



HAL
open science

Evaluation du potentiel clinique de l'expression ectopique de gènes dans les Leucémies Lymphoblastiques Aigues

Jin Wang Mi

► **To cite this version:**

Jin Wang Mi. Evaluation du potentiel clinique de l'expression ectopique de gènes dans les Leucémies Lymphoblastiques Aigues. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV046 . tel-01165090

HAL Id: tel-01165090

<https://theses.hal.science/tel-01165090v1>

Submitted on 18 Jun 2015

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité Biologie Cellulaire

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Jin WANG

Thèse dirigée par **Dr. Saadi KHOCHBIN**

préparée au sein du **Laboratoire Institut Albert Bonniot**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

Evaluation du potentiel clinique de l'expression ectopique de gènes dans les Leucémies Aiguës Lymphoblastiques

Thèse soutenue publiquement le **13 décembre 2013**,
devant le jury composé de :

Pr Mireille MOUSSEAU, PUPH

Université Grenoble 1

Président

Pr Philippe GUARDIOLA, PUPH

INSERM U892, CR Cancer Nantes-Angers

Rapporteur

Dr Jean IMBERT, DR INSERM

TAGC UMR INSERM Université Marseille

Rapporteur

Dr Saadi KHOCHBIN, DR CNRS

Université Grenoble 1

Examineur

*Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP*



THÈSE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE
Spécialité Biologie Cellulaire
Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par
Jin WANG

Thèse dirigée par Dr. Saadi KHOCHBIN

préparée au sein du Laboratoire Institut Albert Bonniot
dans l'École Doctorale Chimie et Science du Vivant

Evaluation du potentiel clinique de l'expression ectopique de gènes dans les Leucémies Aiguës
Lymphoblastiques

Thèse soutenue publiquement le 13 décembre 2013,
devant le jury composé de :

Pr Mireille MOUSSEAU, PUPH
Université Grenoble 1 Président

Pr Philippe GUARDIOLA, PUPH
INSERM U892, CR Cancer Nantes-Angers Rapporteur

Dr Jean IMBERT, DR INSERM
TAGC UMR INSERM Université Marseille Rapporteur

Dr Saadi KHOCHBIN, DR CNRS
Université Grenoble 1 Examineur

A mon maître Pr. ZhenYi WANG

Et à mon époux Jian-Qing

Sommaire

Remerciements	9-10
INTRODUCTION	11-69
Partie I : Leucémies Lymphoblastiques Aiguës	11-29
Partie II : notions de bases sur la chromatine et les mécanismes épigénétiques impliqués dans la régulation des gènes	30-36
Partie III : Activation ectopique de gènes dans les cancers	37-69
Objectifs de thèse et présentation générale du travail	70
MÉTHODES	71-79
RÉSULTATS	80-101
Tableaux S1 à S5 et légendes correspondantes	102-106
DISCUSSION	107-111
Références	112-127

Liste des Figures

Figure 1. Sous-types cytogénétiques et moléculaires des LAL	14
Figure 2. LAL hyperdiploïdes	15
Figure 3. Transformation des cellules hématopoïétiques dans la pathogénèse des LAL	16
Figure 4. Mécanisme de répression de la transcription par la protéine de fusion TEL-AML1	19
Figure 5. Chromosome Philadelphie	20
Figure 6. Trente années d'observation du nucléosome	31
Figure 7. Le nucléosome et ses constituants	32
Figure 8. Méthylation de l'ADN	33
Figure 9. Principales Histones Acétyltransferases (HAT) eucaryotes	34
Figure 10. Les histones déacétylases (HDAC)	35
Figure 11. Nouvelles propriétés acquises par les cellules cancéreuses.	38
Figure 12. Organisation du testicule adulte	43
Figure 13. Déroulement de la spermatogénèse	44
Figure 14. Composants de la chromatine au cours de la spermatogénèse	46
Figure 15. Rôle oncogénique de la protéine de fusion BRD4-NUT dans le Carcinome Non différencié de la Ligne Médiane	54
Figure 16. Hypothèse pour un mécanisme de dérégulation de l'épigénome	62
Figure 18. Identification des 8 gènes dont l'expression ectopique dans la moelle osseuse des LAL pédiatriques est associée au pronostic	82
Figure 19. L'expression ectopique de 8 gènes spécifiques de tissus (de la lignée germinale ou cellules ES ou placenta) est associée au pronostic des enfants atteints de LAL	85
Figure 20. Définition d'une méthode de classification pour la prédiction du pronostic chez les enfants atteints de LAL	89
Figure 21. Estimations de la survie cumulée globale par Kaplan Meyer, comparant les patients LAL de GSE11877 et de GSE7440	91

après classification finale utilisant l'algorithme des 8 gènes.

Figure 22. Classes moléculaires / cliniques sans incidence sur le pronostic des enfants atteints de LAL de cette série (GSE11877). 92

Figure 23. Groupes de pronostic et données biocliniques chez les enfants atteints de LAL (GSE11877) 94

Figure 24. L'expression ectopique de ces mêmes 8 gènes peut également établir un pronostic chez les LAL chez l'adulte 94

Figure 25. Le profil d'expression génique et l'analyse fonctionnelle caractérisant le groupe « P3 » des LAL agressives chez les enfants (GSE11877), chevauche celui des LAL de l'adulte 100

Liste des Tableaux

Tableau S1. Les données cliniques et biologiques de nos 31 patients tous, et les résultats détaillés de notre test de détection basé sur la RT-qPCR des 8 gènes associés au pronostic 102

Tableau S2. Liste des amorces utilisées pour le test de détection des 8 gènes basé sur RT- Qpcr 103

Tableau S3. Liste des 8 gènes dont l'expression est associée à un pronostic dans les LAL de l'enfant 104

Tableau S4. Hazard ratios selon le modèle de régression de Cox testant l'association au pronostic de notre algorithme de 8 gènes classificateurs dans une analyse multivariée, avec d'autres paramètres cliniques et biologiques 105

Tableau S5. Répartition des sous-types moléculaires des LAL chez l'adulte dans les groupes P1 & 2 et P3 définis par notre algorithme de 8 gènes 106

Liste des abréviations

A : Acétylation ;
ABL : Abelson
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
ATAD2 : ATPase family, AAA domain containing 2
BCR : Breakpoint Cluster Region
BM : Moelle osseuse
BMT : Transplantation de moelle osseuse
BRDT : Bromodomain testis-specific protein
CAGE : Cap analysis gene expression
CBFb : Core-Binding Factor, beta
CD : Cluster of Differentiation
CRLF : Cytokine receptor-like factor 2
C/T : Cancer / Testis
CTCF : CCCTC-binding factor (11-zinc finger protein)
DLBCL : Lymphome diffus à grandes cellules B
DNMT : ADN Methyl transférase
E2A : Transcription Factor E2-Alpha (Transcription Factor 3, TCF3)
E2F6 : E2F transcription factor 6
EBNA : Epstein–Barr virus nuclear-antigen
EBV : Virus d'Epstein –Barr
ESC : Cellules Souches Embryonnaires
ETV6/RUNX1 : Ets variant 6 / Runt-related transcription factor 1
G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GEO : Gene Expression Omnibus
GSEA : GeneSet Enrichment Analysis
H : Histone
HAT : Histone Acétyltransférase
HDAC : Histone Désacétylase

HDM : Histone Déméthylases
HMT : Histone Methyltransferases
HOX : Homeobox
HR : Hazard ratios
IGFBP5 : Insulin-like growth factor binding protein 5
IGH : Immunoglobulin heavy locus
IKZF : IKAROS family zinc finger
JARID1d : Lysine-specific demethylase 5D
LAL : Leucémie Lymphoblastique Aiguë
LAM : Leucémie Aiguë Myeloblastique
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
M : Méthylation
MAGE: Melanoma antigen family
MiR : microRNA
MLL : Mixed Lineage Leukemia
MRD : Minimal Residual Disease
MYC: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NMC : NUT-Midline Carcinoma
NUT : Nuclear protein in testis
OMS : Organisation mondiale de la santé
P : Phosphorylation
pb : Paires de bases
PBX1 : Pre-B-Cell Leukemia Homeobox 1
PCGF6 : Polycomb group ring finger 6
qPCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
RC : Rémission complète
Ph : Chromosome Philadelphie
RHD : Runt Homology Domain
RT : Reverse transcription
SH3RF3 : SH3 domain containing ring finger 3
SNC : Système nerveux central
SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier, SUMOylation

TA : Activation transcriptionnelle

TDT : Désoxynucléotidyltransférase Terminale

TEL / AML1: Translocation ETS Leukemia / Acute Myeloid Leukemia 1

TKI : Inhibiteur de tyrosine kinase

U : Ubiquitination

WBC : White Blood Cell

Remerciements

Tout d'abord, je suis profondément reconnaissante envers Monsieur Saadi Khochbin de m'avoir accueillie dans son laboratoire et ainsi de m'avoir permis de réaliser ce travail passionnant. Il m'a bien soutenue et m'a fait profiter de ses connaissances scientifiques. Grâce à son encadrement, j'ai pu réaliser la partie expérimentale de mes travaux entre l'institut Albert Bonniot de Grenoble et l'institut d'hématologie de Shanghai. Surtout, le plus important, il m'a appris la démarche scientifique qui pourra me servir tout au long de ma vie professionnelle. Qu'il trouve ici l'expression de tous mes respects pour sa sagesse, sa gentillesse et sa disponibilité.

J'exprime particulièrement ma reconnaissance à Madame Sophie Rousseaux qui a toujours fait preuve d'une grande patience et d'une gentillesse à mon égard. Je la remercie également de m'avoir apportée toutes ses connaissances et son expérience en biologie et sa précieuse aide pour la réalisation de ce manuscrit. Ses compétences en bio-informatique m'ont toujours bien impressionné. Qu'elle trouve ici l'expression de toute mon amitié.

Je suis très reconnaissante envers Madame Mireille Mousseau, PU-PH du service de cancérologie, CHU de Grenoble, d'avoir bien voulu assurer la présidence du jury ; Monsieur Jean Imbert, Directeur de Recherche à l'Inserm TAGC UMR, à l'Université d'Aix-Marseille et Monsieur Philippe Guardiola, PU-PH à l'INSERM U892, au Centre de Recherche sur le Cancer de Nantes-Angers, de me faire l'honneur de participer au jury et d'être rapporteurs.

J'exprime ma reconnaissance au Dr. Karin Sadoul, pour son aide et la préparation de mes premières expériences sur la recherche de plaquettes pendant mon stage de M2.

Je remercie Anne-Laure, Alexandra, Aude, Sandrine, Fayçal, Thierry du "SK team", pour leur aide, leur grande gentillesse et leur amitié.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à tous les thésards du laboratoire que j'ai pu rencontrer, pour leur aide et leur complicité. Je leur souhaite un très bon avenir.

Merci à tout le personnel de l'IAB que j'ai pu côtoyer au cours de mon séjour.

Je tiens à remercier le Pr. Jean-Jacques SOTTO, qui m'a transmis des connaissances solides en clinique médicale, ainsi que Mme SOTTO, qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Merci au Pr. Jean-Yves CAHN, à Brigitte, Lysiane, Rémy, Stéphane et toute l'équipe clinique pour leur sympathie et leurs encouragements.

Je voudrais remercier du fond du cœur Mme Delphine Khochbin pour le soutien tout au long de ces années, son aide, sa gentillesse, son accueil et la qualité de sa personnalité exceptionnelle.

Je voudrais remercier spécialement Monsieur Pierre-Yves Perche, qui m'a accompagnée pour perfectionner le français ; ses conseils m'enrichissent.

Enfin, je voudrais remercier toute ma famille pour leur amour et leur soutien...

INTRODUCTION

Partie I : Leucémies Lymphoblastiques Aiguës

La Leucémie Lymphoblastique Aiguë (LAL) est une maladie hématologique hétérogène caractérisée par la prolifération des lymphoblastes dans la moelle osseuse, le sang périphérique, et d'autres organes (Jabbour et al. 2005). C'est la forme la plus commune de leucémie chez l'enfant, représentant près de 80% des leucémies aiguës chez les enfants. En revanche, les LAL représentent seulement environ 20% de toutes les leucémies chez les adultes (Esparza and Sakamoto 2005). Bien que la survie des enfants atteints de LAL se soit améliorée, avec un taux de guérison d'environ 80 %, la survie des nourrissons (enfants de moins de 12 mois), des patients qui font une rechute, reste décevante (Carroll and Raetz 2012). En effet le pronostic à long terme pour les adultes atteints de LAL reste mauvais, avec des taux de guérison allant de 30% à 40% seulement (Thomas et al. 2004), malgré l'utilisation large de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

Plusieurs paramètres cliniques (par exemple l'âge et le sexe) et biologiques (par exemple nombre de leucocytes sanguins, le génotype des lymphoblastes, la réponse initiale au traitement) sont en corrélation avec les résultats du traitement et le pronostic des patients. Chez l'enfant, l'âge (nourrisson ou ≥ 10 ans), une hyperleucocytose au diagnostic ($\geq 50 \times 10^9/L$), l'origine ethnique (hispanique ou noire), le sexe masculin, l'immunophénotype des lymphocytes T et/ou un réarrangement MLL (surtout chez le nourrisson de moins de 6 mois) sont tous des facteurs de pronostic clinique défavorable (Smith et al. 1996). Chez les adultes, un âge avancé (en particulier ≥ 60 ans) et une hyperleucocytose au diagnostic ($\geq 30 \times 10^9/L$ pour les LAL de la lignée B ou $\geq 100 \times 10^9/L$ pour les LAL de la lignée T) sont des facteurs de mauvais pronostic (Rowe et al. 2005).

Cependant, ces paramètres ne suffisent pas à expliquer les différences de pronostic chez les patients. Cette différence de survie à long terme entre les

enfants et les adultes peut s'expliquer en partie par des différences dans la fréquence de certains sous-types cytogénétiques de LAL. Par exemple, les formes de LAL caractérisées par la présence du gène de fusion TEL- AML1 et d'une hyperdiploïdie (> 50 chromosomes) sont plus fréquemment observées chez les enfants (22 % et 25 % des cas, respectivement) que chez les adultes (2% et 7%, respectivement) et sont associées à un pronostic favorable, ce qui peut être attribué à une plus grande sensibilité à la chimiothérapie des blastes leucémiques hébergeant ces anomalies génétiques spécifiques (Armstrong and Look 2005; Moorman et al. 2010a). Les LAL à cellules B avec t (9;22) / BCR- ABL, qui sont des formes à « haut risque », sont beaucoup moins fréquentes chez les enfants (3%) que chez les adultes (25%) (Pui et al. 2004). Après des décennies d'efforts, plusieurs marqueurs moléculaires génétiques importants pour le pronostic ont été trouvés, et les patients peuvent être divisés en groupes distincts en fonction de la présence ou de l'absence de ces marqueurs. Cependant, outre les anomalies liées au chromosome Ph et au gène MLL, un nombre relativement faible de marqueurs pronostic ont été identifiés pour classer les LAL-B chez l'adulte, et il en va de même pour les LAL-T. Il est donc important de poursuivre la découverte de nouveaux biomarqueurs, pour optimiser la classification des LAL-B ou des LAL-T. Avec l'approfondissement des connaissances sur la pathogenèse des LAL, de nouveaux marqueurs moléculaires ayant une importance pronostique sont régulièrement découverts. Par exemple, une altération du gène IKZF1 a récemment été identifiée comme marqueur de risque élevé (Mi et al. 2012b). Le gène IKZF1 code pour le facteur IKAROS qui est nécessaire pour le développement de la lignée lymphoïde. Il est altéré dans 15 % des cas de LAL-B, et cette altération est associée à un risque accru d'échec thérapeutique et de rechute dans les LAL, que celles-ci soient BCR-ABL -positives ou négatives. Un autre exemple est la surexpression du gène CRLF2, qui a été rapportée comme principal facteur de risque intermédiaire dans la LAL-B (Mi et al. 2012b). CRLF2 code pour le récepteur de la lymphopoïétine stromale

thymique. Il se produit soit un réarrangement de CRLF2 dans le locus des chaînes lourdes des immunoglobulines dans la région 14q32, soit une délétion focale immédiatement en amont du gène, aboutissant à de nouvelles fusions IGH@-CRLF2 et P2RY8-CRLF2, respectivement. Les deux événements dérégulent l'expression de CRLF2, conduisant à une augmentation de son expression par les lymphoblastes.

À ce jour, la maladie résiduelle (MRD, pour « Minimal Residual Disease ») est le facteur pronostic le plus puissant chez les enfants et adultes atteints de LAL (Basso et al. 2009; Pui et al. 2009). La réponse au traitement, en particulier la réponse précoce, est prédictive du risque de rechute, et elle est utilisée pour guider le traitement ultérieur, en fonction du risque (Basso et al. 2009). La mesure de la MRD pendant ou à la fin du traitement d'induction est réalisée soit en cytométrie de flux soit par PCR. Un taux de MRD inférieur à 0.01 % permet d'identifier les patients avec une réponse précoce exceptionnellement bonne et donc un faible risque de rechute. La PCR est généralement plus sensible que la cytométrie de flux (environ 0.001 % contre environ 0.01 %) (Stow et al. 2010). Toutefois la sensibilité de la cytométrie en flux peut être améliorée avec des combinaisons (multi-couleurs) de marqueurs supplémentaires associés à la leucémie. En outre, la cytométrie en flux est plus rapide, généralement moins chère, permettant une adaptation précoce du traitement au risque (Nachman et al. 1998).

Un ajustement du traitement basé sur les caractéristiques décrites ci-dessus (que l'on appelle « stratification du risque ») a permis une intensification thérapeutique chez certains patients pour améliorer les résultats, tout en évitant d'augmenter les doses inutilement chez les patients ayant un pronostic favorable.

Cependant, en dépit de ces progrès, un nombre important de rechutes surviennent chez des patients initialement classés comme à faible risque, ce qui doit inciter à la recherche de variables supplémentaires en vue d'affiner la stratification du risque. De plus, l'identification des voies de signalisation

biologiques responsables de la transformation et de la résistance à la thérapie permettra le développement d'approches ciblées, évitant ainsi les effets secondaires collatéraux des chimiothérapies conventionnelles.

Sous-types cytogénétiques et moléculaires des LAL

La figure 1 représente les différents sous-types cytogénétiques et moléculaires des LAL et leurs fréquences respectives dans les LAL de l'enfant et de l'adulte.

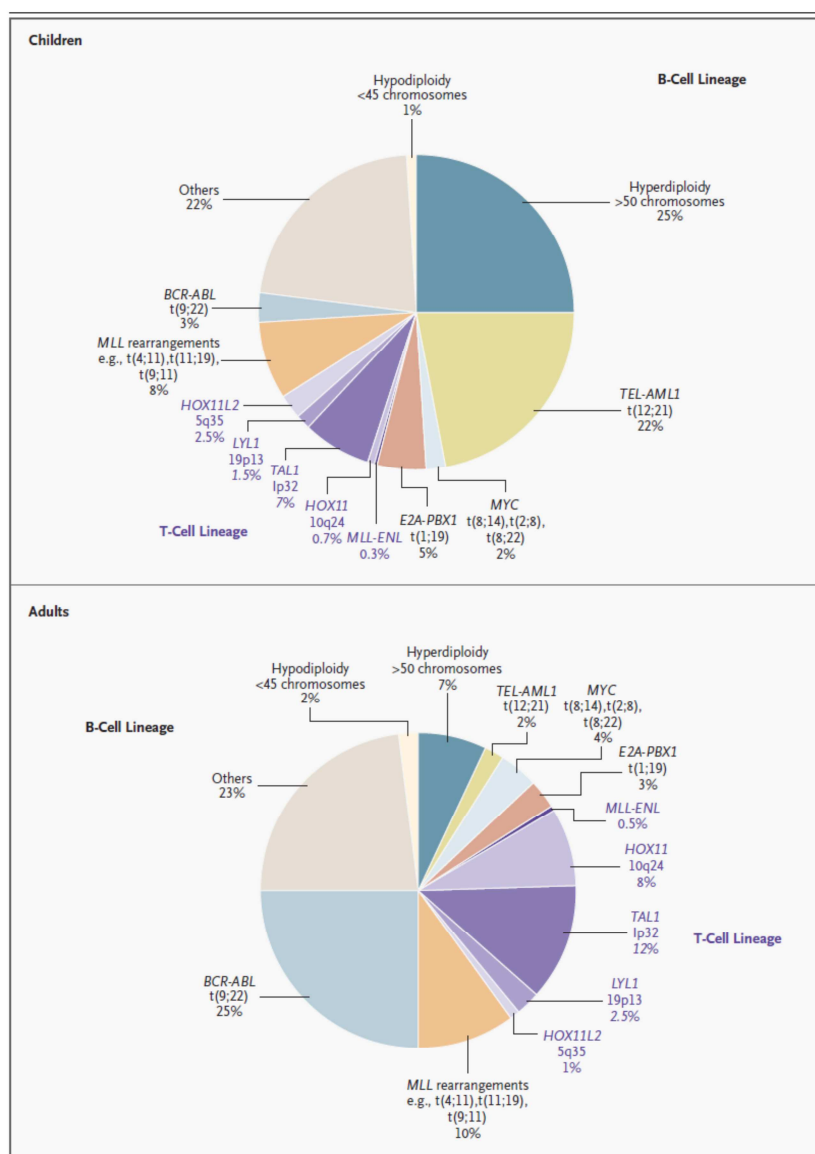


Figure 1. Sous-types cytogénétiques et moléculaires des LAL et leurs fréquences respectives dans les LAL de l'enfant (A) et de l'adulte (B). Figure publiée dans (Pui et al. 2004).

LAL avec Hyperdiploïdie

Un caryotype hyperdiploïde est généralement défini par la présence de plus de 50-67 chromosomes. Il est plus fréquemment observé chez les enfants (25% des cas) que chez les adultes (7% des cas). Ce sous-ensemble est associé à un pronostic particulièrement favorable avec des taux de survie sans événement et globaux à 5 ans de 84% à 90% et de 93% à 95%, respectivement (Moorman et al. 2010b; Schultz et al. 2007). Ce facteur de bon pronostic a été utilisé de façon routinière pour stratifier les patients en différents groupes de traitement. Cependant, le mécanisme de la transformation leucémique et la meilleure chimiosensibilité des LAL hyperdiploïde est inconnu (Figure 2).

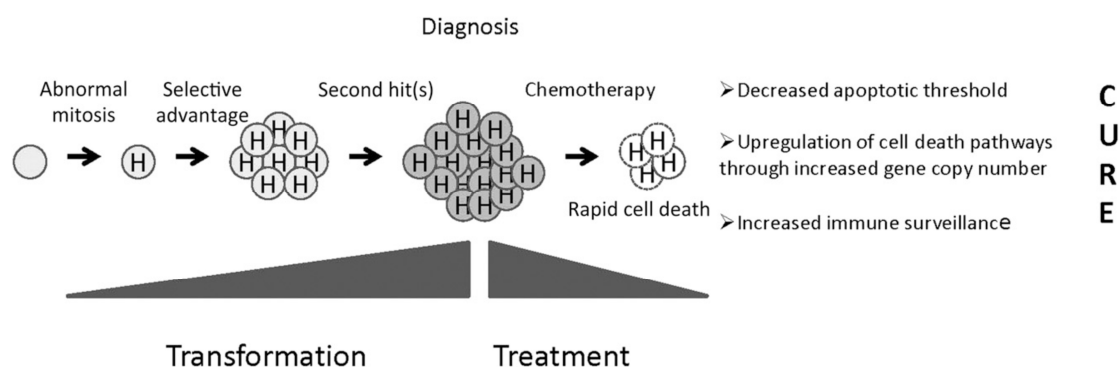


Figure 2. Un précurseur des cellules B est soumis à une mitose anormale ce qui entraîne une hyperdiploïdie. Un avantage sélectif est conféré, résultant en un clone pré-leucémique, puis une seconde anomalie (« second « hit(s) ») aboutit à un phénotype complètement malin. Les cellules hyperdiploïdes présentent une sensibilité inhabituelle à la chimiothérapie mais les mécanismes sont encore inconnus (Carroll 2013).

LAL avec t(1;19) / E2A- PBX1

Une translocation t(1;19) / E2A- PBX1 survient chez 5% des enfants atteints de LAL, ce sous-type moléculaire étant associée aux LAL « pré-B » (Pui et al. 2004).

Dans la translocation t(1;19), le domaine de transactivation N-terminal de E2A sur le chromosome 19 est fusionné à l'homéodomaine (domaine de liaison à l'ADN) en position C-terminale du gène PBX1 sur le chromosome 1. Cette translocation forme un gène de fusion qui code pour un facteur de transcription chimérique, E2A-PBX1 (Figure 3). La protéine chimérique influence l'autorenouvellement, la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et de leurs progéniteurs engagés, en perturbant les profils d'expression des gènes qui sont normalement régulés par les complexes HOX-PBX1 (Aspland et al. 2001).

Lorsqu'elles étaient traitées selon le schéma traditionnel basé sur des anti-métabolites, les LAL-B de l'enfant avec t(1;19) / E2A- PBX1 étaient autrefois considérées comme de mauvais pronostic, mais la chimiothérapie intensifiée en a amélioré le pronostic, et le taux de survie sans rechute à 5 ans est actuellement autour de 90% (Pui et al. 2004).

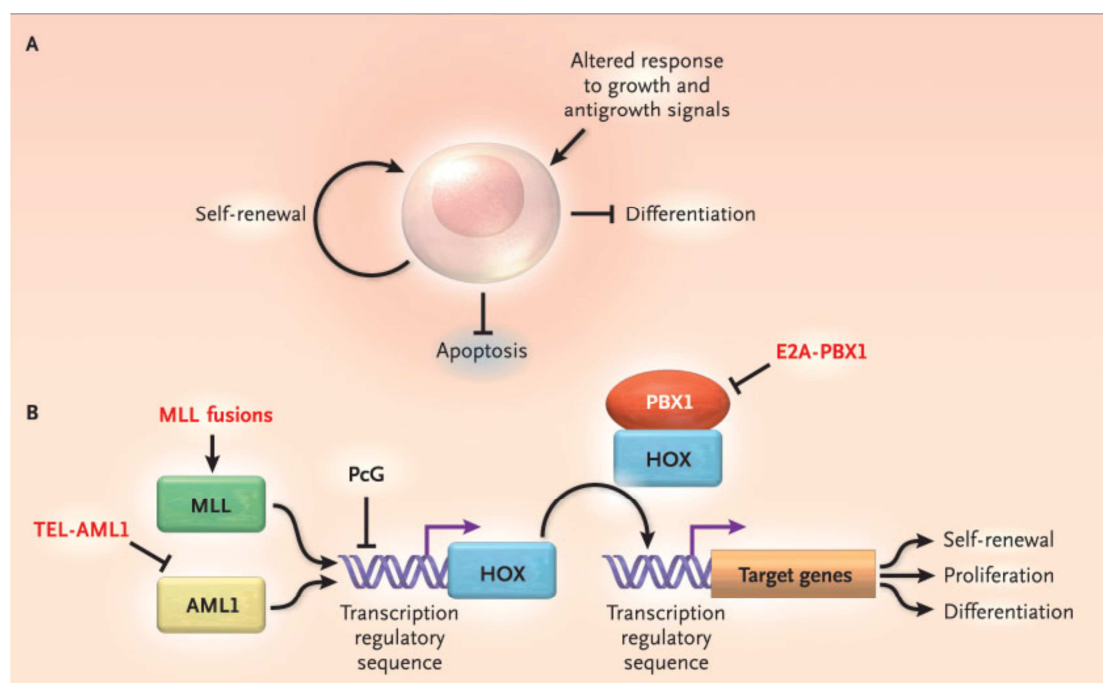


Figure 3. Transformation des cellules hématopoïétiques dans la pathogénèse des LAL(Pui et al. 2004).

