the human symplekin-Ssu72-CTD phosphopeptide complex. *Nature* **467**: 729-733.
Xing H, Mayhew CN, Cullen KE, Park-Sarge OK, Sarge KD. 2004. HSF1 modulation of Hsp70 mRNA polyadenylation via interaction with symplekin. *J Biol Chem* **279**: 10551-10555.
Yagi H, Deguchi K, Aono A, Tani Y, Kishimoto T, Komori T. 1998. Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice. *Blood* **92**: 108-117.
Yan J, Chen YX, Desmond A, Silva A, Yang Y, Wang H, Hua X. 2006. Cdx4 and menin co-regulate Hoxa9 expression in hematopoietic cells. *PLoS One* **1**: e47.

Yan Y, Barlev NA, Haley RH, Berger SL, Marmorstein R. 2000. Crystal structure of yeast Esa1 suggests a unified mechanism for catalysis and substrate binding by histone acetyltransferases. *Mol Cell* **6**: 1195-1205.
Yang L, Embree LJ, Tsai S, Hickstein DD. 1998. Oncoprotein TLS interacts with serine-arginine proteins involved in RNA splicing. *J Biol Chem* **273**: 27761-27764.
Yang XJ. 2004. Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays* **26**: 1076-1087.
Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y. 1996. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**: 319-324.
Yang XJ, Seto E. 2007. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* **26**: 5310-5318.
Yang XJ, Ullah M. 2007. MOZ and MORF, two large MYSTic HATs in normal and cancer stem cells. *Oncogene* **26**: 5408-5419.
Yao L, Yokota T, Xia L, Kincade PW, McEver RP. 2005. Bone marrow dysfunction in mice lacking the cytokine receptor gp130 in endothelial cells. *Blood* **106**: 4093-4101.
Yap KL, Zhou MM. 2010. Keeping it in the family: diverse histone recognition by conserved structural folds. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**: 488-505.
Yasunaga S, Ohtsubo M, Ohno Y, Saeki K, Kurogi T, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Shirai M, Mihara K, Brock HW et al. 2013. Scmh1 has E3 ubiquitin ligase activity for geminin and histone H2A and regulates geminin stability directly or indirectly via transcriptional repression of Hoxa9 and Hoxb4. *Mol Cell Biol* **33**: 644-660.
Yokoyama A, Cleary ML. 2008. Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. *Cancer Cell* **14**: 36-46.
Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J, Sanyal M, Aufiero DJ, Kitabayashi I, Herr W, Cleary ML. 2004. Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol* **24**: 5639-5649.
Young T, Deschamps J. 2009. Hox, Cdx, and anteroposterior patterning in the mouse embryo. *Curr Top Dev Biol* **88**: 235-255.
Yu BD, Hanson RD, Hess JL, Horning SE, Korsmeyer SJ. 1998. MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10632-10636.
Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GA, Korsmeyer SJ. 1995. Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* **378**: 505-508.
Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ et al. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**: 836-841.
Zhang Y, Reinberg D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**: 2343-2360.
Zhang Y, Yan X, Sashida G, Zhao X, Rao Y, Goyama S, Whitman SP, Zorko N, Bernot K, Conway RM et al. 2012. Stress hematopoiesis reveals abnormal control of self-renewal, lineage bias, and myeloid differentiation in Mll partial tandem duplication (Mll-PTD) hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* **120**: 1118-1129.
Zhao J, Kessler M, Helmling S, O'Connor JP, Moore C. 1999. Pta1, a component of yeast CF II, is required for both cleavage and poly(A) addition of mRNA precursor. *Mol Cell Biol* **19**: 7733-7740.
Zhu B, Reinberg D. 2011. Epigenetic inheritance: uncontested? *Cell Res* **21**: 435-441.
Zhuravleva J, Paggetti J, Martin L, Hammann A, Solary E, Bastie JN, Delva L. 2008. MOZ/TIF2-induced acute myeloid leukaemia in transgenic fish. *Br J Haematol* **143**: 378-382.

Zinszner H, Sok J, Immanuel D, Yin Y, Ron D. 1997. TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* **110 (Pt 15)**: 1741-1750.