LAL avec t (12;21) / TEL- AML1

La translocation t(12;21)/gène de fusion TEL- AML1 est un autre facteur de bon pronostic dans les LAL. Cette forme est plus fréquente chez les enfants (22 % des cas) que chez les adultes (2%). Le mécanisme de répression de la transcription par TEL- AML1 est détaillé dans la Figure 4 (Pui et al. 2004). La structure de la protéine AML1 normale est montrée dans le panneau A : elle comprend son domaine central « runt homology domain » (RHD), un domaine d'activation transcriptionnelle (TA), et les acides aminés C-terminaux VWRPY (code unique d'acide aminés). AML1 se lie aux séquences régulatrices de la transcription de base sous la forme d'un hétérodimère avec CBFb, et ensemble, ils recrutent des protéines à activité histone acétyltransférase (HAT). La HAT ouvre la structure de la chromatine ce qui favorise l'activation de la transcription (flèche violette). Le panneau B montre la structure de la protéine de fusion TEL-AML1, dans laquelle le domaine N-terminal hélice-boucle-hélice (HLH) de TEL est fusionné à la protéine AML1 presque complète. TEL- AML1 se fixe à la séquence régulatrice de base et forme un hétérodimère avec CBFb, mais elle recrute un complexe corépresseur de la transcription qui comprend des protéines ayant une activité d'histone déacétylase (HDACs), induisant la fermeture de la chromatine et la répression de la transcription. Ces changements dans la cascade de la transcription normalement médiée par AML1 modifient à la fois la capacité d'autorenouvellement et la capacité de différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Downing 2003; Speck and Gilliland 2002). Les inhibiteurs de HDAC peuvent inverser la répression transcriptionnelle : ils ont montré une activité dans des études précliniques et sont maintenant utilisés dans les essais cliniques.

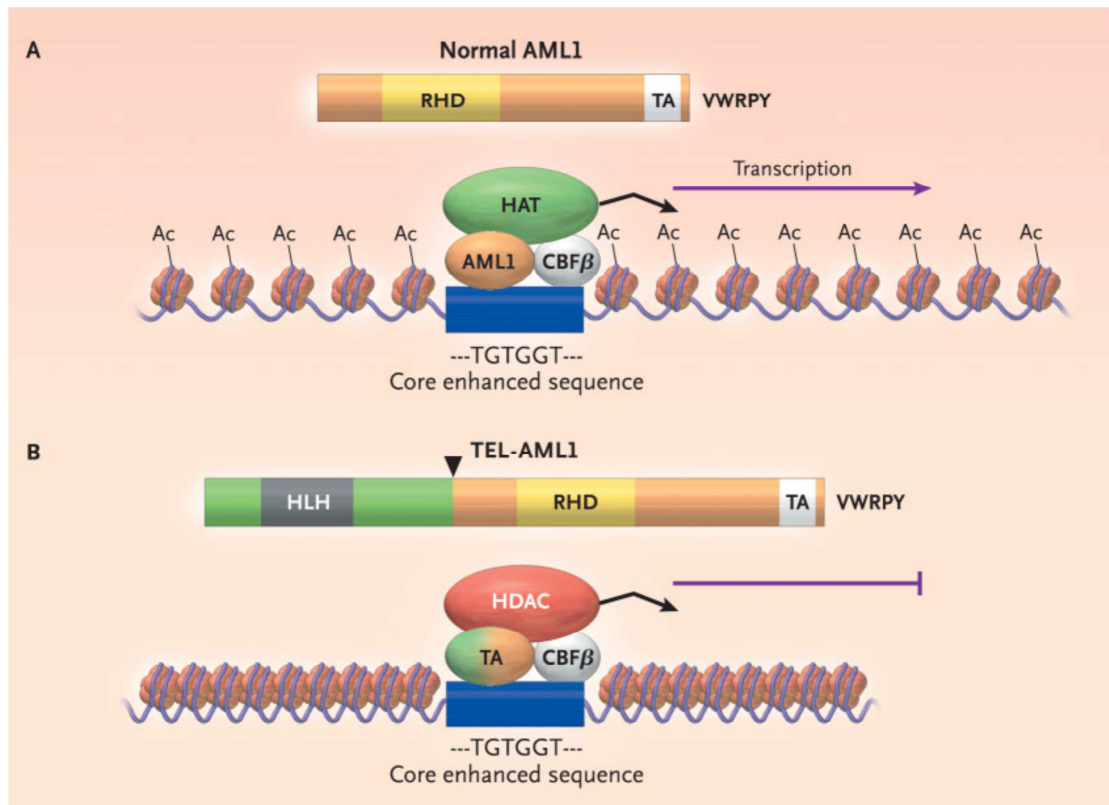


Figure 4. Mécanisme de répression de la transcription par la protéine de fusion TEL-AML1 (Pui et al. 2004).

LAL avec t(9;22)/BCR-ABL

Les LAL avec BCR-ABL sont associées à un mauvais pronostic. C'est le sous-type le plus commun chez les adultes (25%). Le gène de fusion BCR-ABL est oncogénique, il est situé sur le chromosome 22 dérivé le plus court. La fusion est créée par translocation réciproque du gène BCR (« Breakpoint Cluster Region ») du chromosome 22 (région q11) et du gène ABL (Abelson) du chromosome 9 (région q34) (Kurzrock et al. 2003) (figure 5). Le proto-oncogène ABL code pour une tyrosine kinase spécifique, dont l'activité est strictement régulée. En revanche, la protéine de fusion BCR-ABL, produite par le chromosome Philadelphie (Ph), est une kinase constitutive qui modifie les voies de signalisation qui contrôlent la prolifération, la survie et l'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques. Cette tyrosine kinase est présente dans pratiquement tous les cas de leucémie myéloïde

chronique (LMC) à un moment donné au cours de la maladie, et dans 20% des cas de LAL. Les LAL BCR- ABL positives ont un pronostic sombre avec la chimiothérapie conventionnelle. Chez les adultes, le taux de rémission complète (RC) est similaire à celui des LAL sans la t (9; 22), mais le taux de rechute est significativement plus élevé et à long terme la survie sans leucémie est extrêmement rare (Westbrook et al. 1992). La transplantation de moelle osseuse (BMT) allogénique en première rémission est un traitement efficace chez ces patients (Copelan and McGuire 1995). Le développement d'inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) (Exemples: Imatinib, dasatinib ou ponatinib...) a permis d'améliorer la gestion des LAL avec fusion BCR- ABL. Depuis plus de 10 ans, l'identification des LAL avec t (9;22) / BCR- ABL est une indication d'un traitement ciblé par TKI qui inhibe la protéine de fusion BCR-ABL. La combinaison de TKI avec la corticothérapie et/ou la chimiothérapie a augmenté le taux de rémission complète des patients qui peuvent ainsi bénéficier d'une greffe allogénique ultérieurement (Druker et al. 2001).

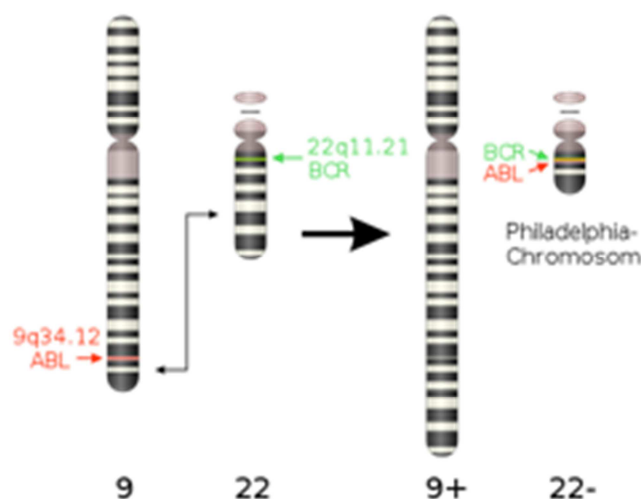


Figure5.Chromosome Philadelphia ; de wikipedia :
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4d/Philadelphia_Chromosom.svg

LAL Pro-B avec t (v; 11q23) / réarrangement MLL

La protéine « Mixed Lineage Leukemia » (MLL), aussi appelé HRX ou ALL-1, est une protéine nucléaire qui maintient l'expression de certains membres de la famille HOX (figure 3B). Les translocations leucémiques associant MLL ont des protéines chimères constituées de la partie N -terminale de MLL en 11q23 fusionnée à la portion C -terminale d'une grande variété de gènes partenaires, comme par exemple t(4 ;11), t (11;19), t(9;11) dans les LAL-B (Ernst et al. 2002). Les réarrangements réciproques du gène MLL, les plus fréquents dans les LAL chez le nourrisson ALL (plus de 80%) et dans les LAM (Leucémies Aigues Myéloblastiques) secondaires à un traitement par les inhibiteurs de la topoisomérase II, sont associées à un mauvais pronostic. Les protéines de fusion MLL sont capables d'accroître leur activité transcriptionnelle. Cette altération perturbe le schéma normal d'expression des gènes Hox, provoquant un changement dans l'autorenouvellement et la croissance des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs. Des études dans des modèles de souris suggèrent que l'expression d'une protéine de fusion MLL est nécessaire mais pas suffisante pour la leucémogénèse (Ayton and Cleary 2001).

LAL-B mature avec t (8;14) / MYC-IGH

La translocation t(8;14) / MYC-IGH, se produisant chez 2% des enfants et 4% des adultes atteints de LAL, est une aberration cytogénétique très caractéristique mais pas spécifique des lymphomes/leucémies de type Burkitt (Shiramizu et al. 1991). Le lymphome de Burkitt est une tumeur des cellules B avec un temps de doublement extrêmement court qui est souvent présente dans des sites extra-nodaux ou sous la forme d'une LAL. La plupart des cas ont une translocation du gène c-myc (région 8q24) avec le locus IGH (14q32), ou, moins fréquemment, avec les loci des chaînes légères lambda (22q11) ou

kappa (2p1), activant ainsi l'oncogène MYC juxtaposé, ce qui aboutit à la dérégulation et la surexpression du facteur de transcription MYC (Levens 2008). MYC est un proto-oncogène qui régule la progression du cycle cellulaire, la croissance, la différenciation, l'apoptose, la survie et la biosynthèse. Les réarrangements impliquant MYC aboutissent à la lymphomagenèse / leucémogénèse souvent via la surexpression de MYC (Gostissa et al. 2009). Les lymphomes/leucémies de type Burkitt sont souvent associés au virus d'Epstein -Barr (EBV) : dans environ 95 % des cas en Afrique centrale, de 40 à 50 % des cas chez les personnes infectées par le VIH et de 10 à 20% dans les cas sporadiques on trouve des informations virales et il y a l'expression d'au moins un antigène viral (EBNA1). Cependant, le rôle de l'EBV dans la pathogénèse des lymphomes/leucémies de type Burkitt est restée largement inconnu (Bornkamm 2009).

Les LAL de cellules B matures avec t (8; 14) / MYC- IGH sont très agressives, mais potentiellement curables en raison de leur grande chimiosensibilité. Le pronostic était médiocre avec tous les schémas de chimiothérapie classiques, mais s'est amélioré avec des protocoles de chimiothérapie à hautes doses, qui ont considérablement amélioré les résultats avec des taux de guérison avoisinant 80-90% (Soussain et al. 1995). Les lymphomes/leucémies de type Burkitt étant CD 20 positive, récemment, des anticorps monoclonaux anti-CD20 (rituximab) ont été appliqués comme agent thérapeutique supplémentaire en association au protocole Hyper-CVAD. L'ajout du rituximab à la chimiothérapie peut améliorer les résultats, en particulier chez les patients âgés(Thomas et al. 2006).

LAL-T

Les LAL-T représentent environ 15% des LAL de l'enfance et 25 % des cas de LAL chez les adultes. Elles sont plus fréquentes chez les adolescents que chez les enfants plus jeunes. Elles se présentent généralement avec une

hyperleucocytose et une grande masse médiastinale. Chez les enfants, le pronostic des LAL-T est généralement moins favorable que celui des LAL-B, quel que soit le taux de leucocytes au diagnostic (Smith et al. 1996), car le risque d'échec d'induction ou de rechute précoce est plus élevé dans ce groupe de patients (Goldberg et al. 2003). Chez l'adulte, une hyperleucocytose au diagnostic ($\geq 100 \times 10^9/L$) est considérée comme facteur de mauvais pronostic (Rowe et al. 2005). Cependant, le pronostic des LAL-T chez les adultes peut-être meilleur que celui des LAL-B, du fait de la faible incidence des anomalies cytogénétiques défavorables. Les lymphoblastes de LAL-T, habituellement positifs pour la désoxynucléotidyltransférase terminale (TdT), sont généralement associés à la présence du CD3 cytoplasmique (blasets de la lignée T) ou de CD3 de surface (lymphocytes T matures), et expriment le plus souvent le CD7 de surface et le CD3 cytoplasmique (cCD3) mais pas les autres marqueurs des cellules T comme CD3, CD4 ou CD8 de surface (Borowitz and Chan 2008; Jabbour et al. 2005).

Un caryotype anormal est détecté dans 50-70% des cas de LAL-T, les translocations les plus communes impliquent les différents loci TCR, et les gènes codant pour les facteurs de transcription HOX11 (TLX1) (10q24) survenant chez 7% des enfants et 30% des adultes ayant une LAL, et HOX11L2 (TLX3) (5q35), survenant chez 20% des enfants et 10-15% des adultes ayant des LAL-T (Graux et al. 2006). Le groupe HOX11+ est de relativement bon pronostic. Dans environ 50% des cas, des mutations activatrices impliquent le gène de NOTCH1, qui code pour un récepteur transmembranaire qui régule le développement des cellules T normales (Weng et al. 2004). NOTCH1 est nécessaire pour l'engagement des cellules progéniteurs pluripotentes dans la différenciation en cellules T et l'assemblage des complexes de récepteurs cellulaires pré-T dans les thymocytes immatures. Une augmentation de la signalisation NOTCH1 est un puissant inducteur de LAL-T chez la souris (Weng et al. 2003). Une mutation NOTCH1 est associée à

une survie plus courte chez les adultes mais pas chez les enfants atteints de LAL-T (Zhu et al. 2006).

Traitements des LAL

La LAL est une maladie hétérogène qui nécessite un traitement adapté en fonction du phénotype, du génotype et du risque. Le traitement des LAL repose sur le même principe. Les schémas thérapeutiques les plus couramment utilisés chez les patients atteints de LAL sont des variantes de protocole de polychimiothérapie: par exemple, le protocole BFM/COG pour les enfants (Moricke et al. 2008); le schéma thérapeutique CALGB (Larson et al. 1995) et le protocole hyper-CVAD (Kantarjian et al. 2004) chez les patients adultes.

En général, le traitement des LAL peut être divisé en 3 phases principales: induction, consolidation (ou intensification) et entretien. La LAL avec cellules B Matures (de type Burkitt, avec t(8;14)/MYC-IGH) est le seul sous-type qui est traité par chimiothérapie intensive à court terme (Lee et al. 2001; Patte et al. 2001).

La thérapie ciblée vers le système nerveux central (SNC), en prévention des rechutes dues à des cellules de leucémie « séquestrés », doit commencer au début de l'évolution clinique. Un immunophénotype de cellules T, un nombre important de cellules leucémiques (surtout si hyperleucocytose $\geq 100 \times 10^9/L$), et la présence de cellules leucémiques dans le liquide céphalo-rachidien au moment du diagnostic sont les facteurs de risque accru de rechute dans le SNC (Pui et al. 2009).

Enfin les thérapies ciblées et les thérapies cellulaires contribuent à l'amélioration des résultats thérapeutiques pour certains sous-types de LAL (par exemple, TKI pour les LAL avec chromosome Philadelphie, Rituximab pour les LAL avec CD20 positif, transplantation allogénique pour les patients atteints de formes de LAL à très haut risque ou avec une maladie résiduelle

positive après le traitement initial d'induction.

Traitement d'induction

Le but de la thérapie d'induction est d'éradiquer plus de 99 pour cent de la charge initiale de cellules leucémiques et de restaurer une hématopoïèse normale. Les traitements d'induction sont généralement basés sur une combinaison de Vincristine, anthracyclines (par exemple daunorubicine, doxorubicine), et corticostéroïdes (par exemple, prednisone, dexaméthasone) avec ou sans L-asparaginase et/ou cyclophosphamide (Bassan and Hoelzer 2011; Jabbour et al. 2005). Les schémas BFM/ COG sont principalement basés sur un traitement d'induction associant 4 médicaments qui en combinaison, vincristine, anthracycline, corticostéroïde et L-asparaginase (Moricke et al. 2008; Seibel et al. 2008). Les schémas CALGB sont généralement basés sur un protocole associant 5 drogues, ajoutant le cyclophosphamide à la combinaison des 4 médicaments ci-dessus (Larson et al. 1995). Le schéma hyper- CVAD peut être considéré comme un protocole thérapeutique moins complexe par rapport aux schémas CALGB, et comprend 8 cycles de traitement alternant entre le schéma "A" (cyclophosphamide hyperfractionné, vincristine, doxorubicine et dexaméthasone) et le schéma "B" (méthotrexate à haute dose et cytarabine) (Kantarjian et al. 2004; Kantarjian et al. 2000).

Traitement de consolidation (ou intensification)

Lorsque l'hématopoïèse normale est restaurée, les patients en rémission deviennent candidats à un traitement de consolidation. Le traitement d'induction en phase « post-rémission » peut également être décrit comme thérapie d'intensification. L'objectif de la consolidation est d'éliminer les cellules leucémiques potentielles qui restent après le traitement d'induction, comprenant en outre l'éradication de la maladie résiduelle éventuelle (Pui et al. 2008). La combinaison de médicaments et la durée de la thérapie pour les

traitements de consolidation varient largement entre les études et les populations de patients, mais peut comprendre des combinaisons de médicaments similaires à celles utilisées lors de la phase d'induction. Le méthotrexate à haute dose, la cytarabine, mercaptopurine et L- asparaginase sont souvent utilisés dans le traitement de consolidation / intensification (Bassan and Hoelzer 2011; Faderl et al. 2010; Seibel et al. 2008; Stock et al. 2008).

L'accumulation des métabolites actifs du méthotrexate - méthotrexate polyglutamates (MTXPG1-7) - dans les cellules leucémiques est associée à une activité anti-leucémique. L'accumulation est faible dans les LAL avec cellules T, les LAL-B avec TEL-AML1 ou E2A-PBX1, mais importante dans les LAL-B avec hyperdiploïdie, en particulier les LAL avec un gain de chromosomes 18 ou 10 (French et al. 2009; Rots et al. 1999; Whitehead et al. 1992). De très fortes doses de méthotrexate (par exemple, 1-8g/m²) semblent améliorer les résultats chez les patients atteints de LAL avec cellules T (Pui et al. 2001; Schrappe et al. 2000) et les LAL-B avec TEL- AML1 ou fusion E2A-PBX1. Ce résultat est cohérent avec le fait que dans le cas de ces types de LAL il y a une accumulation inférieure de MTXPG que dans les LAL qui ont d'autres anomalies génétiques (Kager et al. 2005), suggérant que les patients de ces trois sous-groupes peuvent bénéficier de doses élevées de méthotrexate.

Traitement d'entretien

Le but du traitement d'entretien prolongé est de prévenir la rechute de la maladie après induction d'une rémission et traitement de consolidation. La plupart des traitements d'entretien sont basés sur un schéma de mercaptopurine en administration quotidienne et méthotrexate en administration hebdomadaire avec ou sans cures mensuelles de vincristine et de corticoïdes pendant une durée de 2 ans chez l'adulte et de 2 à 3 ans chez l'enfant (Bassan and Hoelzer 2011; Stock 2010). Une augmentation des

concentrations intracellulaires de métabolites actifs du méthotrexate et de mercaptopurine pendant le traitement d'entretien, ont été associés à une amélioration des résultats cliniques (van der Werff Ten Bosch et al. 2005). La mercaptopurine est un analogue structural de l'hypoxanthine, et inhibe la synthèse de novo des purines. L'administration de doses de mercaptopurine de moins de 95% de la dose prévue est associée à une rechute (Bhatia et al. 2012). Par conséquent, l'utilisation sans interruption de la posologie de mercaptopurine définie par la pharmacogénétique est importante (Pui et al. 2008).

Agents ciblés

Au cours de la dernière décennie, l'avènement de nouveaux agents permettant de cibler des anomalies génétiques spécifiques, tels que ceux associés aux LAL Ph-positive, ou à des antigènes de surface de cellules spécifiques, a contribué à l'amélioration des résultats dans certains sous-types de LAL. Ces agents comprennent des inhibiteurs sélectifs de la tyrosine kinase BCR-ABL (TKI) pour les LAL avec chromosome Philadelphie (Schultz et al. 2009; Wassmann et al. 2006; Yanada et al. 2006) et l'anticorps monoclonal anti- CD20 (par exemple, le Rituximab) pour les LAL-B exprimant le CD20 (surtout pour les LAL-B de l'adulte) (Thomas et al. 2006; Thomas et al. 2010). Le mésylate d'imatinib est le premier inhibiteur de la tyrosine kinase BCR-ABL et il est approuvé par la FDA pour le traitement des LAL a chromosome Philadelphie. Le dasatinib est un TKI de deuxième génération qui inhibe à la fois la kinase BCR-ABL et la kinase de la famille SRC, cette dernière étant impliquée dans une voie de signalisation alternative dans les LAL résistantes à l'imatinib (Ottmann et al. 2007). De plus, le dasatinib est 325 fois plus efficace que l'imatinib pour inhiber la croissance in vitro de cellules BCR-ABL de type sauvage (O'Hare et al. 2005) et maintien une activité contre des cellules résistantes à l'imatinib ayant des mutations du domaine kinase de ABL, à l'exception des mutations T315I, V299L et F317L. Les patients présentant une

mutation T315I doivent recevoir un traitement de seconde ligne utilisant le ponatinib, ou une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques ou être candidat pour participer à un essai clinique (Cortes et al. 2012).

La thérapie cellulaire

Transplantation de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) allogénique est une option pour les enfants atteints d'une forme à très haut risque ou persistante de la maladie (Balduzzi et al. 2005). La survie sans leucémie n'est pas affectée par la source de cellules souches (donneur compatible avec ou sans lien familial, sang de cordon ou donneur haplo-identique) (Eapen et al. 2010; Eapen et al. 2007; Leung et al. 2011). Une maladie résiduelle (MRD) \geq 0,01% avant la transplantation est associée à un risque élevé de rechute, et de nouvelles stratégies sont nécessaires pour réduire le nombre de cellules leucémiques avant et après la procédure (Bader et al. 2009; Leung et al. 2012).

Dans les LAL avec Ph/BCR-ABL, pour des patients relativement jeunes (<65 ans) et sans facteur de comorbidité important, présentant une rémission complète après l'induction, un traitement de consolidation avec HSCT allogénique peut être envisagé si un donneur compatible est disponible. Après HSCT, un traitement d'entretien avec un TKI pendant 2-3 ans est recommandé (NCCN guidelines, ALL Version 2013: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/gl_steering_committee.asp).

Dans les LAL Ph/BCR-ABL négatives, pour les patients relativement en forme (âge < 65 ans et sans facteurs de comorbidité important) présentant une rémission complète après le traitement initial d'induction, une surveillance de la maladie résiduelle peut être envisagée. Chez ces patients, la poursuite du protocole de poly-chimiothérapie pour la consolidation et le maintien est à envisager, en particulier pour les patients avec rémission ayant une recherche de maladie résiduelle minimale négative après induction. Si un donneur

compatible est disponible, la consolidation avec une greffe allogénique peut être envisagée chez les patients avec maladie résiduelle positive. En outre, une greffe allogénique peut également être envisagée chez les patients présentant des caractéristiques cytogénétiques à haut risque (hypodiploïdie, caryotype complexe, ou réarrangements MLL...) (NCCN guidelines, ALL Version 2013).

Partie II : notions de bases sur la chromatine et les mécanismes épigénétiques impliqués dans la régulation des gènes

Chromatine – nucléosome - histones

Dans les années 1970, une digestion du noyau par des nucléases avait mis en évidence des fragments d'ADN d'environ 200 paires de bases (pb) (Williamson 1970). D'autres travaux ont par la suite montré que ces 200 pb sont protégées contre la digestion par un complexe de poids moléculaire de 200kD portant des protéines identifiées comme les histones.

Les histones quant à elles, ont été identifiées dès 1965. Elles sont : H2A, H2B, H3 et H4, ainsi qu'une cinquième histone, H1 (Phillips and Johns 1965). Il s'agit de petites protéines (100 à 130 acides aminés), très basiques et bien conservées au cours de l'évolution.

Kornberg et Chambon ont nommé ce complexe constitué des histones et de l'ADN génomique le « nucléosome », et ont proposé qu'il soit l'unité de base d'une structure nommée « chromatine ». Le nucléosome est formé de 147 paires de base d'ADN complexées avec 4 paires d'histones (Kornberg 1974; Oudet et al. 1975).

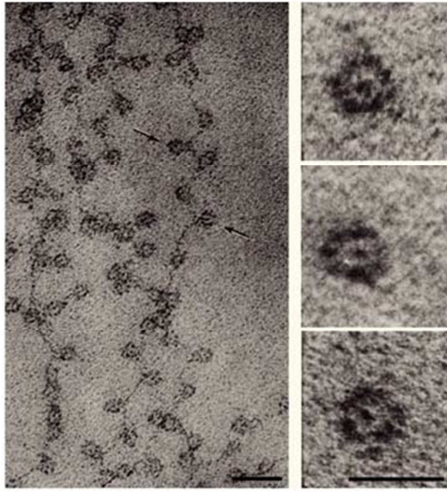
Une approche par la microscopie électronique a révélé l'enchaînement des nucléosomes en « collier de perles » (Figure 6A) et la nature de la chromatine comme succession de nucléosomes (Olins and Olins 1974; Oudet et al. 1975).

La biologie structurale a ensuite mis en évidence la nature exacte du nucléosome et l'agencement des histones. En 1984, Richmond publie la structure du nucléosome avec une résolution à 7 Å (Richmond et al. 1984).

Les histones partagent la même structure. Elles possèdent un domaine globulaire central interagissant avec d'autres histones : H2A avec H2B et H3 avec H4. Ces dimères d'histones s'associent entre eux pour former le nucléosome sous forme d'un octamère d'histones (Figures 6B et 7) (Luger et al. 1997).

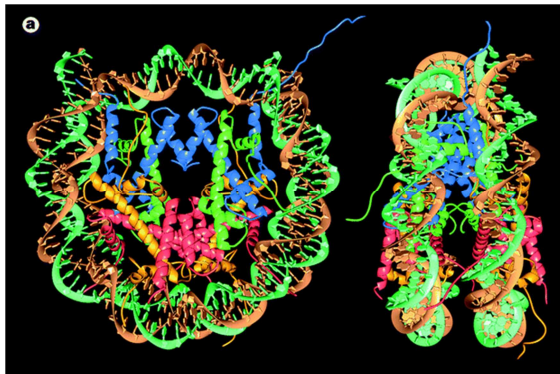
Figure 6. Trente années d'observation du nucléosome

(A) **Visualisation d'une fibre de chromatine** (Olins and Olins 1974). A gauche :



collier de perles typique observé à faible force ionique (barre d'échelle de 30 nm). A droite, nucléosome individuels obtenus après digestion à la nucléase micrococcale (barre d'échelle 10 nm).

(B) **Nucléosome cristallisé à 2,8 Å** (Luger et al. 1997) Les 4 paires d'histones sont situés au centre et entouré de 146 paires de base d'ADN. Le nucléosome est vu de face à gauche, de profil à droite.



Les histones portent également une partie non-structurée appelée queue N-terminale sortant du cylindre formé par les domaines globulaires. Ces queues N-terminales sont très accessibles et donc constituent le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles des histones comme l'acétylation, la méthylation, la

phosphorylation... et bien d'autres (Tan et al. 2011).

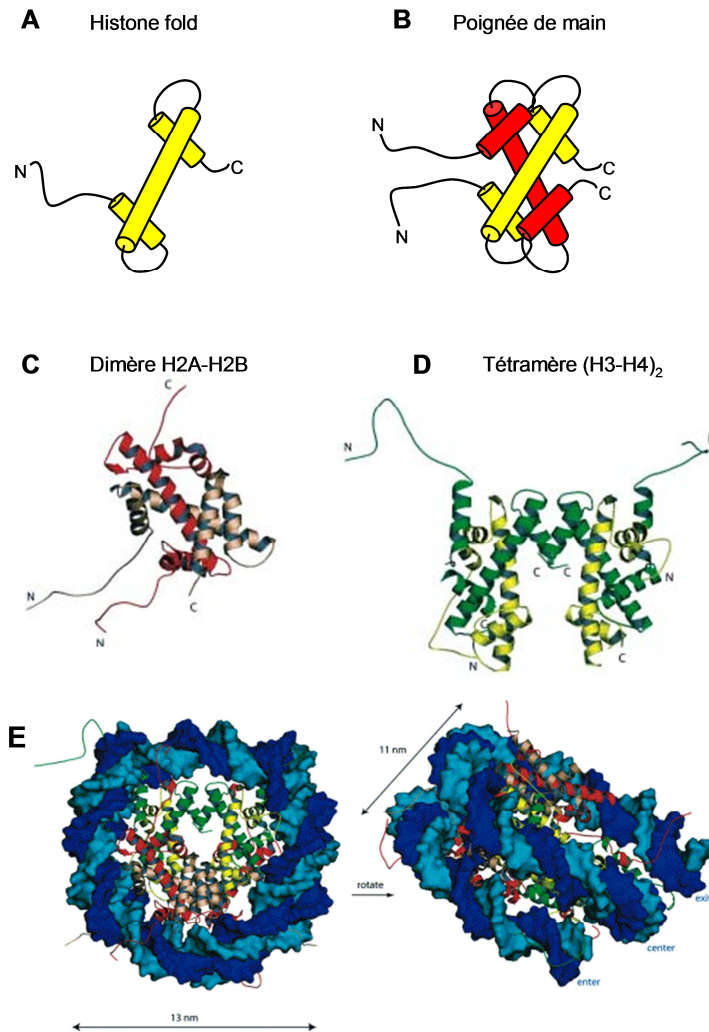


Figure 7. **Le nucléosome et ses constituants**

(A) **Repliement d'une histone de cœur en « histone fold ».** Les cylindres représentent des hélices α .

(B) **Schématisation d'une interaction dite en poignée de main entre deux « histones fold ».** Ce type d'interaction est impliqué dans la formation des dimères H2A-H2B et des interactions H3-H4.

(C) **Structure d'un dimère H2A-H2B,** respectivement en rouge et violet (Khorasanizadeh 2004). L'interaction en forme de poignée de main est nettement visible.

(D) **Structure d'un tétramère H3-H4,** respectivement en vert et jaune (Khorasanizadeh 2004).

(E) **Structure du nucléosome.** L'ADN s'enroule d'1,7 tours autour de la particule de cœur. Le nucléosome a une forme de cylindre trapu, de 13 nm de diamètre et de 11 nm d'épaisseur. Le nucléosome est présenté de face à gauche, et de côté à droite. Les couleurs des histones sont décrites en (C) et (D), et chaque brin d'ADN est dans une teinte de bleu différente. Adapté de (Khorasanizadeh 2004).

L'ADN reliant les nucléosomes est protégé par la cinquième histone appelée pour cette raison « histone de liaison » (H1). Les H1 sont impliquées dans la formation d'un ordre supérieur dans l'organisation de la chromatine mais la nature exacte de leur rôle est encore l'objet de débats (Khochbin 2001).

Des techniques modernes notamment celles utilisant le séquençage parallèle en masse ont récemment démontré l'existence de domaines génomiques distincts appelés domaines topologiques (Dixon et al. 2012). La nature exacte des éléments responsables de cette organisation de la chromatine et du génome reste encore inconnue.

Epigénétique - épigénome

Aristote (-384 -322) avait qualifié le processus de transformation d'un œuf en un organisme « épigénèse ». L'idée de l'épigénèse se posait dans le cadre global du problème du développement embryonnaire. L'épigénèse s'opposait à l'idée du développement d'un être miniature préformé. Ces débats étaient en réalité loin du sens moderne du terme « épigénétique » proposé au départ par le biologiste Conrad Hal Waddington (1905-1975). Waddington a proposé l'existence d'une interaction entre les gènes et leurs produits et l'impact de cette interaction dans le phénotype. Notamment il s'est intéressé à l'impact des paramètres physiques, chimiques et environnementaux comme la température et les drogues, sur le développement embryonnaire (Waddington 1952).

Aujourd'hui l'épigénétique se réfère à un ensemble d'informations hérissables qui impacte l'expression des gènes sans qu'elles soient directement codées par le génome.

Les mécanismes épigénétiques reposent largement sur les modifications chimiques des histones et de l'ADN. Ils peuvent également comprendre l'utilisation de variants non-canoniques des histones (variants d'histone, incorporés à la place des histones canoniques) et des ARN non-codants

capables de modifier l'expression des gènes de manière héritable.

L'établissement de l'épigénome repose donc sur des systèmes enzymatiques qui modifient les histones et l'ADN.

En ce qui concerne l'ADN, la modification la plus couramment étudiée est la méthylation (Figure 8). Cette modification chimique correspond à une méthylation de la cytosine en 5-méthylcytosine dans les séquences C-G de l'ADN génomique. Les enzymes capables d'assurer cette modification sont les DNA-méthyltransférases.

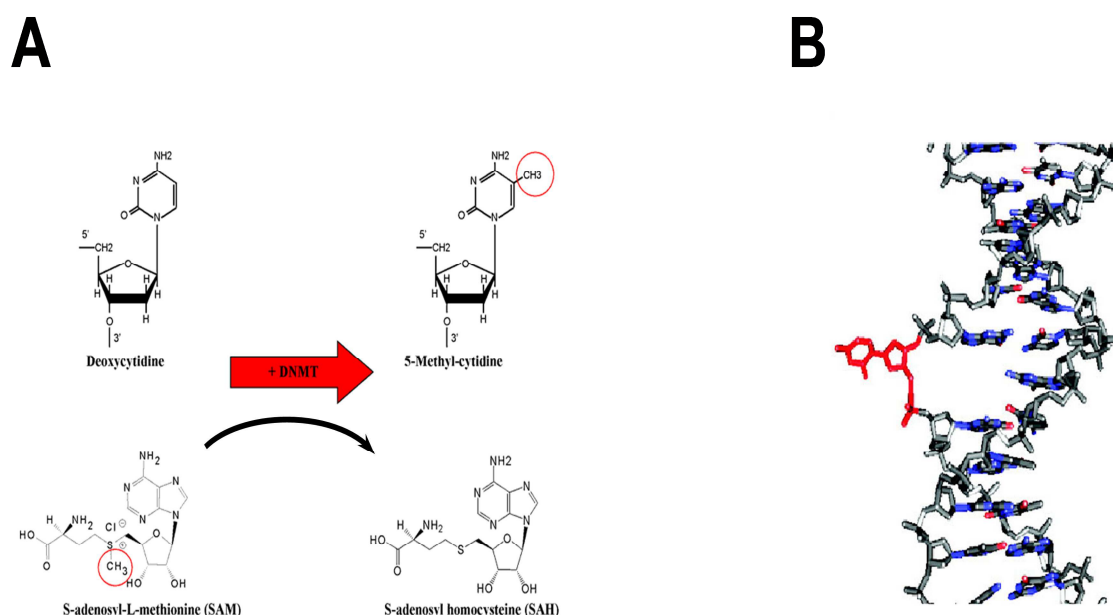


Figure 8. Méthylation de l'ADN

(A) **Mécanisme réactionnel.** Le carbone 5 d'une cytosine est méthylié à partir du substrat S-adénosyl-L-méthionine. Cette réaction est catalysée par les ADN méthyl transférase (DNMT).

(B) La cytosine est sortie de l'hélice par les DNMT, afin pouvoir méthyler son carbone 5. Tiré de (Goll and Bestor 2005).

Les histones sont également modifiées par des enzymes capables d'agir sur des acides aminés spécifiques. Récemment un grand nombre de modifications d'histones a été découvert (Tan et al. 2011). Nous ne connaissons pas encore toutes les enzymes impliquées dans la mise en place

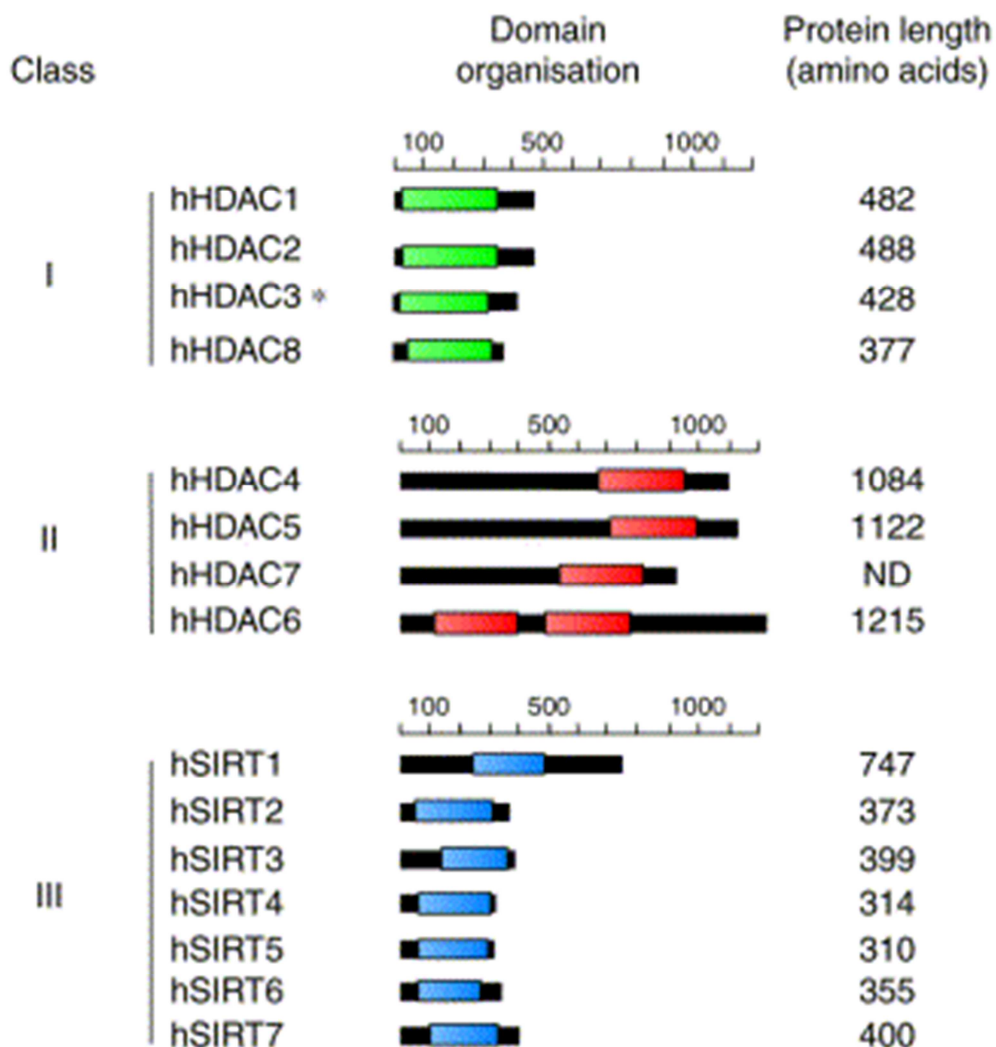
ou l'enlèvement de ces modifications. Néanmoins les familles des plus étudiées sont les histone acétyltransférases (HAT) (Figure 9) et les histone-déacétylases (HDAC) (Figure 10), les histones méthyltransferases (HMT) et les histone-déméthylases (HDM) (Allis et al. 2007).

Histone acétyltransférase	Substrat	Facteurs
Famille GNAT		
HAT1	H4	C-MYB
GCN5	H3, H4	
PCAF	H3, H4	HMG17, P53, MYOD, E2F, TFIIE, TFIIF
P300/CBP		
P300/CBP	H2A, H2B, H3, H4	HMG1, P53, c-MYB, NFκB, GATA1, EKLF, TFIIE, TFIIF, SP1, AML1
Famille MYST		
MOZ	H3	AML1
MORF	H2A, H3, H4	
TIP60	H2A, H3, H4	
Récepteurs nucléaires et co-Activateurs		
ACTR	H3, H4	
TFIIIC90	H3, H4	
TAFII250	H3, H4	TFIIE

Figure 9 Principales Histones Acétyltransferases (HAT) eucaryotes (D'après (Turner 2005))

Figure 10 **Les histones déacétylases (HDAC)**

Les HDAC sont réparties en trois classes, basées sur leur homologie avec un membre fondateur de levure. Les HDAC de classe I sont homologues à RPD3, celles de classe II à HDA1 et de classe III à SIR2. Les domaines colorés représentent le domaine déacétylase. La longueur de chaque protéine a été indiquée. D'après (Khochbin et al. 2001).



Partie III : Activation ectopique de gènes dans les cancers

Introduction générale ou préambule

Les cellules cancéreuses utilisent leur répertoire de gènes normaux pour l'acquisition de nouvelles propriétés et deviennent ainsi dépendantes de l'activation ectopique de ces gènes.

La transformation maligne des cellules est caractérisée par l'acquisition d'au moins huit nouvelles capacités biologiques (Hanahan and Weinberg 2011) (Figure 11). Les cellules cancéreuses doivent reprogrammer leur génome afin d'exprimer ces nouvelles propriétés biologiques ce qui leur permet d'atteindre leur état de malignité. Comment un programme d'expression génique cohérent, actif et opérationnel peut-il s'établir *de novo* ? La perte du contrôle de la stabilité génétique et les mutations et réarrangements génomiques mineurs et majeurs qui en résultent sont très souvent considérés comme des éléments essentiels dans l'apparition et la diversité des nouvelles fonctions responsables de la transformation cellulaire. De surcroît, on sait maintenant que des modifications profondes de l'épigénome des cellules cancéreuses accompagnent systématiquement la transformation oncogénique et contribuent à la création d'un profil d'expression génique nouveau indispensable à la cellule cancéreuse et à sa relative stabilité au fil du temps (Shen and Laird 2013). Des recherches récentes ont démontré que les cellules cancéreuses puisent également largement dans leur réservoir de gènes normalement silencieux pour assurer ces nouvelles fonctions biologiques en activant des programmes d'expression génique inattendus. Les gènes activés de manière ectopique au cours du processus de transformation maligne des cellules, du fait des bouleversements génétiques ou épigénétiques, permettent aux cellules cancéreuses d'utiliser de nouvelles voies de signalisation moléculaires nécessaires pour l'acquisition de nouvelles propriétés par ces

cellules (Wang et al. 2011).

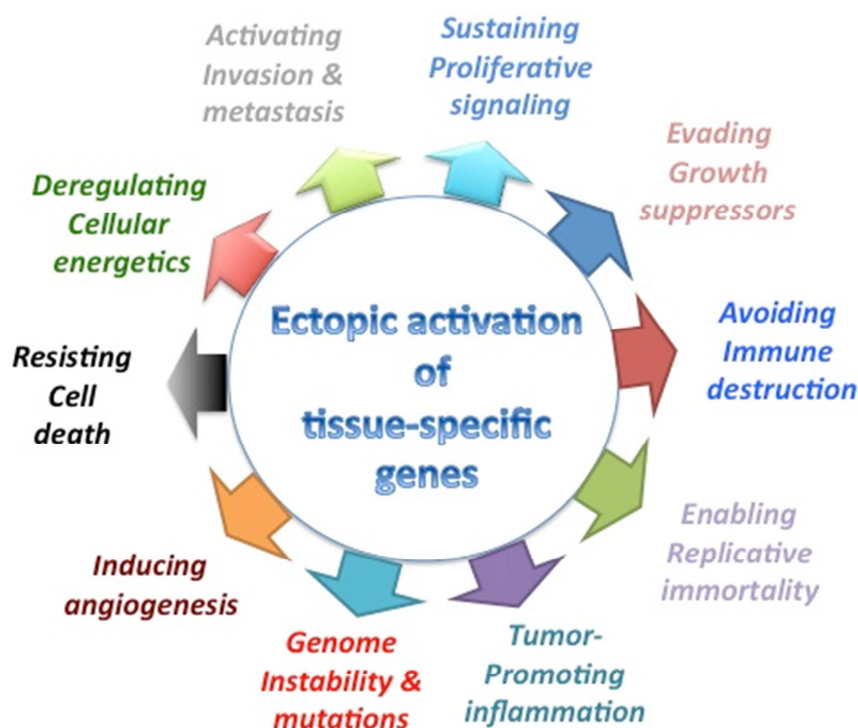


Figure 11. Nouvelles propriétés acquises par les cellules cancéreuses. Reproduit d'après (Hanahan and Weinberg 2011) et (Rousseaux et al. 2013b).

Une hypothèse plausible est que, parmi les nombreux gènes qui soutiennent les caractéristiques d'un cancer, la plupart seraient tout simplement des gènes normalement silencieux, présents dans le génome de toutes les cellules, mais dont l'expression est normalement limitée à un type cellulaire donné, ou à un stade de développement spécifique.

Le laboratoire d'accueil a démontré récemment que, parmi tous les types cellulaires, les cellules germinales mâles sont celles qui expriment le plus grand répertoire de gènes dont l'expression est spécifiquement restreinte à un seul tissu (dans ce cas, le tissu germinale), et que bon nombre d'entre eux sont réactivés de manière ectopique dans quasiment tous les cancers (Rousseaux et al. 2013a).

En conséquence, les cellules en cours de transformation maligne ont la

possibilité d'utiliser leur réservoir de gènes normalement spécifiques des cellules de la lignée germinale mâle pour y prendre les différents blocs de construction nécessaires à l'acquisition de nouvelles fonctions. Les questions fondamentales suivantes en découlent. Pourquoi les cellules germinales mâles utilisent-elles un si grand nombre de gènes spécifiques ? Pourquoi ces gènes sont-ils strictement « verrouillés » dans un état réprimé dans toutes les cellules somatiques ? Comment les fonctions « hors contexte » de ces gènes aident-elles à la transformation maligne ?

Les cellules germinales mâles sont uniques dans tout l'organisme non seulement parce qu'elles subissent une recombinaison méiotique des gènes et des chromosomes, mais aussi parce qu'elles activent un programme génétique hautement spécialisé conduisant à la genèse des seules cellules de l'organisme capables de quitter leur site de production et de « migrer » à travers l'environnement « hostile » d'un autre organisme (voir ci-dessous). L'acquisition de ces fonctions extraordinaires repose sur des gènes spécifiques, dont certains sont spécialisés pour agir sur le génome et en modifier profondément l'organisation. En particulier, après la méiose, des facteurs très spécifiques sont responsables de la réorganisation globale, à l'échelle du génome dans sa globalité, affectant le génome mâle. Il s'agit de l'hyperacétylation pangénomique des histones, suivie de leur enlèvement et de l'assemblage de nouvelles structures pour l'« emballage » et la compaction extrême de l'ADN dans le spermatozoïde (Gaucher et al. 2010). Bien qu'ils soient encore très méconnus, la plupart des facteurs responsables de ces événements, comme par exemple Brdt (Gaucher et al. 2012), ont une expression restreinte au testicule et les gènes correspondant sont silencieux dans les autres types cellulaires. Ils peuvent cependant être activés de manière aberrante dans les cancers (Rousseaux et al. 2013a). Il est de ce fait envisageable que, entre autres actions, l'activation ectopique de ces facteurs puisse à son tour altérer durablement le génome et l'épigénome, et ainsi contribuer à l'établissement et au maintien d'un état modifié de l'expression

génique. Des données issues de l'utilisation d'un modèle élégant de tumorigenèse inductible apporte une base expérimentale solide pour étayer cette hypothèse. En effet, dans un modèle de tumeur inductible du cerveau chez la drosophile, la transformation maligne est non seulement associée à l'activation ectopique d'une variété de gènes spécifiques de la lignée germinale, mais aussi en est très dépendante (voir plus bas) (Janic et al. 2011). Dans le cas des cancers du poumon humain, notre laboratoire a observé que, parmi plusieurs centaines de gènes spécifiques mâles et placentaires activés de manière ectopique, 26 sont étroitement associés aux tumeurs les plus agressives susceptibles de développer des métastases (Rousseaux et al. 2013a). On ne sait pas encore si l'activation de ces gènes « *per se* » est réellement nécessaire pour le développement de l'agressivité tumorale, mais elle a permis d'identifier les tumeurs présentant des caractéristiques communes frappantes, en dépit des différences de leurs origines histo-pathologiques. Ces tumeurs agressives sont associées à une très forte augmentation des niveaux d'expression des gènes codant pour des facteurs nucléaires alimentant la prolifération cellulaire, et à une diminution de l'expression des gènes codant pour des facteurs de membrane et de signalisation, dont un grand nombre sont impliqués dans la réponse immunitaire. Ce profil d'expression génique « agressif » peut expliquer au moins deux des propriétés acquises des cancers : éviter la destruction immunitaire de la tumeur et encourager la prolifération cellulaire. Il est probable que ces propriétés nouvellement acquises dépendent directement des gènes sous-jacents activés de manière ectopique. L'hypothèse que les cellules cancéreuses utilisent l'expression des gènes ectopiques pour établir de nouvelles fonctions, nous amène à suggérer que les cellules du cancer du poumon pourraient devenir « dépendantes » de ces facteurs. La situation serait en quelque sorte semblable à celles des tumeurs du cerveau chez la drosophile, où la prolifération cellulaire devient dépendante de l'activation ectopique de certains gènes de la lignée germinale (Janic et al. 2011).

L'extinction de ces activations géniques ectopiques, qui permettent très vraisemblablement à toutes les cellules cancéreuses d'acquérir et de conserver leur état de malignité, pourrait donc être une approche thérapeutique très prometteuse. Les travaux de recherche récents du laboratoire apportent une preuve de principe permettant d'étayer cette hypothèse dans le cas du lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL). En effet, ces travaux ont mis en évidence que la surexpression d'un gène spécifique, CYCLON, normalement exprimé principalement dans le testicule, est associée à une diminution de réponse à la chimiothérapie en association avec l'anticorps monoclonal Rituximab, le traitement standard actuel pour ce type de cancer. Fait encore plus intéressant, la régulation négative de CYCLON par des inhibiteurs pharmacologiques a permis de rétablir la sensibilité des cellules tumorales au Rituximab (voir plus bas) (Emadali et al. 2013).

Ainsi, un axe d'avenir est une recherche visant à la compréhension des mécanismes sous-jacents aux activations ectopiques de gènes dans le cancer et l'identification d'approches spécifiques permettant leur extinction.

Gènes spécifiques impliqués dans la programmation du génome male

Les cellules germinales males sont caractérisées par l'activation d'un programme d'expression génique hautement spécifique.

La spermatogénèse, le processus de différenciation des cellules germinales males, se déroule en plusieurs étapes (Figures 12 et 13). Au cours des phases pré-méiotiques les cellules germinales diploïdes, ou spermatogonies, se divisent par mitoses. Cette étape permet d'une part le renouvellement du tissu germinale, et d'autre part l'engagement d'une proportion définie de spermatogonies dans les étapes méiotiques. Au cours de la méiose, les spermatocytes subissent des réarrangements génomiques considérables du fait des recombinaisons génétiques entre chromosomes homologues, puis des

deux divisions nucléaires successives assurant le passage de l'état diploïde à un état haploïde. Les spermatides, cellules haploïdes issues de la méiose, subissent une maturation finale sans division, ou spermiogénèse, au cours de laquelle elles acquièrent les caractéristiques spécifiques du spermatozoïde : perte du cytoplasme, acquisition du flagelle, formation de l'acrosome, et réorganisation globale et compaction du génome male.

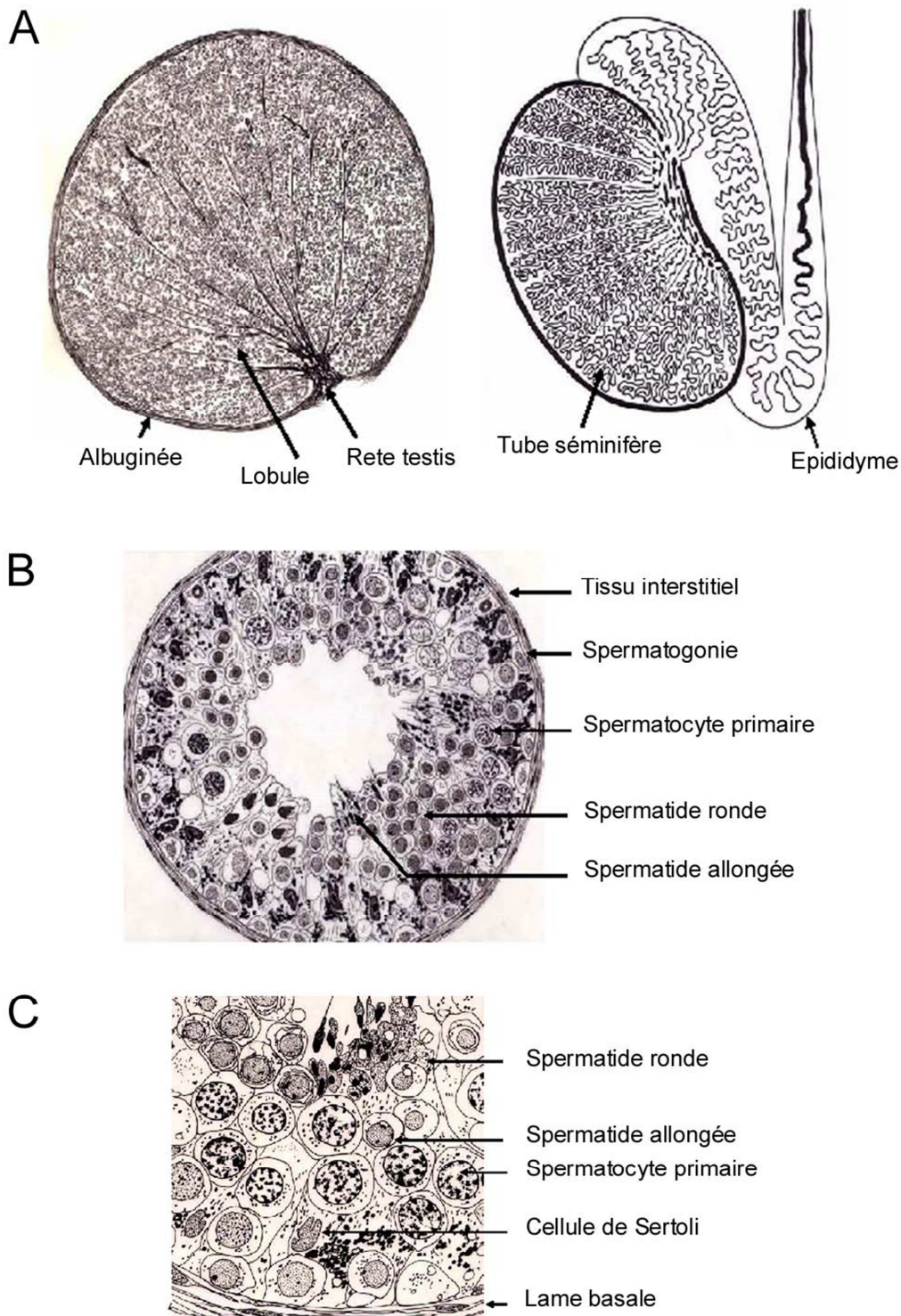


Figure 12. **Organisation du testicule adulte**

(A) Coupe transversale d'un testicule humain. Dessin d'une coupe en paraffine x2,5.

(B) Organisation des tubes séminifères dans le testicule humain. Dessin semi-schématique.

(C) Portion de l'épithélium séminifère dans un tube séminifère. Dessin sur la base d'une coupe semi-fine x900.

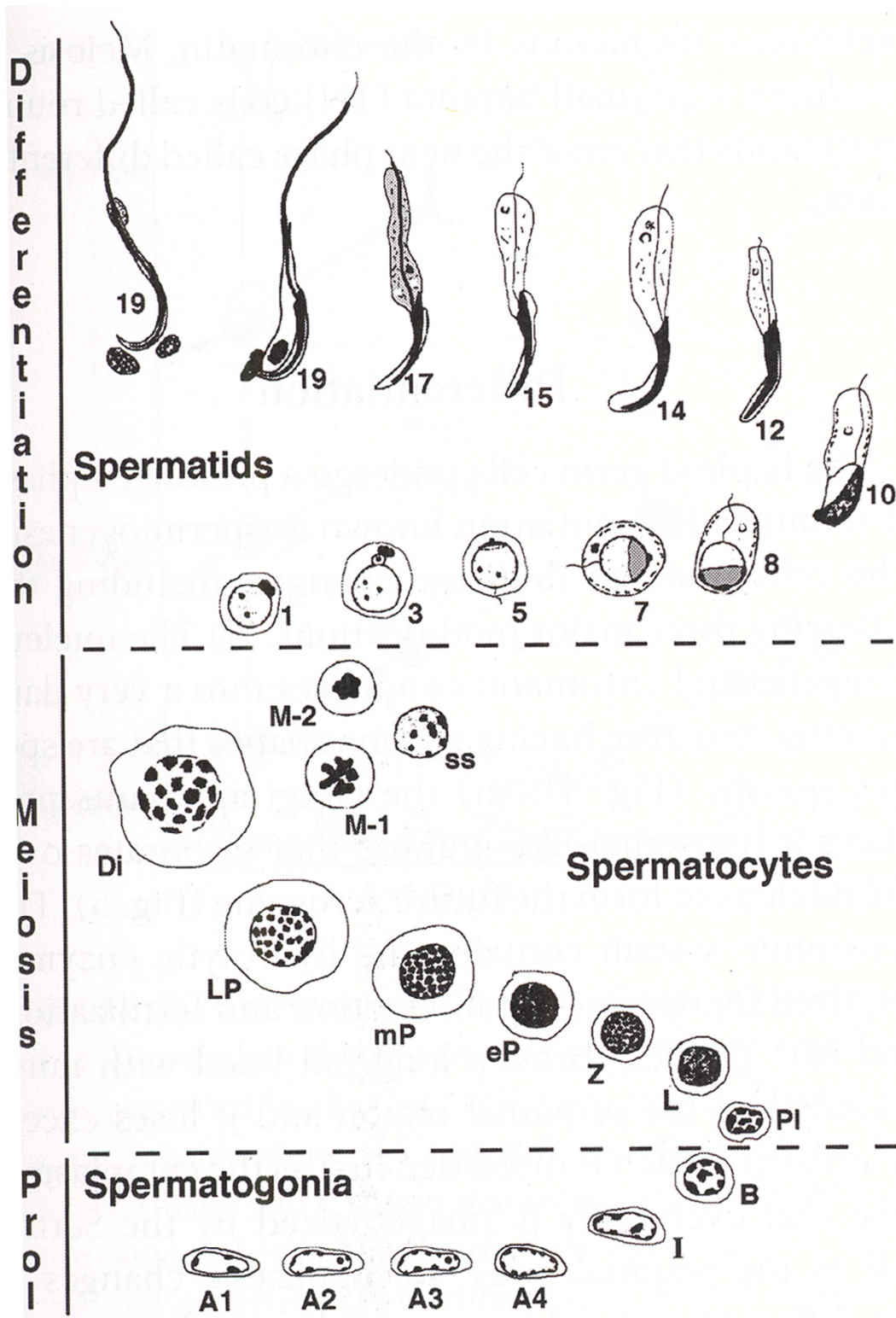


Figure 13. **Déroulement de la spermatogénèse**

La spermatogénèse se déroule de bas en haut. Les spermatogonies (A1 à A4, et B) se divisent par mitose lors de la phase de prolifération (Prol). La méiose est la période la plus longue et est composée des stades préleptotène (PI), leptotène (L), zygotène (Z), pachythène (eP, mP et LP). La première division méiotique (M1) a lieu au stade diplotène, et donne naissance aux spermatocytes secondaires. La deuxième division méiotique (M2) produit les spermatides haploïdes. La différenciation des spermatides ronds passe par 7 stades, avant de se différencier en spermatides allongées (stade 8), condensées, et finalement en spermatozoïdes.

La compaction post-méiotique du génome male est un processus hautement conservé, puisqu'il présente des similitudes avec la formation du pollen chez les plantes ou la sporulation chez les levures. Dans de nombreuses espèces, incluant les mammifères et l'homme, dans les phases post-méiotiques de la spermatogenèse, les histones, protéines associées de manière universelle à l'ADN pour former la chromatine nucléosomale (voir ci-dessus la partie « chromatine »), sont enlevées et remplacées par de petites protéines basiques spécifiques de la lignée germinale, les protéines de transition (TP), puis les protamines (Figure 14). Ces dernières s'associent et compactent l'ADN dans le spermatozoïde. Cet « emballage » spécifique de l'ADN male dans le spermatozoïde mature assure sa protection contre les dangers associés à sa migration hors de l'organisme male, à travers l'appareil génital femelle, et son long voyage jusqu'à l'ovocyte, auquel il doit apporter un génome haploïde paternel intègre.

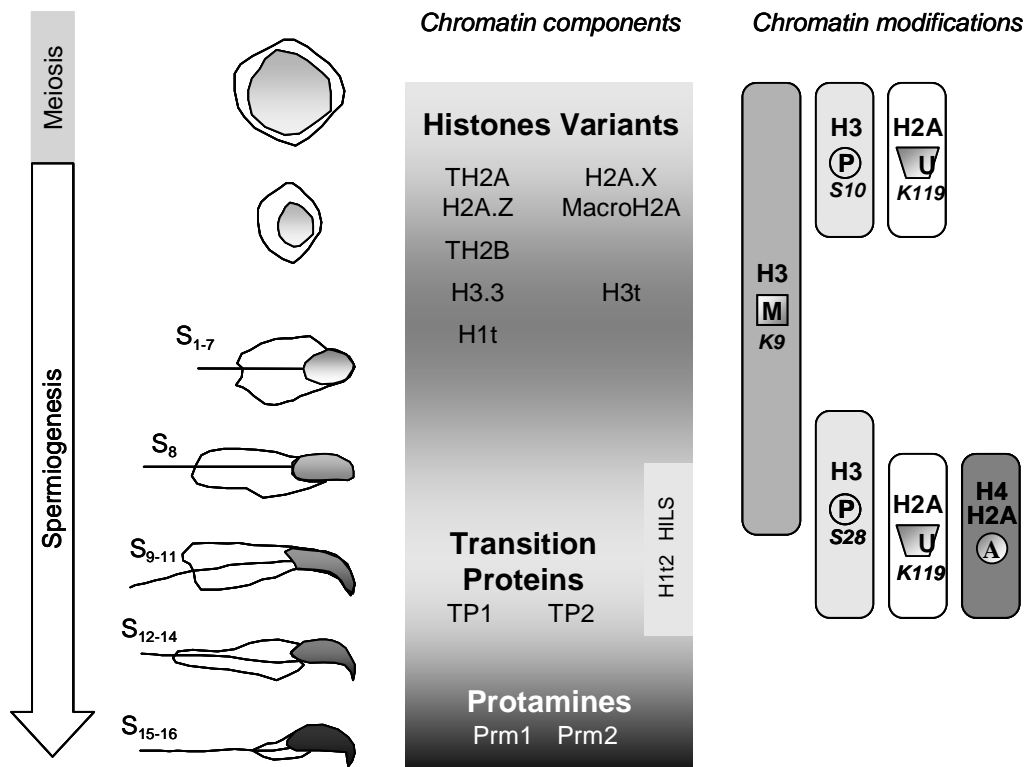


Figure 14. **Composants de la chromatine au cours de la spermatogénèse**

Les composants majeurs de la chromatine et leurs modifications post traductionnelles sont présentés. Les variants d'histone sont incorporés à la chromatine au cours de la méiose, à l'exception d'H1LS, H1t2 et H2A.L1/2. Les protéines de transition et les protamines remplacent les histones dans les stades finaux de différenciation. La distribution temporelle des modifications post traductionnelles majoritaires des histones est présentée (A, acétylation ; U, ubiquitination ; M, méthylation ; P, phosphorylation). From (Govin et al. 2004).

La maturation des cellules germinales mâles est associée à une reprogrammation globale du génome male, un processus unique se déroulant en plusieurs étapes (Boussouar et al. 2008; Govin et al. 2004; Rousseaux et al. 2005). Une déméthylation et reméthylation du génome entier caractérisent les premières étapes de la programmation du génome mâle, au cours desquelles les promoteurs de gènes spécifiques de la lignée male et leurs éléments régulateurs acquièrent leur profil spécifique de méthylation et de modifications de la chromatine (Rousseaux et al. 2005). C'est cependant après la méiose que le génome haploïde subit la reprogrammation la plus drastique,

caractérisée par un enlèvement de presque l'ensemble des histones suivi de l'assemblage successif des protéines de transition et des protamines (Gaucher et al. 2010). En effet, au cours de ce processus, les nucléosomes, représentant la structure de base universelle de compaction du génome chez les eucaryotes, sont remplacés par une nouvelle forme d'emballage ou l'ADN est compacté du fait de son association à de petites protéines basiques, appelées protamines. Bien que ces modifications post-méiotiques soient d'une importance capitale pour la procréation et constituent une étape essentielle dans le cycle de vie, la plupart des mécanismes contrôlant l'établissement de cette nouvelle organisation du génome des gamètes mâles restent inconnus (Rousseaux et al. 2011). Cependant, d'après les études publiées, deux événements essentiels affectant le génome male lors de sa reprogrammation sont susceptibles d'induire une déstabilisation à grande échelle de l'organisation "type somatique" du génome et d'initier le processus de transition vers une nouvelle structure. Tout d'abord, des variants d'histones testiculaires sont synthétisés en quantités considérables et incorporés aux cours des stades méiotiques et post-méiotiques. Il a été démontré que la plupart de ces variants d'histone sont capables d'induire une déstabilisation du nucléosome. De plus, juste avant leur remplacement, les histones subissent une hyperacétylation globale, ce qui contribue aussi à la décompaction de la chromatine (Gaucher et al. 2010). Ces événements, ainsi que le « démontage » ultérieur de la chromatine et le « reconditionnement » du génome en une structure compacte et spécifique, sont contrôlés par un ensemble de facteurs spécifiquement exprimés dans les cellules germinales males. Bien que certains d'entre eux soient en cours d'identification, beaucoup restent encore à découvrir et à caractériser fonctionnellement (Rousseaux et al. 2011).

Ainsi il est important que l'expression des gènes codant pour les facteurs impliqués dans les étapes successives du processus hautement spécifique de programmation du génome male soit aussi hautement contrôlée, afin que

ceux-ci ne s'activent que dans les cellules germinales males, au moment où leur action est nécessaire. C'est pourquoi ces gènes, bien que présents dans toutes les cellules, sont maintenus silencieux dans les cellules non germinales (c'est-à-dire les cellules somatiques) par des mécanismes épigénétiques induisant et maintenant de manière stable une chromatine répressive.

Origine des activations ectopiques dans les cancers

Les activations ectopiques de gènes sont une conséquence des dérégulations épigénétiques qui caractérisent les cellules cancéreuses.

La transformation cellulaire maligne perturbe profondément la plupart des réseaux de régulation responsables des profils d'expression génique qui normalement caractérisent chaque type cellulaire. On sait à présent avec certitude que des altérations génomiques dramatiques telles que des amplifications, des délétions et de nombreuses mutations affectant des gènes différents, sont à l'origine de la croissance et la progression tumorale. En plus de ces variations génétiques, des modifications globales de l'épigénome accompagnent tous les cancers (Shen and Laird 2013). Dans ce cadre, la plupart des recherches menées jusqu'à présent ont porté soit sur la perte d'expression d'une catégorie spécifique de gènes, reconnus comme « suppresseurs de tumeurs », en raison d'anomalies génétiques et/ou épigénétiques, soit, au contraire, sur les conséquences fonctionnelles de la régulation positive de gènes ou l'activation constitutionnelle de certains facteurs inducteurs du cancer par des mutations additives ou des amplifications géniques (Hanahan and Weinberg 2011). En revanche, l'activation ectopique de gènes normalement silencieux semble susciter beaucoup moins d'attention. En effet, dans de nombreux cas, l'expression des facteurs spécifiques du tissu en dehors de leur contexte normal, physiologique passe inaperçue.

Des altérations globales de l'ensemble du génome et de l'épigénome affectent presque sans exception toutes les cellules cancéreuses (Berdasco and Esteller 2010). Une perte générale de la méthylation de l'ADN, ainsi que de certaines marques d'histones, et un gain de méthylation au niveau de certains ilots CpG, sont maintenant reconnus comme des caractéristiques universelles de l'oncogenèse (Esteller 2007). Ces modifications ont des répercussions profondes sur l'expression des gènes conduisant à la répression de certains gènes et l'activation non programmée, ectopique, d'autres gènes. Les conséquences oncogènes de la méthylation aberrante de gènes cruciaux tels que les gènes suppresseurs de tumeur ont fait l'objet d'intenses recherches par de nombreux laboratoires (Sincic and Herceg 2011). Au cours des vingt dernières années, les investigateurs recherchant des antigènes spécifiques de tumeurs, ont remarqué, dans les cellules cancéreuses, l'expression anormale d'un groupe de gènes qui devraient normalement être exprimés seulement dans les cellules germinales mâles (Simpson et al. 2005). Certaines études ont montré que l'activation aberrante de ces gènes reflète l'altération des mécanismes épigénétiques contrôlant leur répression dans les cellules somatiques normales (Karpf 2007; Karpf and Jones 2002; Rousseaux and Khochbin 2009). En dépit du nombre croissant dans la littérature d'études rapportant la dérégulation de gènes spécifiques des cellules germinales mâles dans différents types de cancers, on sait peu de choses sur l'impact de leur activité hors contexte sur la transformation maligne des cellules. Étant donné que certains de ces gènes spécifiques des cellules germinales codent pour des régulateurs épigénétiques puissants jouant un rôle essentiel dans la reprogrammation de génome mâle (Rousseaux et al. 2011), on peut proposer que l'activation aberrante de ces facteurs au cours de la transformation des cellules somatiques en cellules malignes puisse induire des événements de reprogrammation anormaux affectant l'épigénome qui à leur tour conduirait à l'émergence de clones de cellules cancéreuses entièrement transformées.

Les activations ectopiques de gènes normalement silencieux sont associées à tous les types de cancer

Afin de détecter l'expression aberrante des gènes spécifiques du type de cellule et normalement silencieux dans les cellules cancéreuses, il est indispensable de considérer non seulement une définition préalable des profils physiologiques d'expression génique, mais aussi d'établir des critères précis pour définir le seuil permettant de distinguer entre les états inactif ou actif de l'expression du gène dans un transcriptome de cancer donné. Dans de nombreuses études, ces deux paramètres n'ont pas été pris en compte, et par conséquent les activations ectopiques de gènes sont passées inaperçues. Dans ce contexte, une analyse de la littérature montre que des activations de gènes non programmées sporadiques ont été décrites. Dans quelques cas, des analyses fonctionnelles ont été réalisées et ont démontré la contribution de ces expressions ectopiques à l'oncogenèse, la progression et la survie tumorale (Rousseaux and Khochbin 2009; Wang et al. 2011). Récemment le laboratoire a entrepris la recherche systématique de l'expression aberrante des gènes spécifiques d'un tissu dans les cancers. Ce travail a démontré que les activations ectopiques des gènes normalement silencieux spécifiques du tissu, se produisent à grande échelle dans tous les cancers (Rousseaux et al. 2013a).

Rôle oncogène des activations ectopiques : exemples

Les exemples suivant mettent en évidence le concept selon lequel l'activité ectopique de gènes spécifiques du tissu pourrait être déterminante dans l'oncogenèse. De plus ces gènes représentent une source universelle de

biomarqueurs et leur caractérisation fonctionnelle permet d'espérer le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les recherches visant à l'identification d'antigènes spécifiques de la tumeur constituent un tournant dans la révélation de la survenue de l'activation ectopique des gènes spécifiques d'un tissu normal dans les cancers. En effet, les premières recherches dans ce sens ont montré que les antigènes tumoraux identifiés étaient en fait des gènes normaux, mais dont l'expression est normalement spécifique des cellules germinales mâles, mais qui se trouvaient anormalement exprimés hors de leur contexte physiologique dans les cellules cancéreuses étudiées. Ces observations ont donné source à de nombreux programmes de recherche dédiés à explorer leur utilisation comme biomarqueurs et pour des stratégies d'immunothérapie (Rousseaux and Khochbin 2009). Cette recherche sur l'activation ectopique des gènes spécifiques du testicule dans les cancers a continué, mais d'autres groupes ont aussi rapporté l'expression non programmée dans différents types de cancer, d'autres gènes normalement exprimés dans l'embryon et au cours du développement (Naxerova et al. 2008), ou encore dans une variété de cellules adultes et différenciées, allant des neurones (Religio et al. 2005; Rousseaux et al. 2013a) aux mégacaryocytes / plaquettes (Timar et al. 2005). Ces observations suggèrent, dans l'ensemble, que les cellules cancéreuses sont confrontées à une grave perte d'identité et expriment une variété de gènes spécifiques d'un tissu qui normalement devraient être silencieux.

Les cellules cancéreuses « puisent » dans ce réservoir de gènes activés de manière ectopique pour acquérir les nouvelles propriétés requises des cellules malignes.

Régulateurs épigénétiques

Des régulateurs épigénétiques, normalement spécifiquement impliqués dans la

réorganisation du génome des cellules germinales mâles, sont activés dans les cellules cancéreuses.

Bien que la recherche actuelle soit loin d'apporter une image complète de l'ensemble des régulateurs épigénétiques qui interviennent dans la mise en place de l'épigénome des cellules germinales mâles, certains facteurs déterminants ont été déjà identifiés (Rousseaux et al. 2011), et l'activation aberrante dans les cellules cancéreuses de plusieurs d'entre eux a été mise en évidence (Rousseaux and Khochbin 2009).

Parmi ces facteurs, on peut citer **Dnmt3L**, une forme catalytiquement inactive de DNA méthyltransférase. Dnmt3L interagit avec les DNA méthyltransférases Dnmt3a/3b (qui méthylent l'ADN « de novo ») et stimule leur activité catalytique, jouant ainsi un rôle important dans l'établissement de la méthylation de l'ADN dans les rétroposons et de loci génomiques spécifiques dans les cellules germinales (Klose and Bird 2006). Dnmt3L est activée de manière aberrante dans plusieurs types cancers et, du fait de sa capacité à accroître l'activité DNA méthyltransférases « de novo, pourrait contribuer à la méthylation anormale d'îlots CpG induisant ainsi un « silencing » pathologique (Gokul et al. 2009).

Outre les facteurs impliqués dans la méthylation de l'ADN, les cellules germinales expriment également des lecteurs de code des histones spécifiques.

Brd1, une protéine contenant deux bromodomains (*les bromodomains sont des modules permettant la reconnaissance et la liaison aux histones acétylées*), est l'un de ces facteurs dont l'expression est restreinte aux cellules germinales mâles (Pivot-Pajot et al. 2003). Cette protéine, via ses bromodomains, reconnaît spécifiquement la chromatine hyperacétylée, et elle est capable d'induire une compaction de la chromatine dépendante de l'acétylation des histones acétylation (Morinière et al. 2009). Fait intéressant,

une investigation récente a montré que Bdf1, l'orthologue de Brdt chez la levure, est également exigée pour la compaction du génome suivant l'acétylation des histones pendant les phases post-méiotiques de sporulation (Govin et al. 2010), confirmant ainsi un rôle particulier pour Brdt/Bdf1 dans le remodelage de la chromatine acétylée. Ici encore, l'activation anormale, ectopique, de BRDT dans les cellules somatiques (Scanlan et al. 2000) pourrait conduire à une altération à grande échelle de la chromatine acétylée dans les cellules cancéreuses.

Inversement, des travaux ont permis la caractérisation fonctionnelle de certains facteurs testiculaires exprimés hors contexte dans les cellules cancéreuses somatiques suggérant pour ces facteurs un rôle comme régulateurs de l'épigénome dans leur contexte physiologique, lors de la maturation des cellules germinales.

L'un de ces facteurs est **NUT** (protéine nucléaire testiculaire), codée par un gène normalement spécifiquement exprimé dans les cellules germinales males, mais se trouvant activé de manière aberrante dans un groupe de carcinomes très agressifs, connus sous le nom NUT-Midline Carcinoma (NMC), touchant des enfants et des adultes de tous âges (Hsieh et al. 2009). Dans ce cancer, une translocation chromosomique fusionne la protéine à double bromodomaine d'expression ubiquitaire, BRD4, au cadre de lecture presque complet de NUT prenant ainsi le contrôle de son expression. Les investigations récentes du laboratoire montrent que NUT interagit fortement avec l'histone acétyltransférase (HAT) p300 et stimule considérablement son activité catalytique (Reynoird et al. 2010) (Figure 15). Ces résultats suggèrent également que la fonction normale du NUT dans les cellules germinales pourrait être de stimuler l'activité HAT de p300/CBP, ou d'autres HATs, et ainsi de contribuer à la vague d'hyperacétylation des histones dans les cellules post-méiotiques aboutissant au relâchement de la chromatine et au remplacement des histones. Dans les cellules de NMC, la fusion BRD4-NUT

crée un « super-acétylateur » des histones, ce qui induit la formation de domaines de chromatine hyperacétylée du fait de l'action combinée des bromodomaines de BRD4 et de la stimulation de l'activité p300 par NUT, par un mécanisme d'amplification fonctionnelle qui modifie complètement le paysage épigénétique des cellules affectées (Reynoird et al. 2010).

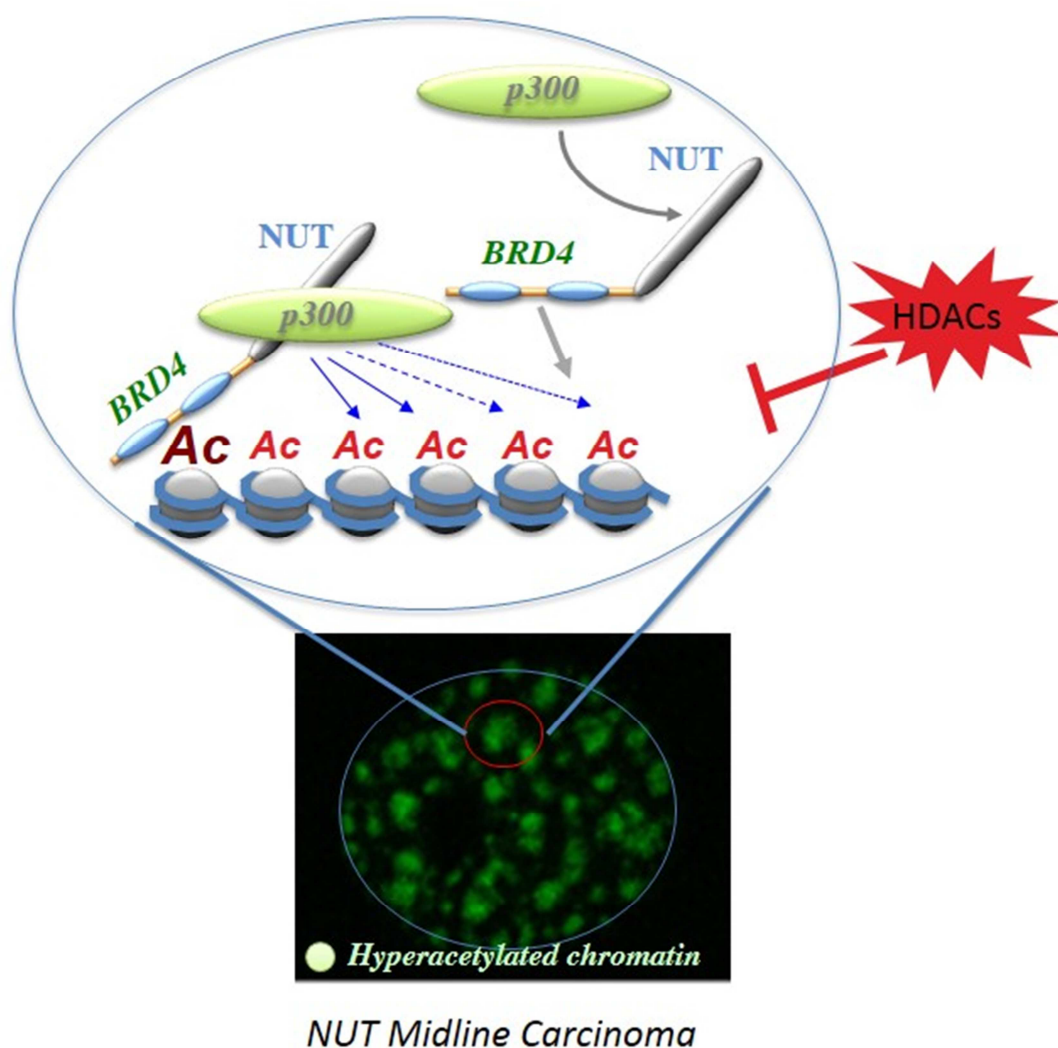


Figure 15. Rôle oncogénique de la protéine de fusion BRD4-NUT dans le Carcinome Non différencié de la Ligne Médiane (NUT Midline Carcinoma, ; « NMC). D'après les données de (Reynoird et al. 2010).

Un autre facteur d'expression prédominante dans le testicule et capable d'agir sur la chromatine est **ATAD2**. La protéine héberge un domaine AAA-ATPase responsable de sa multimérisation et un bromodomaine permettant sa fixation

à la chromatine. Le laboratoire a montré que ce bromodomaine, au moins dans le cas d'un variant d'épissage testicule spécifique, est capable de se lier spécifiquement à l'histone H4 acétylée sur sa lysine 5 (acétyl-K5). ATAD2 semble contrôler la dynamique de la chromatine et pourrait également jouer un rôle important dans la reprogrammation du génome male dans les étapes post-méiotiques, à un moment où il est abondamment exprimé (Caron et al. 2010). De manière surprenante, ATAD2 est activé dans un grand nombre et une grande variété de cancers somatiques n'ayant aucun rapport entre eux, et, dans plusieurs cas, sa surexpression a été corrélée à une durée de survie significativement plus réduite (Caron et al. 2010; Ciró et al. 2009; Kalashnikova et al. 2010).

Enfin, **Boris**, d'expression testiculaire spécifique, est un paralogue du gène CTCF, qui a été récemment identifié comme régulateur critique d'autres gènes spécifiques des cellules germinales males, et requis pour une spermatogenèse normale (Suzuki et al. 2010). L'activation aberrante de BORIS pourrait ainsi affecter le programme d'expression génique des cellules somatiques et dans certains cas pourrait activer plusieurs autres gènes spécifiques du testicule normalement silencieux (Hong et al. 2005; Kang et al. 2007; Klenova et al. 2002; Sun et al. 2008; Vatolin et al. 2005).

Il existe très probablement beaucoup d'autres régulateurs épigénétiques importants spécifiques des cellules germinales qui se trouvent activés dans les cellules cancéreuses, mais, en l'absence de connaissances sur la fonction et la nature des facteurs impliqués dans la reprogrammation du génome male, ils ne sont à l'heure actuelle pas encore identifiés.

Régulateurs de la transcription

Certains facteurs testiculaires activés dans les cellules somatiques cancéreuses sont impliqués dans la régulation de la transcription.

L'activité « hors contexte » des facteurs mentionnés ci-dessus a le potentiel d'affecter profondément et globalement l'épigénome des cellules. Cependant plusieurs investigations récentes ont montré la capacité d'autres facteurs exprimés de manière ectopique à modifier l'activité de transcription cellulaire et par conséquent à perturber une voie de régulation en aval. La plupart des données sur cet aspect concernent les protéines codées par des gènes dits « cancer-testis » (C/T) de la famille **MAGE** comme régulateurs de l'activité de p53. Les premiers travaux ont montré que plusieurs membres de la famille MAGE peuvent supprimer l'apoptose p53-dépendante dans des lignées cellulaires de mélanome (Yang et al. 2007). Des investigations détaillées ont démontré la capacité d'un membre spécifique, MAGEA2, à recruter HDAC3 et à induire la déacétylation de p53 et son inactivation après un traitement génotoxique (Monte et al. 2006). En outre, une fonction nouvellement découverte des membres de la famille MAGE est la stimulation de la boucle E3 ubiquitine ligases, qui seraient responsables de la dégradation par le protéasome d'une variété de facteurs cellulaires essentiels. À titre d'exemple, le complexe MAGE-C2-TRIM28 est capable d'induire l'ubiquitination et la dégradation de p53 (Doyle et al. 2010).

En plus de la modulation de l'activité de p53, les membres de la famille MAGE peuvent également affecter plusieurs circuits de régulation de transcription indépendants tels que ceux contrôlés par le récepteur des androgènes. En effet, MAGE-11, un autre membre de la famille MAGE, a la capacité de stimuler l'activité transcriptionnelle de ce récepteur (Bai and Wilson 2008). Un facteur de transcription également contrôlé par des membres de la famille MAGE est Hif1- α . MAGE-11, ainsi qu'un élément étroitement lié, MAGE-9, interagissent avec la principale enzyme d'hydroxylation d'Hif1- α , PHD2, diminuant son activité catalytique. La prolyl-hydroxylase catalyse l'hydroxylation spécifique de Hif1- α induisant sa dégradation par le protéasome. L'expression aberrante de MAGE-11/9, dans les tumeurs conduit donc à la stabilisation de Hif1- α et la

stimulation de l'angiogenèse et du métabolisme glycolytique (Aprelikova et al. 2009). Enfin, MAGE-A1, par le recrutement de HDAC1, peut transformer un activateur transcriptionnel, SKIP, en un répresseur et ainsi modifier l'état de l'expression génique des cellules cancéreuses (Laduron et al. 2004).

Le gène p53 apparaît comme une cible importante de l'activité hors contexte des facteurs « cancer/testis » (C/T). En effet, un autre membre de facteurs C/T, **CAGE**, utilise HDAC2 pour réprimer l'expression du gène p53 dans des lignées cellulaires de mélanome et leur confère ainsi une résistance à l'apoptose induite par les agents cytotoxiques (Kim et al. 2010).

L'activité hors contexte de la protéine de fusion **NUT- BRD4** affecte également les fonctions de p53 par la séquestration du CBP / p300 dans les foyers BRD4-NUT, ce qui empêche l'activation de p53 dans la réponse aux traitements génotoxiques (Reynoird et al. 2010).

Comme les membres MAGE, NUT et CAGE contrôlent également d'autres circuits de transcription critiques. Un travail récent a montré qu'une métalloprotéase de matrice MMP-2 pourrait être induite par l'action de **CAGE** sur la voie transcriptionnelle de NF- κ B et AP1 (Kim and Jeoung 2009). De même, NUT en fusion avec Brd4 agit sur CBP/p300 et a le potentiel d'affecter l'expression non seulement de p53 mais aussi celle des nombreux gènes contrôlés par ces HATs (Reynoird et al. 2010).

Les facteurs testiculaires activés de manière ectopique dans les cancers peuvent également activer un programme de **prolifération cellulaire**. En effet, il est décrit que le facteur C/T CAGE utilise les facteurs de transcription AP-1 et E2F-1 pour activer des cyclines de Type D1 et E, favorisant ainsi la progression de la phase G1 à S (Por et al. 2010). Fait intéressant, ATAD2 active également un programme de prolifération des cellules cancéreuses lors de son activation aberrante. ATAD2 agit de deux manières comme régulateur

de la prolifération cellulaire : d'une part il coopère avec des facteurs critiques tels que Myc (Ciró et al. 2009) et E2F-1 (Revenko et al. 2010) et d'autre part il affecte spécifiquement ou globalement l'expression des gènes en modifiant l'expression des histones méthyltransferases MLL et EZH2.

Enfin, l'activation aberrante dans les cellules cancéreuses des voies impliquant les **ARNs spécifiques** des cellules germinales représente également un mécanisme important pour les altérations globales ou spécifiques de l'expression des gènes dans les cellules transformées. Par exemple, il a été montré que **PIWIL2**, membre de la famille de gènes PIWI/AGO, normalement exprimé spécifiquement dans les testicules, est exprimée hors contexte dans une variété de cancers (He et al. 2010 ; Lee et al. 2006; Liu et al. 2010). Il est intéressant de noter que PiwiL2 se comporte comme un oncogène puissant et que son expression ectopique seule est suffisante pour induire la transformation de fibroblastes via un mécanisme impliquant le facteur anti-apoptotique Bcl-X (L) et le facteur de transcription Stat3 (Lee et al. 2006; Ye et al. 2010).

Activation du programme d'expression génique des cellules germinales males et hypothèses concernant les mécanismes impliqués

L'expression ectopique de gènes spécifiques du testicule s'associe à une « crise d'identité » des cellules somatiques qui acquièrent une identité proche de celle des cellules germinales.

Comme discuté précédemment, plusieurs régulateurs transcriptionnels essentiels tels qu'ATAD2, CAGE et PIWIL2, pourraient activer un programme d'expression de gènes lié à la prolifération cellulaire. En fonction des propriétés connues de certains facteurs épigénétiques testiculaires activés dans les cellules cancéreuses, on peut émettre l'hypothèse que leur action

pourrait également activer un programme développemental spécifique. Cette hypothèse est soutenue par les données expérimentales obtenues dans un travail décrivant l'expression ectopique de gènes germinaux dans des tumeurs cérébrales malignes générées chez la drosophile (Janic et al. 2011). En effet, une analyse détaillée de l'expression des gènes liés au cancer dans ces tumeurs du cerveau chez la drosophile induites suite à l'inactivation du gène suppresseur de tumeur, *l(3)mbt*, a montré qu'environ 25% des gènes activés appartiennent au répertoire des transcrits de cellules germinales. Plusieurs de ces gènes codent pour des protéines impliquées dans les voies piRNA et probablement régulent l'expression ectopique de petits ARNs (normalement présents dans les ovaires), dans ces tumeurs cérébrales. Fait intéressant, *Vasa*, qui est un composant de « nuage », un organite impliqué dans la maturation des ARNs dans la cellule germinale, se trouve parmi ces gènes exprimés de manière ectopique. La pertinence de cette observation est renforcée par la démonstration récente que l'expression ectopique de l'homologue de *Vasa* chez le poulet, *Cvh*, induit la reprogrammation des cellules souches embryonnaires de poulet en cellules germinales (Lavial et al. 2009). Cette action de *Cvh* est fortement stimulée quand un microARN, *miR-34c*, spécifique du testicule, est co-exprimé avec *Cvh*. En outre, *miR-34c* semble être suffisant pour l'activation d'un programme d'expression génique germinale lorsqu'il est exprimé seul dans les cellules HeLa (Bouhallier et al. 2010). Comme dans le cas des facteurs C/T discutés ci-dessus, il a été montré que plusieurs de ces gènes exprimés de manière ectopique dans les tumeurs du cerveau chez la drosophile sont responsables de la croissance tumorale, ce qui indique que, en plus des gènes germinaux, ils peuvent également activer un programme de prolifération. Bien qu'il soit clair que l'expression ectopique de facteurs C/T contribue au patron d'expression spécifique des cellules cancéreuses, il n'a pas été clairement établi comment et pourquoi ce programme d'expression génique germinale s'active dans les cellules cancéreuses. Dans le cas de la drosophile (Janic et al. 2011) et celui de chez

C. elegans (Unhavaithaya et al. 2002; Wang et al. 2005), la voie Rb semble jouer un rôle important dans la répression des gènes germinaux dans les cellules somatiques. Chez les vertébrés, le contexte épigénétique, principalement la méthylation de l'ADN et la méthylation de la lysine 9 de de l'histone H3 (H3K9), semblent importants dans la répression de ces gènes (Berdasco and Esteller 2010; Karpf 2006; Rousseaux and Khochbin 2009). La méthylation de la région promotrice des gènes spécifiques de la lignée germinale pourrait être dépendante de l'activité d'un facteur de transcription particulier, E2F6, un répresseur transcriptionnel indépendant de Rb, dont l'activité serait critique dans pour empêcher l'activation des gènes de la lignée germinale dans les cellules somatiques (Pohlers et al. 2005), via la reconnaissance d'un motif commun aux gènes germinaux et l'induction de la méthylation de l'ADN par l'action de l'ADN méthyltransférase Dnmt3b (Velasco et al. 2010).

Il a également été montré que la modification post-traductionnelle "SUMO" d'un facteur de transcription particulier, Sp3, est responsable de la répression des gènes spécifiques des spermatocytes dans les cellules somatiques, et contrôle également la méthylation de ces gènes (Stielow et al. 2010).

Ces données suggèrent que, en plus des altérations épigénétiques globales, la dérégulation fonctionnelle d'un groupe de facteurs spécifiques pourrait conduire à l'activation d'un nombre important de gènes germinaux dans les cellules somatiques.

Amplification des dérégulations épigénétiques initiée par les facteurs C/T

On peut émettre l'hypothèse que les gènes spécifiques de la lignée germinale pourraient conférer un avantage sélectif au cours de la transformation oncogénique. Le fait qu'un sous-ensemble de facteurs spécifiques de la lignée germinale male représente un groupe de régulateurs très puissants de l'épigénome, pourrait expliquer, au moins en partie, pourquoi l'expression

ectopique de gènes spécifiques du testicule donnerait aux cellules un avantage sélectif. En effet, l'expression de facteurs tels que des variants d'histones spécifiques du testicule, qui induisent presque systématiquement une instabilité du nucléosome (Gaucher et al. 2010), pourrait déclencher des altérations secondaires, qui elles-mêmes affecteraient globalement l'organisation du génome et de l'épigénome. Cela est également vrai pour de nombreux autres facteurs contrôlant par exemple la méthylation du génome et la réorganisation de la chromatine dans les cellules germinales mâles. On peut émettre l'hypothèse d'un mécanisme de boucle d'amplification où des altérations initialement limitées de l'expression des gènes conduiraient à la dérégulation de certains régulateurs puissants de l'épigénome qui à leur tour pourraient déclencher des dérégulations d'autres groupes de gènes entraînant ainsi des vagues successives d'activation / répression de gènes et aboutissant à des cycles successifs d'altération de l'épigénome (Figure 16). Le programme d'expression de la lignée germinale pourrait alors devenir une cible privilégiée pour les activations aberrantes de gènes, puisque la plupart des gènes correspondants présentent un état épigénétique très spécifique, distinct de celui des autres gènes, dans les cellules somatiques (Weber et al. 2007). Ainsi les gènes de la lignée germinale constitueraient un pool de gènes qui pourraient être particulièrement sensibles aux altérations épigénétiques globales.

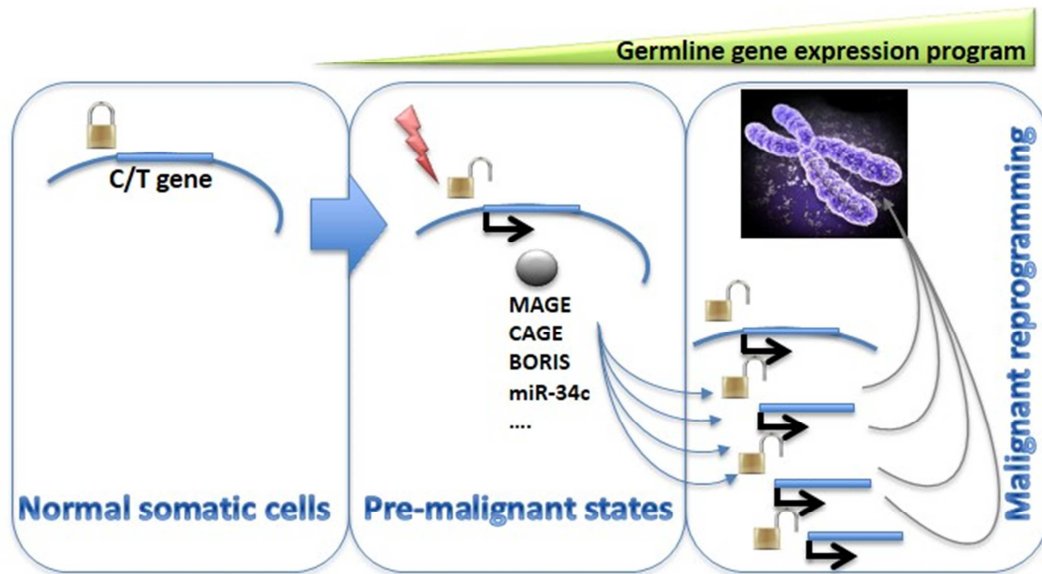


Figure 16. Hypothèse selon laquelle des altérations initialement limitées de l'expression des gènes conduiraient à la dérégulation de certains régulateurs puissants de l'épigénome qui à leur tour pourraient déclencher des dérégulations d'autres groupes de gènes entraînant ainsi des vagues successives d'activation / répression de gènes et aboutissant à des cycles successifs d'altération de l'épigénome. D'après (Wang et al. 2011).

En outre, certains des facteurs des cellules germinales males pourraient agir comme régulateurs « maîtres » contrôlant l'expression d'autres gènes germinaux. Un exemple est l'activation ectopique de miR-34c et Vasa, qui à leur tour pourraient activer d'autres gènes de la lignée spermatogénique (Bouhallier et al. 2010; Laval et al. 2009). La dérégulation initiale de ces gènes pourrait donc également activer un programme spermatogénique, qui, dans le contexte des cellules somatiques, conférerait des avantages considérables de croissance en particulier dans des conditions très défavorables ou de stress.

Caractère addictif de l'activation des gènes ectopiques dans le cancer

Bien que les activations de gènes survenant initialement lors de la transformation maligne, en raison de l'incapacité des cellules cancéreuses à

maintenir efficacement l'inactivation génique, puissent être stochastiques, à des stades ultérieurs de la progression tumorale, l'expression ectopique stable de ces gènes pourrait refléter une sélection de ceux qui facilitent l'oncogenèse. En effet, les cellules cancéreuses ont besoin d'acquérir de nombreuses fonctionnalités nouvelles pour faire face aux défis liés aux changements du métabolisme cellulaire, à la nécessité de migrer hors du tissu d'origine et de se nicher et survivre dans de nouveaux environnements, etc... (Hanahan and Weinberg 2011).

L'hypothèse que le produit de certains des gènes activés de manière ectopique puisse devenir indispensable pour faire face aux nouvelles exigences des cellules cancéreuses, implique qu'il devrait y avoir une relation entre les activations ectopiques de chacun de ces gènes et l'agressivité de la tumeur. Comme indiqué ci-dessus, l'étude du modèle de tumeur inductible du cerveau chez la drosophile apporte un soutien indéniable à cette hypothèse. En effet 25 % des gènes régulés positivement dans le cancer induit sont des gènes normaux exprimés spécifiquement dans la lignée germinale qui se trouvent activés de manière ectopique dans les tumeurs. De plus ce travail montre que la croissance des cellules tumorales devient fortement dépendante de l'activité hors contexte de ces gènes (Janic et al. 2011). Récemment, l'étude des expressions ectopiques de gènes dans le cancer du poumon chez l'homme, a permis de démontrer que l'expression de 26 gènes de la lignée germinale mâle ou du placenta est spécifiquement associée aux tumeurs très agressives, susceptibles d'évoluer vers un état métastatique (Rousseaux et al. 2013a). Bien que cette dernière recherche n'ait pas encore pu montrer comment les cellules cancéreuses deviennent dépendantes de ces expressions de gènes ectopiques, notre capacité d'identifier un groupe homogène de cancers agressifs, indépendamment des autres caractéristiques cliniques, pathologiques ou moléculaires, a permis de découvrir leurs caractéristiques moléculaires les plus éminentes. Celles-ci comprennent notamment leurs similitudes avec les cellules de lignée germinale ou

embryonnaires souches, leur grande capacité de prolifération et la perte d'expression de gènes assurant la réponse immunitaire, les interactions cellulaires et les capacités de signalisation. Les exemples décrits ci-dessus suggèrent vivement que, parmi les gènes activés de manière ectopique, plusieurs pourraient jouer un rôle essentiel dans la création et le maintien de l'affection maligne.

L'examen des travaux publiés soutient résolument cette hypothèse et montre comment, dans les quelques cas étudiés, l'activité hors contexte d'un facteur peut s'avérer essentielle dans la promotion de l'oncogenèse. Le point important qui émerge est que chacun de ces gènes activés de manière ectopique pourrait contribuer à l'oncogenèse en fonction de ses caractéristiques moléculaires intrinsèques, telles que l'activité enzymatique, la fonction structurale, etc. Dans la plupart des études, cependant, l'impact précis de l'activité hors contexte de ces gènes de la lignée germinale n'a pas été identifié. Par exemple, dans le système de tumeurs induites de la drosophile discuté ci-dessus (Janic et al. 2011), bien que les gènes de la lignée germinale activés de manière ectopique servent à activer la prolifération cellulaire, les bases moléculaires sous-jacentes de leur action restent obscures. Dans quelques cas, les analyses moléculaires ont révélé des mécanismes oncogéniques possibles pour les gènes activés de manière ectopique. De nombreuses données concernent la **famille MAGE** des antigènes du cancer / du testicule, qui d'après les résultats rapportés, contrôlent les voies de signalisation de P53 ainsi que la stabilité d'HIF1 (Voir ci-dessus). Il est donc important de poursuivre la recherche fondamentale sur la caractérisation fonctionnelle de tous les régulateurs spécifiques de la lignée germinale afin de mieux appréhender leur contribution à la transformation maligne lors de leur activation ectopique. Ainsi, avec l'avènement de la nouvelle génération de médicaments épigénétiques, à savoir les inhibiteurs des bromodomaines des protéines de la famille BET, il devient possible de contrer leurs activités oncogènes (Muller et al. 2010). Comme indiqué ci-dessus, les travaux du

laboratoire ont montré que le membre de cette famille, spécifique du testicule, **BRDT**, contrôle des programmes d'expression de gènes méiotiques et post-méiotiques spécifiques (Gaucher et al. 2012). La recherche moléculaire des fonctions de BRDT dans sa situation physiologique pourrait nous aider à mieux comprendre son potentiel oncogénique lorsqu'il est activé de manière ectopique (Rousseaux and Khochbin 2009; Wang et al. 2011) et ainsi nous donner une indication pour l'utilisation d'inhibiteurs de BET comme stratégie thérapeutique.

À ce propos, un exemple est la contribution déterminante du facteur spécifique du testicule, NUT, à l'activité oncogénique de la **protéine de fusion BRD4-NUT** suite à une translocation chromosomique t(15;19) (q13;p13) dans le carcinome de la ligne médiane (NUT Midline Carcinoma ou NMC) (French 2012) déjà abordé ci-dessus. L'équipe a réalisé l'analyse moléculaire détaillée de l'activité de BRD4-NUT qui a révélé une coopération entre le bromodomaine de BRD4 (autre membre de la famille BET mais dont l'expression n'est pas spécifique d'un tissu) et NUT dans la création de domaines hyperacétylés de chromatine transcriptionnellement inactive. Ces foyers sont générés par une boucle d'amplification de l'acétylation ou la partie BRD4 est responsable de la liaison de la protéine de fusion BRD4-NUT aux histones acétylés, et la moitié NUT recrute et active l'histone acétyltransferase CBP/p300, qui ainsi acétyle les queues d'histones environnantes, permettant le recrutement de BRD4-NUT et ainsi de suite, ce qui aboutit à la création de foyers de chromatine hyperacétylée. Ces foyers piègent de nombreux facteurs cellulaires critiques, tels que CBP et p300, nécessaires à la réponse cellulaire appropriée à différents stimuli, qui sont indispensables pour la différenciation cellulaire ou pour la réponse apoptotique suite à des traitements génotoxiques (Reynoird et al. 2010). L'identification de ces mécanismes moléculaires fournit ainsi un rationnel pour la conception d'approches thérapeutiques efficaces basées sur l'utilisation soit d'un inhibiteur des bromodomains (Filippakopoulos et al. 2010) soit d'inhibiteurs de HDACs (Schwartz et al.

2011). En effet, il a été montré que la création de foyers BRD4-NUT exige les bromodomaines de BRD4 puisqu'une mutation dans un bromodomaine BRD4 abolit la formation de foyers (Reynoird et al. 2010). En outre, un traitement par les inhibiteurs de HDACs, en entraînant une hyperacétylation pangénomique, aboutit à la dispersion des foyers BRD4-NUT et à la liaison non ciblée de la protéine de fusion BRD4-NUT partout dans le génome (Reynoird et al. 2010). Dans les deux cas, la dispersion de BRD4-NUT libère les facteurs de régulation piégés et rétablit la différenciation cellulaire et la réponse au stress. D'autres espoirs pour le développement de thérapies ciblées visent ATAD2 aussi mentionné ci-dessus. **ATAD2** est normalement exprimé de manière prédominante dans les cellules germinales mâles mais devient presque systématiquement activé dans une grande variété de types de cancer. La surexpression d'ATAD2 est clairement associée à un mauvais pronostic dans le cancer du poumon et du sein. Bien que le rôle d'ATAD2 n'ait pas été précisément élucidé, il a été montré que la protéine coopère avec des facteurs de transcription essentiels, tels que Myc, E2F et les récepteurs aux androgènes et aux œstrogènes, en contrôlant l'activité de gènes cibles et la prolifération cellulaire (voir ci-dessus). Ainsi ATAD2 peut être considérée comme une cible potentielle très intéressante puisque ses deux domaines fonctionnels, un bromodomaine et un domaine AAA ATPase, pourraient potentiellement être bloqués par de petites molécules inhibitrices (Boussouar et al. 2013).

D'après ces exemples, il est évident que l'activité hors contexte des gènes de la lignée germinale est un événement déterminant pour la transformation cellulaire maligne et/ou la progression tumorale. Les cellules cancéreuses deviennent très dépendantes de certains des gènes activés de manière ectopique, ce qui pourrait être considéré dorénavant comme leur tendon d'Achille. Il en découle que ces gènes peuvent servir de cible pour des approches thérapeutiques innovantes.

Cibler les gènes exprimés de manière ectopique comme approche thérapeutique

Les recherches de notre laboratoire et les quelques exemples rapportés de la littérature mentionnés ci-dessus, nous ont conduits à suggérer que les activations de gènes ectopiques se produisant dans presque tous les cancers (Rousseaux et al. 2013a) puissent servir de cibles thérapeutiques. Un exemple récent étaye fermement cette hypothèse. Dans un travail collaboratif impliquant l'équipe d'accueil, le groupe de recherche sur les lymphomes (dirigé par Mary Callanan) et la plateforme protéomique du CEA de Grenoble (dirigée par Jérôme Garin), une stratégie de criblage protéomique combinée à une analyse transcriptomique ciblée a permis l'identification des protéines exprimées de manière ectopique dans une lignée d'un lymphome à cellules B agressif. Ce travail a conduit à l'identification de **CYCLON**, un facteur nucléaire, dont la fonction est inconnue, normalement exprimé de manière prédominante dans le testicule. Cette recherche a démontré que CYCLON est exprimé de manière ectopique dans les formes agressives de lymphome diffus non hodgkinien à grandes cellules de type B (DLBCL pour « Diffuse Large B-Cell Lymphoma ») (Emadali et al. 2013). Le traitement d'excellence du DLBCL associe le Rituximab, un anticorps thérapeutique anti-CD20, à une chimiothérapie cytotoxique, mais il existe un certain nombre de cas de résistance à ce traitement avec échec de réponse clinique (Lenz et al. 2008). Cette recherche (Emadali et al. 2013) a démontré que CYCLON est un facteur conférant une résistance à ce protocole thérapeutique. De plus, CYCLON étant activé par MYC, la régulation négative de ce dernier par un inhibiteur des bromodomaines des protéines de la famille BET, JQ1, diminue aussi l'expression de CYCLON et rétablit la sensibilité des cellules au Rituximab (Emadali et al. 2013). Ces résultats ouvrent désormais la voie à une stratégie

visant à accroître l'efficacité de la réponse à un traitement par le Rituximab. Un inhibiteur de bromodomaine de la famille BET (iBET) est actuellement en essai clinique pour le carcinome de la ligne médiane (NUT Midline Carcinoma ou NMC) (Grayson et al. 2013).

L'utilisation de gènes activés de manière ectopique comme marqueurs pourrait également mener à d'autres stratégies thérapeutiques. En effet, des recherches récentes de notre laboratoire ont démontré que l'activation ectopique d'un sous-ensemble de 26 gènes spécifiques du testicule et du placenta identifie un groupe de tumeurs du poumon très agressives indépendamment de tous les paramètres histopathologiques et cliniques. Une comparaison supervisée de leur profil transcriptomique avec celle des tumeurs du poumon moins agressives a montré un état très caractéristique de l'expression des gènes associés à ces tumeurs très agressives (Rousseaux et al. 2013a). Une analyse des données fonctionnelles utilisant les termes de Gene Ontology et l'outil GeneSet Enrichment Analysis (GSEA) a montré que les gènes régulés positivement dans le groupe de tumeurs agressives codent pour des facteurs nucléaires, normalement exprimés dans les cellules souches embryonnaires et germinales incluant de nombreux facteurs impliqués dans la prolifération cellulaire (Rousseaux et al. 2013a). Un autre aspect très intéressant de ces analyses est qu'elles montrent également que certains médicaments peuvent potentiellement contrer cet état d'expression. Par conséquent, de nouvelles stratégies pourraient être proposées utilisant des drogues susceptibles de déplacer le profil d'expression génique agressif vers un profil correspondant à des tumeurs plus « bénignes » ou même avec retour à un profil de type normal. Par exemple notre travail a mis en évidence des exemples où les traitements de lignées cellulaires du cancer du poumon avec l'inhibiteur de ras Salirasib ou avec l'Aplidin pourraient atténuer le profil d'expression génique agressif (Rousseaux et al. 2013a).

Par conséquent, la découverte et l'analyse fonctionnelle moléculaire des

gènes exprimés de manière ectopique et des facteurs pour lesquels ils codent, que ce soit dans leur contexte physiologique ou dans les cellules cancéreuses, permettra d'ouvrir la voie à des stratégies et des approches thérapeutiques innovantes.

L'exploitation du concept d'activation ectopique systématique de gènes spécifiques de tissu et son intégration dans la recherche fondamentale et clinique devrait ouvrir la porte à une meilleure compréhension de la biologie du cancer, et vers des stratégies thérapeutiques innovantes et plus efficaces.

En effet, au-delà de l'intérêt pour ces gènes en tant que biomarqueurs potentiels, ils pourraient également être utilisés comme cibles dans les approches anticancéreuses. Toute activité enzymatique ou domaine spécifique présent dans ces facteurs exprimés de manière ectopique, peut potentiellement servir de cible thérapeutique. Il s'agit de cibles idéales puisque l'action des inhibiteurs spécifiques peut se limiter aux cellules germinales et cancéreuses. En outre, la compréhension des mécanismes épigénétiques responsables de leur répression pourrait également fournir d'autres stratégies visant à rétablir la répression des gènes activés de manière ectopique, privant ainsi les cellules cancéreuses de leurs « béquilles », et invalidant très gravement leurs capacités acquises.

Objectifs de thèse et présentation générale du travail

L'objectif principal de mon travail de thèse était d'identifier les gènes exprimés de manière ectopique dans les lymphoblastes des patients atteints de leucémies lymphoblastiques aiguës (LAL) et d'évaluer leur intérêt pour une utilisation comme marqueurs pronostics et de prédiction de la réponse au traitement.

Afin de réaliser ce travail, nous avons développé une stratégie pour identifier un large panel de gènes exprimés de manière ectopique dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et non dans la moelle osseuse normale ou du sang périphérique.

Cette approche nous a permis d'identifier une signature de huit gènes spécifiques de la lignée germinale / cellules souches embryonnaires, exprimée de manière aberrante dans les échantillons de moelle osseuse dans deux cohortes distincts de LAL pédiatrique: 4 gènes prédictifs de mauvais pronostic et 4 gènes associés à une issue favorable.

Nous avons par la suite montré qu'une combinaison de l'expression des 8 gènes peut identifier les formes agressives de LAL enfants dans des cohortes indépendantes.

Une analyses des données transcriptomiques et cliniques des patients adultes atteint de LAL a permis de montrer que la même signature permet d'identifier les formes les plus agressives mêmes chez les adultes.

En outre, notre approche a permis de montrer que notre système de détection des 8 gènes, basé sur un test RT- qPCR, pourrait aider à prédire la réponse précoce à un traitement (induction) dans un groupe de 31 patients adultes nouvellement recrutés, atteints de LAL. Enfin, basé sur notre méthode de classification, nous avons constaté qu'il existe des traits biologiques communs caractérisant les formes agressives de LAL à la fois chez les enfants et chez les adultes. Nous montrons que les formes les plus agressives présentent les caractéristiques de cellules souches hématopoïétiques en repos. Cette information pourrait être utilisée pour améliorer les approches thérapeutiques.

MÉTHODES

L'analyse transcriptomique, la détection des expressions ectopiques, l'évaluation des associations pronostiques, la caractérisation du profil d'expression des LAL agressives et l'analyse de l'enrichissement en « Gene Set » (« Gene Set Enrichment Analysis»), les détections par RT-qPCR, ont été réalisées selon l'approche décrite dans (Rousseaux et al. 2013a). Ces approches sont détaillées ci-dessous.

Les caractéristiques des 31 patients de notre série sont décrites dans le tableau S1, leur traitement d'induction (Larson et al. 1995; Mi et al. 2012b) et les mesures de la maladie résiduelle minimale (Minimum Residual Disease ou MRD) (Pui and Evans 2006; Weng et al. 2013) sont basés sur les protocoles décrits dans la littérature.

Analyse bio-informatique: données transcriptomiques disponibles utilisées pour une méta-analyse

Les données ayant fait l'objet de cette analyse sont disponibles sur le site GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Elles ont toutes été obtenues dans la technologie Affymetrix (54K: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array).

Les données suivantes ont été utilisées:

- Expression dans des échantillons de tissus humains normaux (GSE3526 pour les tissus adultes, GSE7434, GSE9994 et GSE18809 pour le placenta, GSE11350 pour les cellules embryonnaires souches (ES) et les cellules germinales mâles.
- Expression dans une grande série de LAL chez l'adulte (étude MILES, GSE13159; n=2096 cas; 924 cas sans compter les Leucémies Myéloïdes Aigues ou les moelles osseuses normales dans la même technologie (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Arraytechnology) (Haferlach et al. 2010; Kohlmann et al. 2008).

- Expression dans les lymphoblastes de LAL de deux études chez l'enfant: GSE11877 (207 cas (Kang et al. 2009); et GSE7440 (59 cas; (Bhojwani et al. 2008)).

Détermination d'une liste de gènes non exprimés dans la moelle osseuse non leucémique

Dans un premier temps le patron d'expression de tous les gènes humains a été analysé dans les tissus normaux. L'objectif était de définir une liste de gènes jamais exprimés dans la moelle osseuse normale.

Une stratégie semblable à celle utilisée dans (Rousseaux et al. 2013a) a été appliquée ici, mais avec une orientation particulière visant à définir de manière très spécifique les gènes qui ne sont pas exprimés dans la moelle osseuse hématopoïétique normale. Nous avons examiné les données du transcriptome de différents échantillons de tissus humains normaux disponibles à partir des bases de données (GSE3526 pour les tissus adultes, GSE7434, GSE9994 et GSE18809 pour le placenta, GSE11350 pour les cellules ES et les cellules germinales mâles), ainsi que les 73 échantillons de moelle osseuse non leucémique (à partir de GSE13159). Toutes ces données ont été obtenues grâce à la technologie Affymetrix "Affymetrix.GeneChip.HG-U133_Plus_2" et sont disponibles dans la base de données GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Les fichiers des données brutes .CEL ont été téléchargés et les données ont été normalisées en utilisant le logiciel GX GeneSpring (version 11, Agilent Technologies) avec l'algorithme RMA, et normalisation par les quantiles, puis exportées. Ces valeurs d'expression normalisées ont ensuite été utilisées pour établir une liste de gènes avec une expression prédominante dans un tissu et, pour chacun de ces gènes, pour identifier le groupe de tissus dans lesquels l'expression maximale a été trouvée selon la méthode suivante. Les tissus ont été répartis dans les cinq groupes suivants: les cellules germinales (comprenant les cellules germinales

mâles et femelles), les cellules souches embryonnaires (ES), le placenta, les tissus neurologiques, les autres tissus somatiques (non germinaux) adultes. Pour chaque gène, la valeur correspondant à l'expression moyenne dans tous les tissus et l'écart type sont calculés, ainsi que le maximum des valeurs d'expression dans tous les tissus. Le groupe de tissus où cette expression maximale a été trouvée a également été enregistré. Un gène est défini comme étant exprimé de manière « prédominante » dans un groupe de tissus si son maximum d'expression est supérieur à un seuil défini par la valeur moyenne des signaux dans tous les tissus normaux + $x3$ l'écart type. Dans le cas contraire, le gène est considéré comme n'ayant pas de spécificité d'expression particulière. Une première liste de gènes avec une expression majoritaire autre que dans les tissus adultes normaux somatiques a été créée, comprenant les gènes ayant une expression prédominante dans les cellules germinales ou les souches embryonnaires (ES) ou le placenta (Figure 18 : 1ère étape), ce qui représente environ un tiers de l'ensemble des gènes du génome. .

Afin de détecter les expressions de gènes « hors contexte », nous avons défini une valeur seuil pour l'expression aberrante. Pour chacun des gènes de la liste ci-dessus (avec expression prédominante dans la lignée germinale ou les cellules ES ou le placenta), cette valeur seuil a été définie en fonction de la distribution des valeurs des signaux d'expression pour ce gène dans une série de 112 tissus somatiques adultes normaux (à partir de GSE3526). Ce seuil correspond au signal moyen dans les tissus de contrôle $112 + 3$ écarts-types. Après avoir calculé cette valeur seuil pour chaque gène, nous avons recherché leur expression dans chacun des 73 échantillons de moelles osseuses non leucémiques, et tous les gènes exprimés, même sporadiquement dans quelques-uns échantillons de moelles osseuses non leucémiques sont éliminés (Figure 18 : 2ème étape). Cette étape a permis de s'assurer qu'aucun des gènes considérés ne sont exprimés, même occasionnellement, dans la moelle osseuse normale.

Détection de l'expression « hors contexte » de ces gènes dans les LAL

Ces valeurs seuils ont ensuite été utilisées pour discriminer entre expression et non - expression de ces gènes dans les lymphoblastes des LAL chez les patients. Pour cette approche, il était important que les données transcriptomiques des tissus normaux, des LAL des enfants et des adultes de toutes les séries aient été obtenues dans la même technologie Affymetrix et que les fichiers de données brutes (.CEL) correspondant soient normalisés de manière simultanée avec les échantillons de tissus somatiques adultes normaux.

Évaluation de la valeur pronostique de l'expression « hors contexte » des gènes germinaux / ES dans les lymphoblastes des enfants atteints de LAL

Chacun des gènes de la lignée germinale/ES/placenta de la liste se trouvant exprimé dans les lymphoblastes d'au moins 5% des enfants atteints de LAL de la première série de patients (GSE11877) a été testé pour son potentiel pronostique dans une approche univariée, avec l'aide du logiciel R (version 2.10.0). Pour chaque gène, les probabilités de survie ont été comparées entre les patients dont la moelle osseuse exprime le gène (le signal dépasse le seuil établi comme décrit ci-dessus) et ceux dont la moelle osseuse ne l'exprime pas. Un test du logrank permet de comparer les deux courbes de survie. Ces gènes ont été testés exactement de la même façon dans la deuxième série de patients (GSE7440). Au total, de 8 gènes ont été trouvés dont l'expression aberrante est significativement associée à une probabilité de survie à 5 ans soit diminuée (4 gènes) soit augmentée (4 gènes), avec une valeur de $p < 0.05$.

Ces gènes ont été ensuite sélectionnés et testés en différentes combinaisons avec des approches univariées et multivariées. Considérant les gènes dont

l'expression est associée à un pronostic positif, les patients ont été répartis en deux groupes principaux, nommés A pos (plus forte probabilité de survie : 2 ou plus des 4 gènes sont exprimés) et B pos (plus faible probabilité de survie : aucun ou un seul des quatre gènes sont exprimés). Ensuite, en considérant le nombre de gènes exprimés associés à un pronostic négatif, les patients ont été répartis en deux groupes principaux, nommés A neg (plus forte probabilité de survie : aucun des quatre gènes ne sont exprimés) et B neg (plus faible probabilité de survie : l'un au moins des quatre gènes sont exprimés). Utilisant des gènes positivement ou négativement corrélés avec la survie, les patients ont ensuite été répartis en trois groupes, P1 (ou "AA", associé au meilleur pronostic, défini par l'expression d'au moins 2 des quatre gènes "positifs" et aucune expression des 4 gènes "négatifs"), P2 (groupes "AB" et "BA", correspondant respectivement à A pos + B neg ou B pos + A neg) et P3 (ou «BB», associé au moins bon pronostic, défini par l'expression de 0 ou 1 des quatre gènes positivement associés au pronostic et par l'expression d'au moins 1 gène pronostic négatif). Les probabilités de survie des patients de trois groupes ont été comparées en utilisant un test du logrank. Les patients appartenant au groupe dont le pronostic est le moins bon («P3» ou BB) ont été isolés car leur probabilité de survie est nettement plus faible que celle des trois autres groupes de patients ensemble (P1+P2).

Afin d'examiner le pouvoir discriminant des 8 gènes en combinaison avec les autres paramètres pouvant influencer le pronostic des LAL et le résultat du traitement, nous avons également appliqué notre algorithme pronostic sur des sous-groupes de patients définis en fonction des autres paramètres pronostics. Le taux de survie global à 5 ans a en outre été modélisé à l'aide d'une analyse « multivariée » du risque proportionnel (selon le modèle de Cox). Ces analyses statistiques ont été réalisées en utilisant la version du logiciel R 2.10.0. Les variables explicatives considérées comprennent le sexe, le compte de leucocytes sanguins au diagnostic, la présence de blastes leucémiques

dans le système nerveux central (SNC), le statut de translocation MLL, la Maladie Résiduelle Minimale (MRD) au jour 29 du traitement, l'expression de CRLF2, ainsi que les classes pronostiques définies par notre combinaison de 8 gènes (P1 & 2 ou P3). L'hypothèse du risque proportionnel pour la variable d'exposition a été évaluée par le test statistique de Schoenfeld. Un seuil de 5% a été utilisé pour la signification statistique.

Analyse transcriptomique supervisée et détermination du profil d'expression des tumeurs agressives

Les gènes montrant des différences significatives d'expression entre les LAL de meilleur pronostic (P1&2) et les LAL dont le pronostic est le plus mauvais (P3) ont été identifiés à l'aide d'un test non apparié de Mann Withney (seuil $p < 0.01$) et un facteur de variation (fold change) > 1.5 . Une « heatmap » représentant les valeurs normalisées d'expression de ces gènes dans l'échelle de couleur indiquée (vert: faible expression; rouge: haute expression) a été obtenue en utilisant le logiciel libre d'accès permutMatrix (version 1.9.3).

Analyse fonctionnelle du GSEA (« Gene Set Enrichment Analysis »)

La liste complète des sondes des gènes représentés sur le microarray "Affymetrix.GeneChip.HG - U133_Plus_2", associée aux facteurs de variation correspondant à leur expression différentielle entre les LAL P3 et les LAL P1&2 a été utilisée pour une analyse « preranked » avec GSEA, visant à rechercher systématiquement les listes de gènes (gene sets) provenant de la base de données du Broad Institute MSigDB (signatures moléculaires base de données: <http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>), présentant un chevauchement significatif avec les gènes différentiellement exprimés entre les LAL P3 et P1&2.

Patients atteints de LAL de notre série et protocole d'induction thérapeutique

Un total de 31 de patients adultes atteints d'une LAL a été inclu dans une étude prospective entre Décembre 2010 et Juin 2013. Le diagnostic et la classification ont été réalisés selon les critères de l'OMS (Organisation mondiale de la santé) de 2001 (disponibles dans (Jaffe et al. 2001)), comprenant une proportion de lymphoblastes dans la moelle osseuse >25% et des caractéristiques spécifiques morphologiques, immunophénotypiques et cytogénétiques. Des analyses moléculaires ont également été réalisées (voir Tableau S1 pour plus de détails).

Tous les patients ont reçu une chimiothérapie d'induction CALGB modifiée (protocole VDLCB) (Larson et al. 1995; Mi et al. 2012b) administrée sur une période de 4 semaines comprenant:

- V : 1.4mg/m² de Vincristine, jusqu'à 2 mg par dose, par voie intraveineuse, une fois par semaine pendant 4 semaines
- D: 60mg/m² de Daunorubicine ou 8-10mg/m² de Idarubicine, du 1^{er} au 3^{ème} jour.
- C: Cyclophosphamide 750mg/m², le 1^{er} et le 14^{ème} jour.
- P: 60mg/m²/jour de Prednisone, du 1^{er} au 21^{ème} jour
- L- asparaginase : 6000 IU/m², tous les 2 jours a été ajouté du 8^{ème} au 16^{ème} jour.

Un échec d'induction est défini comme la persistance des blastes leucémiques dans la moelle osseuse (moelle avec plus de 5 % de blastes) ou la présence de blastes leucémiques dans un site extra-médullaire à la fin du traitement d'induction. Une rémission complète est définie par un taux de blastes

médullaires < 5 % et une moelle osseuse cellulaire normale avec présence des trois lignées l'hématopoïétiques.

La mesure de la maladie résiduelle (MRD) (Pui and Evans 2006) a été réalisée par cytométrie de flux en huit couleurs, comme décrit en détail dans (Weng et al. 2013).

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'hôpital Ruijin de Shanghai. Tous les patients ont donné leur consentement éclairé à la fois pour le traitement et la cryopréservation des échantillons de sang périphérique et de leur moelle osseuse (BM) conformément à la Déclaration d'Helsinki.

Détection par RT-qPCR de l'expression aberrante des 8 gènes à partir de l'ARN des échantillons des patients adultes atteints de LAL

Les ARN ont été extraits à partir des échantillons de moelle osseuse en utilisant les colonnes du kit «NucleoSpin RNA II» (Macherey -NAGEL, ref740955), dont les étapes comprennent une digestion par la DNase pendant 20 min, solubilisés dans 35 ul de DEPC/H₂O, et la concentration a été évaluée en utilisant un Nanodrop. Un ug d'ARN total (selon disponibilité) est utilisé pour une « reverse transcription » (RT) dans un volume final de 20 ul avec le kit "SuperScript III First Strand Synthesis" (Invitrogen, ref11752250). Pour les contrôles "NO RT", le même volume a été ajouté à l'ARN sans l'enzyme transcriptase inverse. Dans chaque réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR), 5 ul d'une dilution au 1/50^e du produit de RT ont été mélangés avec 10 ul de "Brilliant III Ultra rapide SYBR Green QPCR Master Mix" (AGILENT, ref 600883) et 150 nM de chaque amorce (les séquences d'amorces sont répertoriés dans le Tableau S2) dans un volume final de 20 ul. La qPCR est réalisée sur un appareil Mx3000P Stratagene dans des plaques à 96 puits comme suit: dénaturation de 3 min à 95°C, suivie de 40 cycles de 20s à 95°C et 20s à 60°C, enfin suivie d'un dernier cycle de 20s à 95°C, 10s à 60°C et 20s à 95°C (afin d'obtenir la courbe de dissociation). Chaque

expérience a été réalisée en double et comprenait des échantillons « RT » et « no RT ». Pour chaque paire d'amorces le coefficient d'efficacité a été calculé sur la base Ct obtenues à différentes concentrations d'ARN du testicule (car les 8 gènes ont une expression maximale dans les cellules germinales mâles) et les courbes de dissociation ont été vérifiées. Quand l'expérience « NO RT » était satisfaisante ($Ct \geq 36$), nous avons calculé la valeur moyenne des Ct des réplicats « RT » de chaque expérience (dans toutes nos expériences les duplicats avaient moins de 0.5 Ct d'écart), puis calculé une valeur d'expression selon la formule suivante : $(2^{(Ct \text{ du gène d'intérêt dans les testicules} - Ct \text{ du gène d'intérêt dans l'échantillon})} / (2^{(Ct \text{ moyen des 4 gènes contrôles dans les testicules} - Ct \text{ moyen des 4 gènes contrôles de l'échantillon})})$, que nous avons exprimé par le rapport d'expression par rapport au testicule. Les quatre gènes de contrôle étaient actine, U6, RELA et AUP1. Sept échantillons de moelles osseuses normales et 3 échantillons de sang de cordon ont été utilisés pour déterminer un seuil d'expression aberrante (correspondant à la valeur de l'expression moyenne + 2 écarts-types de ces 10 échantillons). Un gène a été considéré exprimé positivement lorsque sa valeur d'expression était au-dessus de ce seuil.

RÉSULTATS

Recherche de gènes transcriptionnellement silencieux dans la moelle osseuse normale et activés de manière ectopique dans les LAL de l'enfant

Partant de l'hypothèse que la dérégulation génétique et épigénétique lymphoblastes leucémiques conduit à l'expression ectopique de gènes normalement silencieux et que l'expression aberrante d'un sous-groupe de ces gènes puisse jouer un rôle direct dans l'oncogenèse, nous avons conçu une approche tout d'abord pour identifier les gènes qui ne sont jamais exprimés dans la moelle osseuse normale ou du sang périphérique normal puis, dans une deuxième étape, pour déterminer leur expression dans les lymphoblastes des LAL.

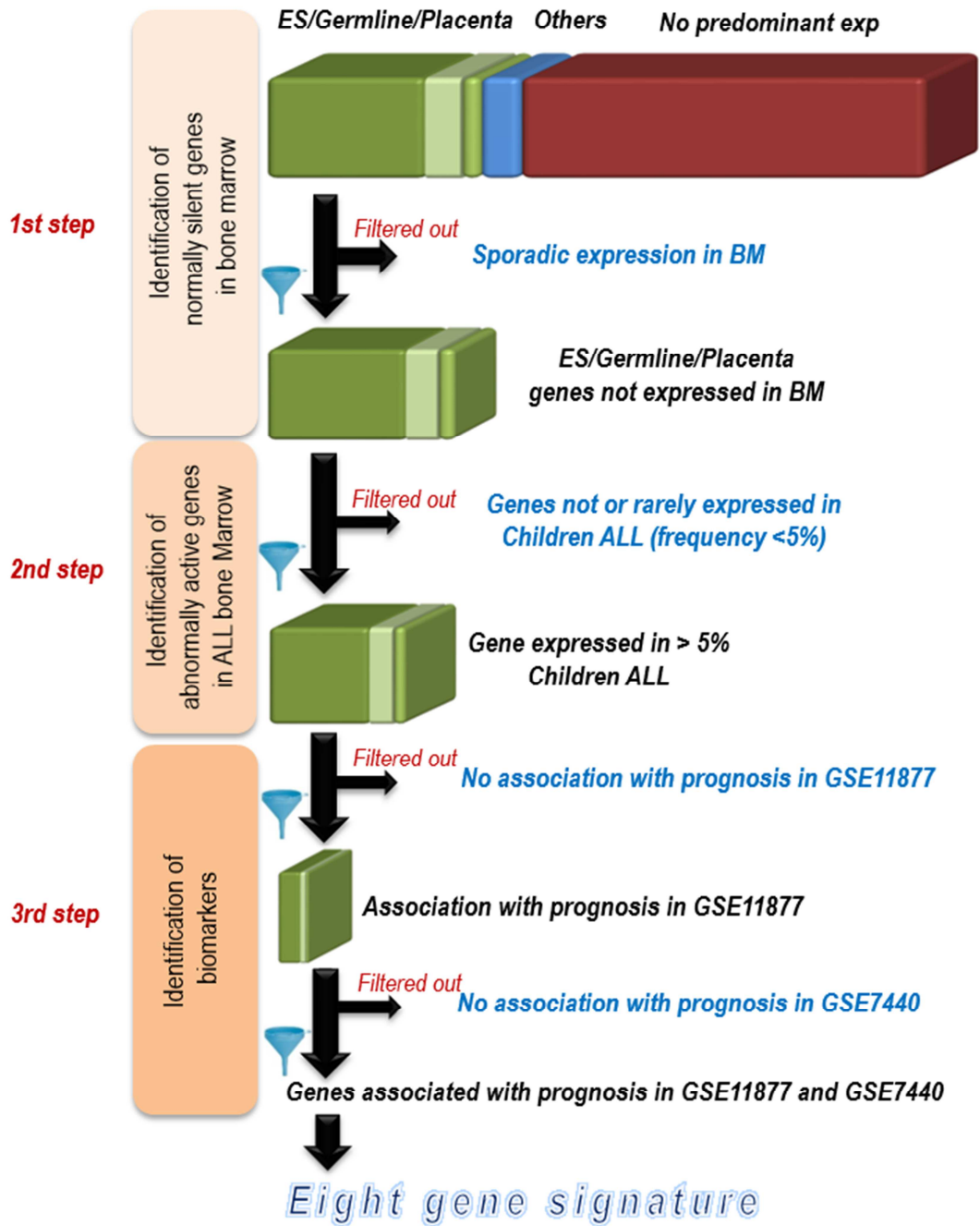
Une méta-analyse des données d'expression obtenues sur de grandes séries de tissus humains normaux a été réalisée afin d'établir une liste de gènes humains dont l'expression est prédominante dans certains tissus, ou restreinte à divers tissus, mais qui ne sont pas exprimés dans la moelle osseuse non-leucémique. Notre approche a consisté à utiliser des données transcriptomiques disponibles publiquement afin de comparer les profils d'expression de tous les gènes humains et de définir une liste de gènes dont l'expression est absente dans la moelle osseuse normale (Fig. 18 étape 1). Cette analyse a identifié 19 811 gènes ne présentant pas d'expression prédominante, qui ont été éliminés, car un grand nombre d'entre eux sont exprimés de manière ubiquitaire dans de nombreux tissus et n'ont donc aucune valeur dans notre stratégie. Les 12 437 gènes restants sont exprimés de manière prédominante dans un seul ou un nombre restreint de tissus, c'est-à-dire la lignée germinale, les cellules souches embryonnaires (cellules ES), le placenta, un tissu somatique (non germinal) adulte, avec peu ou pas

d'expression dans la plupart des tissus somatiques adultes. Sur la base de nos travaux précédents et des données de la littérature sur la contribution spécifique des gènes normalement exprimés dans les cellules embryonnaires souches, le placenta et les cellules germinales mâles dans l'oncogenèse (Rousseaux et al. 2013a; Rousseaux et al. 2013b), nous avons décidé de ne considérer que les gènes exprimés de manière prédominante dans ces types cellulaires particuliers (n=10 471). Parmi ces gènes, ceux que l'on a identifiés comme sporadiquement exprimés dans la moelle osseuse adulte normale ont été éliminés, laissant une liste de 7 244 gènes, que nous avons considérés comme normalement silencieux dans la moelle osseuse saine, et qui ont été utilisés pour les analyses ultérieures.

La deuxième étape a consisté en la recherche de l'activation ectopique des gènes de cette liste dans les échantillons de LAL. Pour ce faire, un seuil entre la non-expression et l'expression des gènes a dû être établi. En suivant une approche similaire à celle que nous avons développée pour la recherche des expressions ectopiques dans le cancer du poumon (Rousseaux et al. 2013a), nous avons considéré qu'un gène était exprimé lorsque la valeur du signal correspondant était au-dessus d'un seuil égal à la moyenne + 3 écarts-types des valeurs d'expression obtenues dans un panel de 112 tissus adultes normaux. Nous avons criblé les données transcriptomiques des enfants atteints de LAL (de l'étude référencée dans GEO GSE11877 (Harvey et al. 2010; Kang et al. 2009)). Nous avons normalisées ces données simultanément avec les données transcriptomiques de tissus normaux obtenues dans la même technologie Affymetrix. Ceci nous a permis de définir la valeur seuil pour l'expression de chacun des 7 244 gènes normalement non exprimés dans la moelle osseuse, puis de rechercher systématiquement leur expression aberrante dans les LAL. Au total, 5 195 gènes ont été trouvés exprimés de manière aberrante dans les lymphoblastes provenant de sang ou de moelle osseuse d'au moins 5 % des cas pédiatriques de LAL dans cette

population de patients (Fig. 18 étape 2).

Fig18



Gene Symbol / ID	Nb+ in GSE11877 (n=207)	p-value GSE11877	HR GSE11877	Nb+ in GSE7440 (n=59)	GSE7440 p-value	GSE7440 HR
STAR04	20	0.025	2.49	16	0.037	2.42
FASTKD1	30	0.047	2.11	10	0.002	3.84
AK022211	38	0.017	2.26	6	0.002	4.47
BC038778	54	0.029	2.05	5	0.018	3.43
SH3RF3	34	0.015	0.13	14	0.056	0.27
PCGF6	115	0.001	0.34	29	0.008	0.3
CAMSAP1	71	0.009	0.33	25	0.028	0.34
PCDH15	77	0.032	0.44	14	0.04	0.24

Figure 18. Identification des 8 gènes dont l'expression ectopique dans la moelle osseuse des LAL pédiatriques est associée au pronostic

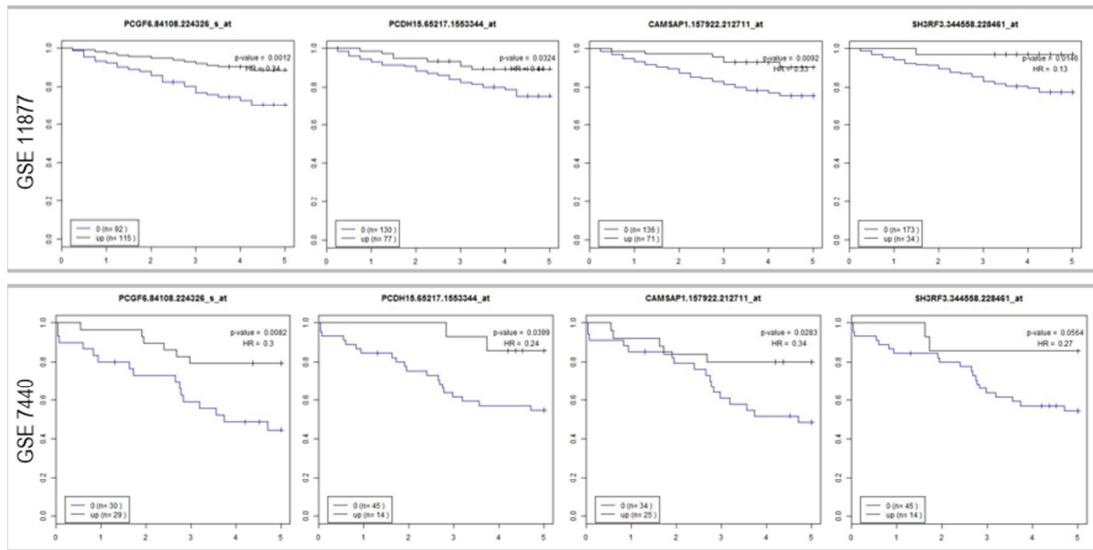
1^{er} étape : identification des gènes normalement silencieux dans la moelle osseuse ; la prédominance de l'expression a été définie en fonction de la distribution des expressions dans un grand nombre de tissus humains normaux (qui se trouvent sur le site GEO : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) : références GSE3526 pour les tissus adultes, GSE7434, 9994 et 18809 pour le placenta, GSE11350 pour les cellules souches embryonnaires (cellules ES) et les cellules germinales mâles). Un gène est considéré exprimé de manière prédominante dans un tissu lorsque son niveau d'expression dans ce tissu est au-dessus de l'expression moyenne dans tous les tissus + 3 écarts-types. Utilisant 73 échantillons de moelle osseuse non-leucémiques (GSE13204), les gènes présentant une expression dans certains échantillons de moelle osseuse non-leucémiques ont été éliminés (gris) ; **2^{em} étape : sélection des gènes exprimés dans >5 % des LAL de l'enfant** (selon l'étude publiée par (Kang et al. 2009), référence GEO GSE11877) ; **3^{em} étape : sélection de gènes associés au pronostic**, en utilisant des données transcriptomiques disponibles pour les LAL pédiatriques associées aux données de survie (GSE11877 et GSE7440 ; (Bhojwani et al. 2008)).

Dans les LAL de l'enfant, l'expression ectopique de 8 gènes est significativement associée au pronostic

Nous avons ensuite exploré la signification clinique potentielle de ces gènes activés de manière ectopique. Dans ce but, nous avons utilisé les données de suivi disponibles dans deux séries de LAL de l'enfant. Pour chacun des gènes exprimés dans plus de 5 % des cas d'enfants atteints de LAL dans la première série (GSE11877), nous avons comparé les probabilités de survie entre les patients dont les lymphoblastes exprimaient le gène et les patients dont les lymphoblastes ne l'exprimaient pas. Considérant cette première série de patients, nous avons trouvé une association significative entre l'expression ectopique de 91 gènes avec pronostic favorable alors que l'expression d'un autre groupe de 130 gènes était significativement associée à une probabilité de survie plus courte (Fig. 18 étape 3). Toutefois, seuls les gènes pour lesquels la même association avec le pronostic a été confirmée avec

significativité statistique dans une deuxième série de patients atteints de LAL (à partir de GSE7440 ; (Bhojwani et al. 2008)) ont été retenus. Finalement 8 gènes satisfaisant ces critères ont été sélectionnés (Fig. 19). Ceux-ci comprennent 4 gènes dont l'activation aberrante est significativement associée à une probabilité de survie à long terme plus élevée et 4 autres gènes dont l'expression est associée à une survie significativement réduite (Tableau S3).

Fig. 19
A



B

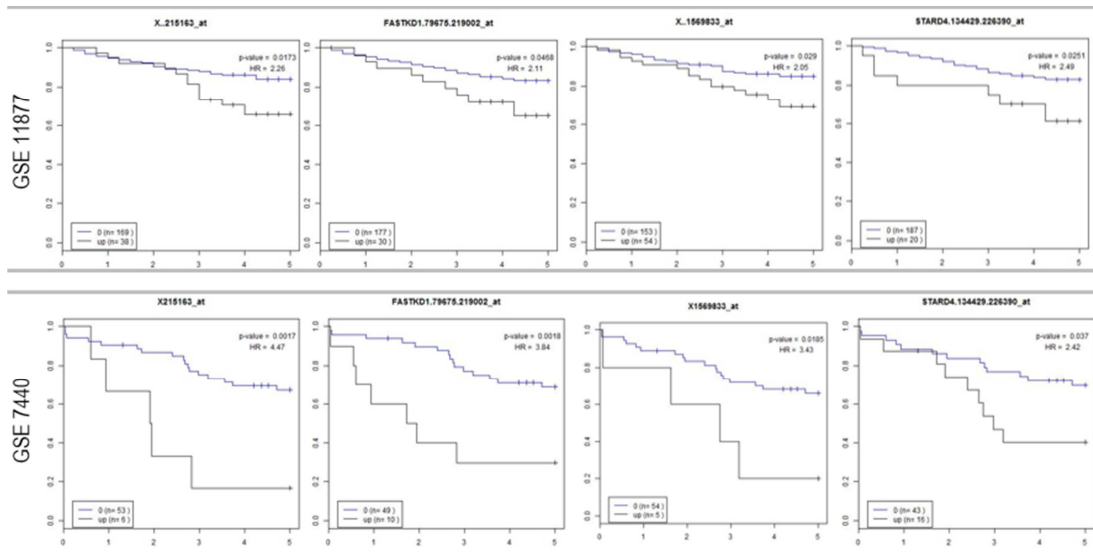


Figure 19. L'expression ectopique de 8 gènes spécifiques de tissu (de la lignée germinale ou cellules ES ou placenta) est associée au pronostic des enfants atteints de LAL de deux études (GSE11877 & GSE7440), avec une survie globale significativement plus longue (A) ou plus courte (B).

Pour chaque gène, l'estimation cumulée de la survie globale selon Kaplan Meyer (axe des ordonnées) est représentée en fonction du temps sur cinq ans (en mois ; axe des abscisses). Les probabilités de survie sont comparées entre les patients classés en deux groupes selon l'expression ectopique du gène dans le sang ou la moelle osseuse (gène non exprimé: courbe bleue; gène exprimé: courbe noire).

Les combinaisons de gènes dont l'expression ectopique est associée à des différences significatives en termes de probabilités de survie ont conduit à la mise en place d'un outil de classification de pronostic pour les LAL de l'enfance

Les 8 gènes sélectionnés ont ensuite été utilisés en combinaisons successivement dans les deux séries de patients atteints de LAL de l'enfance (GSE11877 et GSE7440).

Nous avons d'abord classé les patients en fonction du nombre total d'expressions parmi les 4 gènes dont l'expression ectopique (détectée dans les lymphoblastes de la moelle osseuse ou du sang périphérique) est associée à un pronostic favorable et comparé les probabilités de survie. La Fig. 20A (panneau de gauche) montre clairement une augmentation de la probabilité de survie en fonction du nombre croissant de gènes exprimés. Les patients ont été classés en deux sous-groupes définis en fonction de l'expression de ces 4 gènes qui affectent positivement leur pronostic (Fig. 20A : panneau de droite) : les patients exprimant 2 ou plus des 4 gènes ont été assignés au groupe « A pos », avec le pronostic le plus favorable, alors que les patients n'exprimant aucun ou un seul de ces gènes (groupe « B pos ») ont une probabilité de survie réduite.

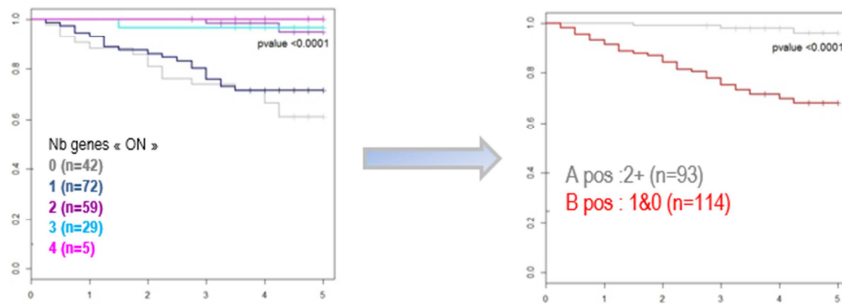
Une approche similaire utilisant les 4 gènes dont l'expression ectopique est associée à un mauvais pronostic a montré que les patients n'exprimant aucun des 4 gènes avaient une probabilité de survie plus élevée que les patients exprimant un ou plusieurs de ces gènes (Fig. 20B : panneau de gauche). Les patients ont également été classés en deux sous-groupes définis en fonction de l'expression de ces 4 gènes qui affectent négativement leur pronostic (Fig. 20B : panneau de droite) : les patients dont les lymphoblastes n'expriment aucun de ces 4 gènes, avec le meilleur pronostic, ont été assignés au groupe

« A neg », et ceux dont les lymphoblastes expriment au moins un des quatre gènes ont été assignés au groupe « B neg » de pronostic défavorable.

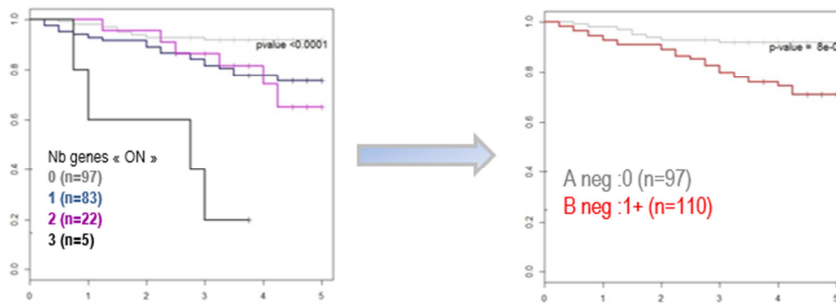
Les patients ont enfin été classés en utilisant les deux combinaisons de 4 et 4 gènes, associés respectivement au bon et au faible taux de survie, et les probabilités de survie des quatre différents groupes ont été comparées (Fig. 20C : panneau de gauche). Comme attendu, les patients dont les lymphoblastes expriment 2 ou plus des 4 gènes positivement associés à une bonne survie et aucun des gènes associés à un mauvais pronostic, ont une durée moyenne de survie longue (« AA » ou groupe « P1 »). A l'opposé, les 68 patients exprimant au moins un des gènes de mauvais pronostic et exprimant également aucun ou un seul des gènes de bon pronostic (« BB ») ont une survie moyenne nettement plus courte que les autres patients, suggérant que leur LAL est agressive et ne répond pas favorablement au traitement. Ces patients ont été assignés au groupe mauvais pronostic « P3 ». Les 46 patients restants dans le groupe intermédiaire, « P2 » (englobant les patients « AB » et « BA »), présentent une probabilité de survie peu différente de celle des patients P1 et par conséquent les patients P1 et P2 ont tous été finalement assignés à un groupe « P1&2 » de pronostic favorable.

Fig. 20

A: GSE11877 : 4 genes Pc+ : ectopic expression associated with good prognosis



B: GSE11877 : 4 genes Pc- : ectopic expression associated with poor prognosis



C GSE11877 : combination of 4 genes Pc+ and 4 genes Pc-

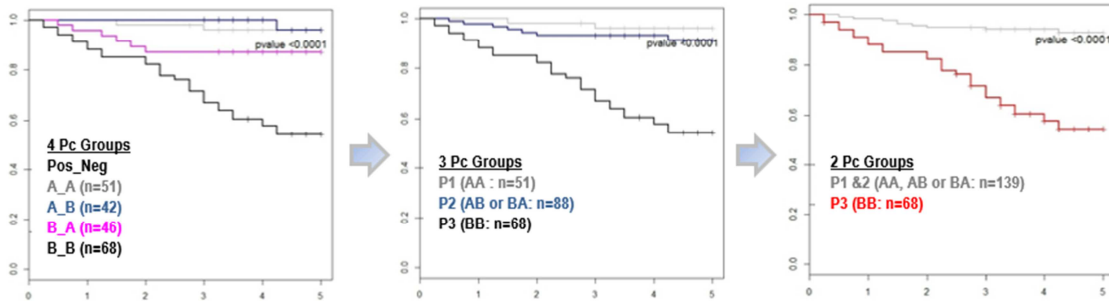
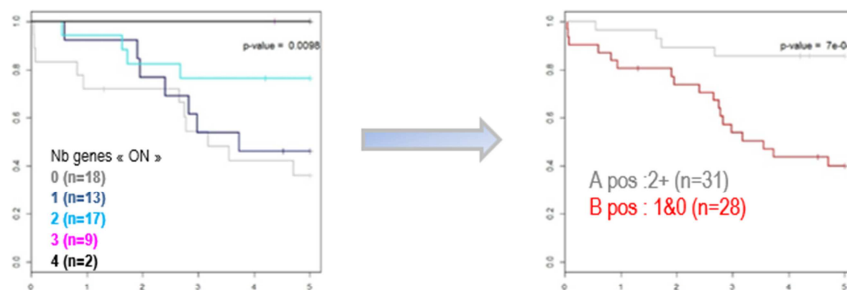
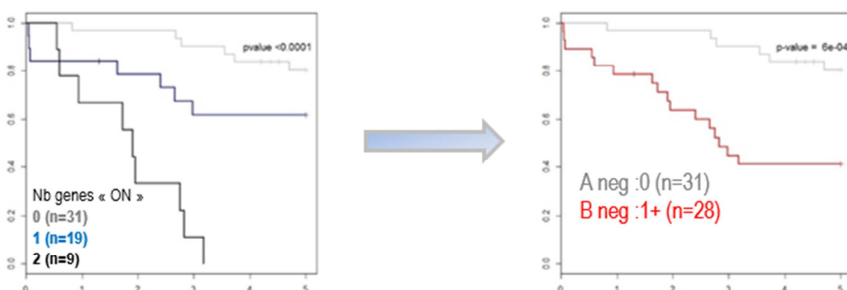


Fig 20 (foll.)

D:GSE7440 : 4 genes Pc+ : ectopic expression associated with good prognosis



E: GSE7440 : 4 genes Pc- : ectopic expression associated with poor prognosis



F: GSE7440 : combination of 4 genes Pc+ and 4 genes Pc-

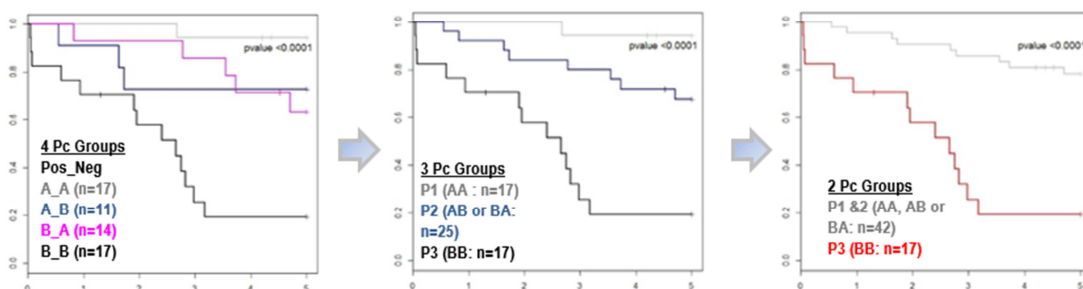


Figure 20. Définition d'une méthode de classification pour la prédiction du pronostic chez les enfants atteints de LAL utilisant les expressions ectopiques de diverses combinaisons des 8 gènes, positivement ou négativement corrélés avec la probabilité de survie, et identification d'un sous-groupes de LAL agressives (AC: GSE11877, DF: GSE7440) ; A et D: estimation cumulée de la survie globale selon Kaplan Meyer comparant les groupes de patients classés selon le nombre d'expressions ectopiques des 4 gènes associés à un « bon » pronostic (panneau de gauche), ou en deux groupes, " A pos " (au moins 2 gènes exprimés , courbe grise) ou "B pos" (un seul ou aucun gène exprimé, courbe rouge), B et E : estimation cumulée de la survie globale selon Kaplan Meyer comparant les groupes de patients classés selon le nombre d'expressions ectopiques des 4 gènes associés à un « mauvais » pronostic (panneau de gauche), ou en deux groupes, " A neg " (pas d'expression,

courbe grise) ou " B neg " (au moins un gène exprimé, courbe rouge), le groupe A correspond aux patients ayant des probabilités de survie les plus élevées, et le groupe B aux patients ayant la plus faible probabilité de survie. C et F: estimation cumulée de la survie globale selon Kaplan Meyer comparant les groupes de patients classés en quatre groupes (à gauche), trois groupes (au centre) et deux groupes (panneau de droite) selon les expressions ectopiques des deux sous-ensembles de 4 gènes respectivement associés au bon ou au mauvais pronostic.

Cette approche a conduit à la définition d'un groupe de 8 gènes que nous avons utilisé pour une classification pronostique des patients atteints de LAL de l'enfance, et à l'identification de 68 cas (32 %) de LAL de cette 1^{ère} série (GSE11877) ayant une probabilité de survie significativement réduite (Figure 21). Le même algorithme utilisant les 8 gènes a été utilisé pour classer les patients d'une 2^{ème} population d'enfants atteints de LAL (GSE7440), ce qui a confirmé le potentiel de cette combinaison de gènes pour identifier les LAL agressives, correspondant à 17 cas (28 %) dans cette 2^{ème} série de patients (Fig. 20 D-F).

Fig 21

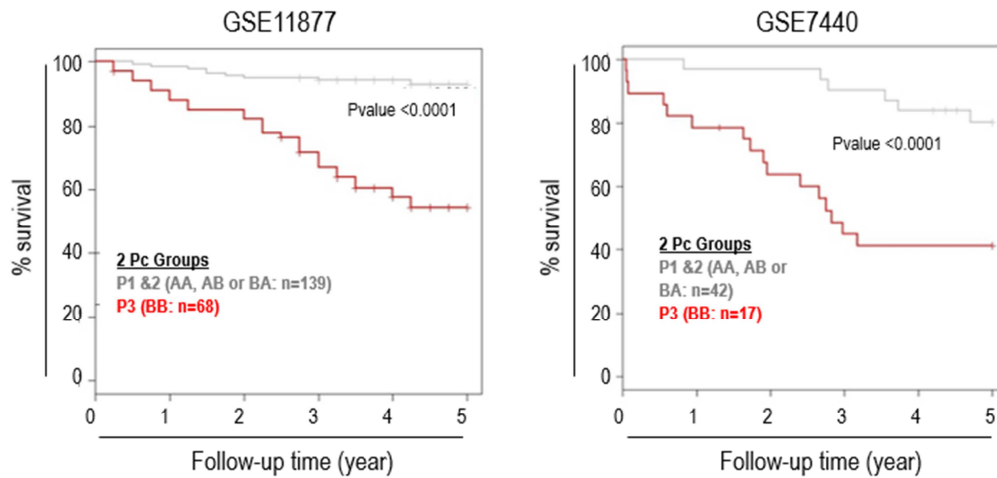


Figure 21. Estimations de la survie cumulée globale par Kaplan Meyer, comparant les patients LAL de GSE11877 (panneau de gauche) et de GSE7440 (à droite) après classification finale utilisant l’algorithme des 8 gènes. Les patients P3 sont ceux dont les lymphoblastes expriment au moins un des quatre gènes corrélés négativement avec le pronostic et aucun ou un seul des gènes associés positivement au pronostic. Tous les autres patients ont été regroupés dans le groupe pronostique P1&2.

Notre outil de classification à 8 gènes apporte une précision supplémentaire à celle des facteurs connus pour être associés au pronostic des LAL

En comparant la distribution de nos groupes pronostic avec les données cliniques et de laboratoire des enfants atteints de LAL de la série GSE11877, nous avons constaté que les LAL agressives (P3) sont enrichies en certaines, mais pas toutes, les catégories de LAL à haut risque. Plusieurs des facteurs qui ont été décrits précédemment comme étant associés à un mauvais pronostic chez les patients atteints de LAL, incluant la présence de lymphoblastes dans le système nerveux central, le sexe, l’âge >10 ans ou des globules blancs >50 G au moment du diagnostic, ne sont pas associés à une survie plus courte dans cette série particulière de patients (Fig. 22).

Fig 22

Molecular/clinical classes not affecting prognosis in this series of childhood ALL patients (GSE11877)

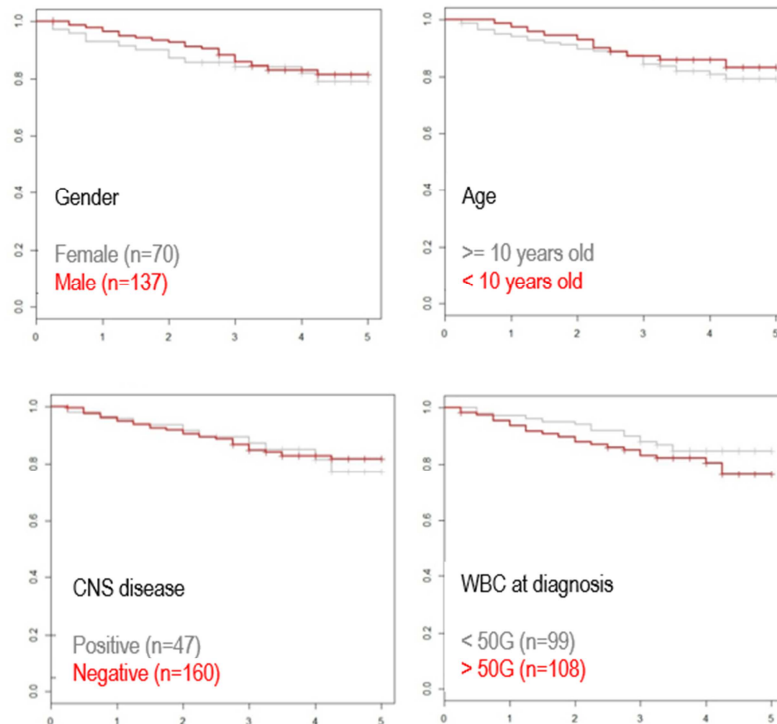


Figure 22. Classes moléculaires / cliniques sans incidence sur le pronostic des enfants atteints de LAL de cette série (GSE11877).

Cependant, d'autres paramètres cliniques et biologiques connus pour être associés à un mauvais pronostic, incluant la présence d'une translocation MLL (Fig. 23A), une maladie résiduelle minimale (MRD) positive au 29^{ème} du traitement d'induction (Fig. 23B), ou une surexpression du gène de CRLF2 (Fig. 23C), sont associés à une durée de survie moyenne plus courte dans cette étude (Fig 23A, B et C : panneaux en bas à gauche). De plus les cas de translocation MLL positive et de MRD positive sont enrichies en formes que nous avons classées « P3 », mais pas la surexpression de CRLF2 (Fig. 23A, B et C : histogrammes dans les panneaux en haut à gauche).

Dans une analyse univariée, nous avons évalué la valeur pronostique de notre nouvel algorithme de classification à 8 gènes par rapport à celui de ces autres

facteurs. Considérant chacun de ces facteurs (translocation MLL, MRD au jour 29 et surexpression de CRLF2), nous avons trouvé qu'au sein de chaque sous-groupe de patients pouvant être défini par l'un de ces paramètres, notre outil de classification à 8 gènes peut également séparer les patients en deux classes de pronostic significativement différent, et permet donc d'affiner le pronostic (Fig. 23 A, B et C : panneaux de droite). Par exemple, dans la série de patients GSE11877, le niveau d'expression de CRLF2 permet de séparer deux groupes de patients avec des probabilités de survie significativement différentes (Fig. 23C ; panneau en bas à gauche). Toutefois, chez les patients exprimant faiblement CRLF2 (n=160), nos gènes de classification permet d'isoler un sous-groupe de 51 patients avec une durée de survie moyenne significativement réduite, alors que chez les patients exprimant fortement CRLF2 (n=47), nos gènes permettent de distinguer deux groupes ayant des survies différentes (n=30 et n=17, respectivement) (Fig. 23C ; panneaux à droite). De plus, la délétion ou une mutation du gène *IKZF1*, un facteur également associé à un mauvais pronostic dans de nombreuses études, a déjà été identifiée chez 59 patients de la cohorte GSE11877 (Supp. Tableau S8 dans (Mullighan et al. 2009)). En classant ces 59 patients dans les groupes de pronostic utilisant nos 8 gènes, nous avons pu clairement isoler un groupe de patients avec un bon pronostic (32 patients, tous en vie après 5 ans), alors que moins de 40 % des 27 patients P3 ont survécu plus de 5 ans (Fig. 23D). Prises ensemble, ces données montrent que notre outil de classification à 8 gènes enrichit notre capacité de prévision pronostique. Cette observation est renforcée par une analyse multivariée du pronostic prenant en compte tous ces paramètres et notre système de classification à 8 gènes (Tableau S4), et illustrée par le « forest plot » présenté Fig. 23E.

Fig 23

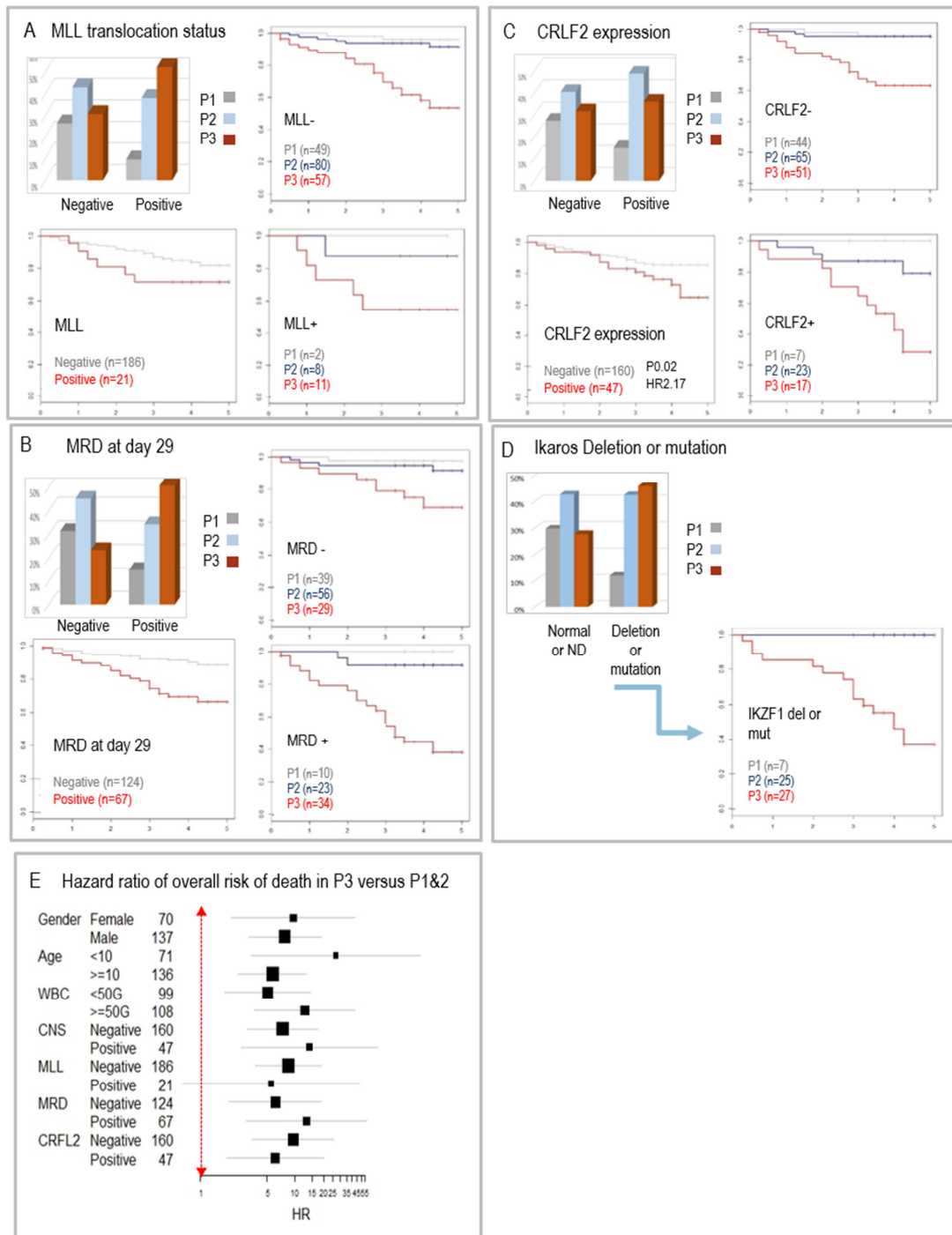


Figure 23. Groupes de pronostic et données biocliniques chez les enfants atteints de LAL (GSE11877) : A. Statut MLL ; B. Maladie résiduelle minimale au 29ème jour ; C. Expression de CRLF2 ; D. Délétion ou mutation du gène *IKAROS* ; en A, B et C, l'histogramme (en haut à gauche) montre les proportions respectives des trois groupes pronostiques P1, P2 et P3 chez les patients atteints de LAL positive ou négative pour la caractéristique moléculaire indiquée ; les courbes de survie de Kaplan-Meier comparent les probabilités de survie entre les patients en fonction de leur diagnostic moléculaire (panneau en bas à gauche), ou entre les trois

groupes de pronostic au sein des patients dont la LAL est négative (panneau en haut à droite) ou positive (panneau en bas à droite) pour la caractéristique moléculaire. E « **Forest plots** » montrant des « **hazard ratios** » (**HR**)(P3 versus P1&2 sur échelle logarithmique) pour le risque de décès à 5 ans. La ligne horizontale indique l'intervalle de confiance à 95 % pour les ratios ; la double flèche verticale en pointillé correspond à un HR de 1.

L'algorithme basé sur les 8 gènes permet de prédire la réponse au traitement inducteur des LAL chez l'adulte

Nous nous sommes demandé si cet algorithme de classification basé sur 8 gènes pouvait également être appliqué pour prévoir l'évolution de la LAL chez les patients adultes.

À l'aide d'une grande série de données transcriptomiques provenant de patients adultes atteints de LAL (disponible sur GEO : référence GSE13204) obtenues en utilisant la même technologie, le même algorithme basé sur les mêmes 8 gènes a été utilisé pour classer ces patients dans les groupes P1&2 d'une part et P3 d'autre part. Aucune donnée de survie n'est disponible pour cette série de LAL adultes, mais des informations utiles ont été fournies au sujet de leurs sous-types moléculaires. Nous avons mesuré l'enrichissement des différents sous-groupes moléculaires de ces cas de LAL adultes dans nos deux groupes pronostic, P1&2 et P3 respectivement, obtenus avec nos 8 gènes. Or nous savons, du fait d'études antérieures (Chen et al. 2012; Mi et al. 2012a; Mi et al. 2012b), que ces sous-groupes moléculaires de LAL sont associés à des sévérités et pronostics différents. Comme le montre la Fig. 24A, la distribution des patients dans les groupes P1&2 et P3 montre une bonne co-ségrégation des groupes P3 avec les sous-types de LAL dites « à haut risque » (dont le pronostic est plus pessimiste ; voir aussi Tableau S5). En effet, les patients présentant un risque élevé de LAL, comme ceux avec MLL ou translocation t(9;22), ont été préférentiellement assignés à notre groupe

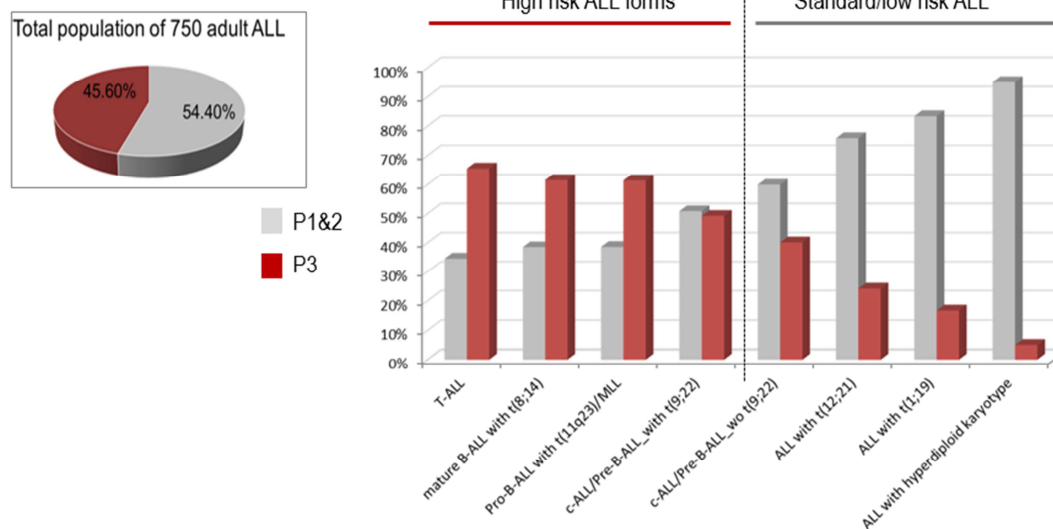
« P3 » défini par les 8 gènes, tandis que les patients avec des formes moléculaires de LAL de pronostic plus favorable (LAL standard ou à faible risque), tels que les LAL avec ETV6/RUNX1 ou un caryotype hyperdiploïde, sont le plus souvent classés « P1&2 ».

Ensuite, utilisant la RT-PCR quantitative pour détecter l'expression aberrante des 8 gènes au moment du diagnostic chez 31 patients adultes atteints de LAL nous avons testé l'outil pronostic dans le cadre d'une analyse prospective. Ce travail a confirmé que nos 8 gènes peuvent aider à prédire la réponse au traitement d'induction conventionnel (vincristine / daunorubicine / cyclophosphamide / prednisone / L-asparaginase administrée sur une période de 4 semaines) dans cette série de 31 adultes atteints de LAL (données cliniques détaillées dans le Tableau S1). L'ARN a été préparé à partir des cellules de moelle osseuse de ces patients au moment du diagnostic et l'expression des 8 gènes pronostic a été détectée par RT-PCR quantitative (amorces listées dans le Tableau S2). Suivant exactement le même algorithme, ces patients ont été assignés aux groupes P1&2 ou P3 (Tableau S1). La réponse au traitement d'induction a été évaluée par la quantification des lymphoblastes leucémiques dans la moelle osseuse et la maladie résiduelle minimale (MRD), quantifiée au 29^{ème} jour de traitement par cytométrie en flux à huit couleurs. Tous sauf un des 17 patients qui n'ont pas répondu au traitement ont été correctement assignés au groupe P3, alors que 7 des 14 patients présentant une rémission complète après induction ont été assignés au groupe pronostique P1&2 (Fig 24B). Les 7 autres patients répondeurs ont cependant été assignés au groupe des LAL agressives P3. Parmi ces derniers, 3 sont des LAL-T, une forme particulièrement agressive de LAL, tandis que les 4 autres sont des LAL-B sans translocation BCR-ABL. Les données de survie à long terme de ces patients n'étant pas encore disponibles (voir discussions pour plus de détails), nous n'avons pas pu évaluer la

corrélation entre nos groupes pronostic et la survie à long terme.

Fig 24

A



B

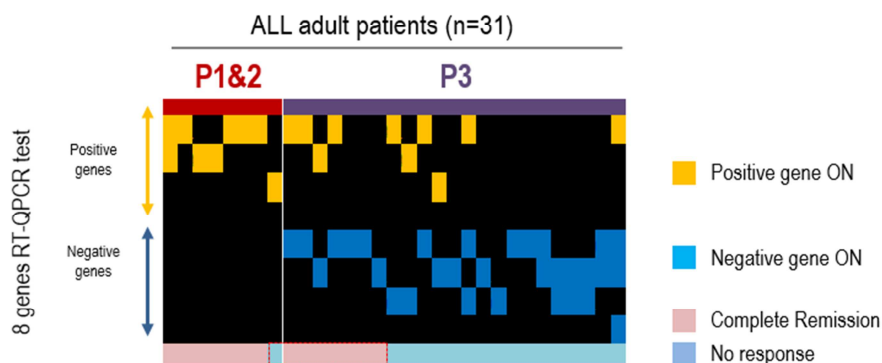


Figure 24. L'expression ectopique de ces mêmes 8 gènes peut également établir un pronostic chez les LAL chez l'adulte ; A. Le groupe « P3 » groupe de LAL chez l'adulte correspond également aux sous-types moléculaires agressifs connus de LAL chez l'adulte. B. La détection par RT-PCR quantitative de l'expression aberrante des 8 gènes aide à prédire la réponse à un protocole d'induction chez patients adultes atteints de LAL ; Heatmap illustrant la classification des patients atteints de LAL (axe des abscisses) dans les groupes P1&2 ou P3, à l'aide de notre test de RT-PCR quantitative, détectant l'expression ectopique dans la moelle osseuse des 8 gènes (axe des ordonnées), comprenant les 4 gènes associés au bon pronostic (durée de survie plus longue) et les 4 gènes associés au mauvais pronostic (durée de survie réduite). La réponse du patient à la thérapie

d'induction est indiquée en dessous de la « heatmap ». L'échec d'induction (aucune réponse) a été défini comme la persistance de lymphoblastes leucémiques dans la moelle osseuse (moelle osseuse avec $\geq 5\%$ de lymphoblastes) ou la présence de lymphoblastes leucémiques dans un site extramédullaire à la fin de la thérapie d'induction. La rémission complète a été définie par $<5\%$ de lymphoblastes dans la moelle osseuse, et une moelle osseuse normale contenant les trois lignées hématopoïétiques.

Le profil d'expression de gènes des LAL agressives de l'enfant recouvre partiellement celui des LAL classées P3 chez l'adulte

Notre capacité à prédire précisément l'issue de la LAL de l'enfance, indépendamment des autres paramètres pronostiques (dans GSE11877), nous a permis d'effectuer une analyse transcriptomique supervisée et ainsi d'identifier les gènes exprimés de manière différentielle entre les 68 cas de LAL associés à un pronostic défavorable (P3) et les autres cas de LAL ayant un meilleur pronostic (P1&2). Cette analyse, qui prend en compte tous les gènes humains représentés sur la puce Affymetrix 54K, a montré que 1 414 gènes ont une expression augmentée et 234 une expression diminuée dans les LAL agressives (classées P3) par rapport aux LAL de bon pronostic (classées P1&2) (Mann-Whitney non apparié $p < 0.05$; amplitude absolue des variations (« fold change ») > 1.2). Ce profil d'expression caractéristique des formes P3 de LAL est représenté Fig. 25A. Toutefois, un sous-ensemble de patients P1&2 présente un profil d'expression génique très similaire à celui des LAL P3 (Fig. 25A : rectangle rouge). Fait intéressant, la probabilité de survie des patients du groupe correspondant à ce profil « type P3 » est proche de celle des patients P1&2 (Fig. 25B), démontrant en premier lieu que ces patients ont été correctement assignés au bon groupe de pronostic par notre algorithme de classification à 8 gènes et, en deuxième lieu, que le profil d'expression génique P3 ne suffit pas pour définir l'agressivité de la LAL.

Bien que les LAL pédiatriques et celles de l'adulte soient considérées comme des entités différentes (Chen et al. 2012), nous avons observé que le profil

transcriptomique global (c'est-à-dire les 1 414 et 234 gènes respectivement régulés à la hausse à la baisse dans les LAL P3 par rapport aux P1&2), caractéristique des LAL agressives chez l'enfant, chevauche partiellement le profil transcriptomique global correspondant aux LAL chez l'adulte, classés « P3 » à l'aide de la même combinaison de 8 gènes (Fig. 25C).

Afin d'approfondir notre compréhension de la signification biologique de ces résultats et de mettre en évidence les caractéristiques spécifiques du sous-groupe de LAL agressives identifié ici, nous avons exploré les données fonctionnelles, y compris les fonctions ontologiques des gènes enrichis ou appauvris, et les chevauchements avec des profils d'expression génique rencontrés dans des situations physiologiques ou d'autres conditions pathologiques. Nous avons effectué une analyse par la méthode « Gene Set Enrichment Analysis » (GSEA) sur les collections de sets de gènes mis à disposition par le Broad Institute. De cette analyse, nous avons constaté que les formes de LAL avec un mauvais pronostic, que nous avons identifiées comme « P3 » chez l'enfant et chez l'adulte, activent un groupe de gènes qui chevauchent de manière significative le profil d'expression génique des cellules souches hématopoïétiques (cellules CD133+, (Jaatinen et al. 2006)), alors que la plupart des gènes impliqués dans la prolifération et les fonctions relatives au cycle cellulaire, notamment ceux associés à la capacité de prolifération des cellules souches embryonnaires, étaient régulés à la baisse (Ben-Porath et al. 2008; Wong et al. 2008), comme illustré en Fig. 25D. Ces LAL agressives pourraient donc avoir acquis des propriétés de cellules semblables aux cellules souches pluripotentes qui ne se divisent pas.

Fig 25

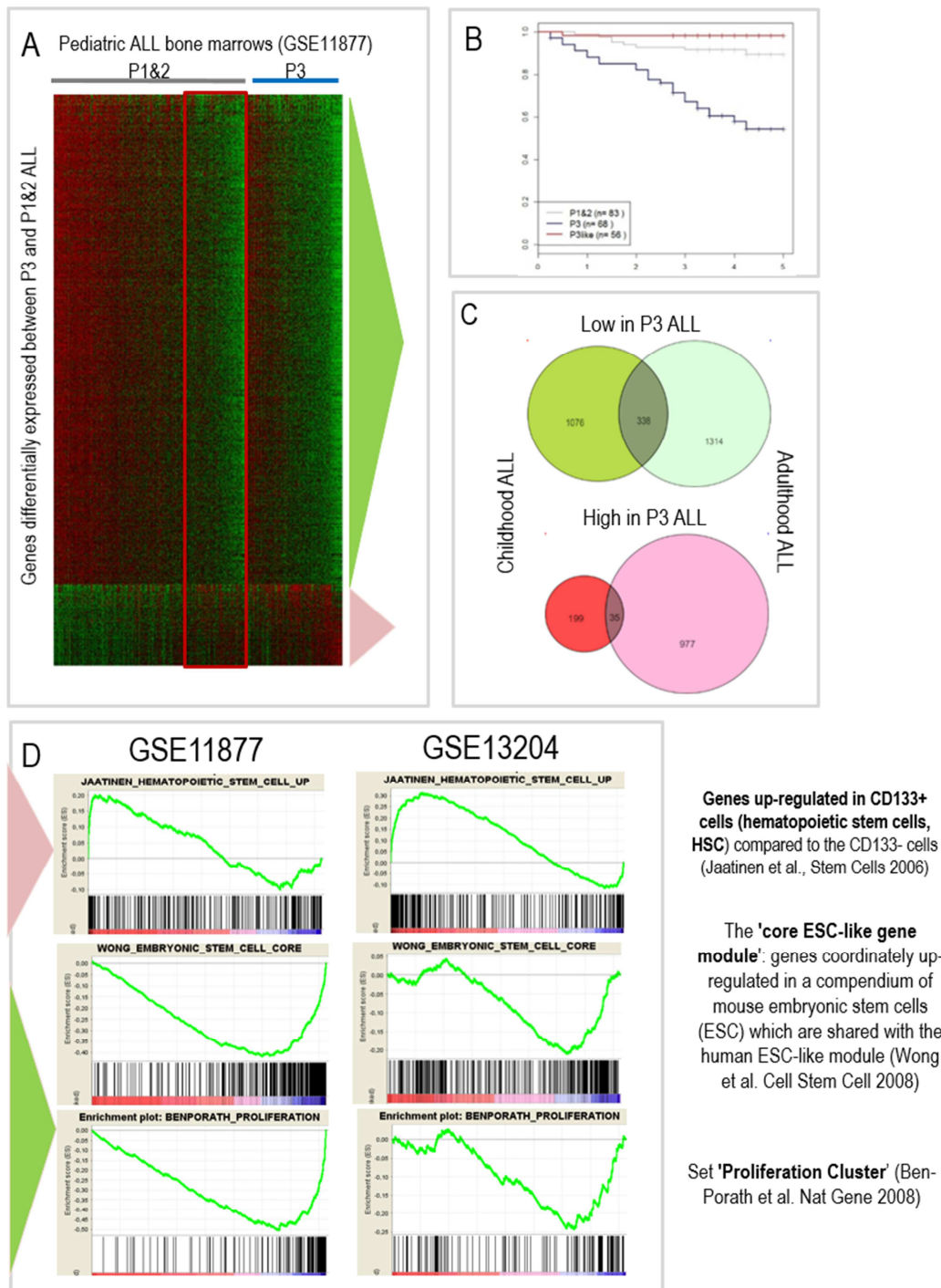


Figure 25. Le profil d'expression génique et l'analyse fonctionnelle caractérisant le groupe « P3 » des LAL agressives chez les enfants (GSE11877), chevauche celui des LAL de l'adulte; A. Heatmap montrant les gènes dont l'expression est significativement diminuée (partie supérieure de la heatmap) ou augmentée (partie inférieure de la heatmap) dans les lymphoblastes des LAL P3, comparé aux LAL P1&2 chez l'enfant. Les faibles et hauts niveaux d'expression sont représentés sur une échelle allant du vert au rouge. **B. Pronostic des LAL « P3-Like»** par rapport aux autres LAL P1&P2 et P3. **C. Chevauchements entre les**

profils d'expression génique des LAL de l'enfant et de l'adulte (de GSE13204) assignées à la catégorie agressive P3 en utilisant le même algorithme de classification à 8 gènes. **D. Gene Sets Enrichment Analysis (GSEA)** du profil d'expression génique des LAL agressives chez les enfants (GSE11877) et chez les patients adultes (GSE13204) montrant un chevauchement très significatif entre les gènes surexprimés dans les LAL P3 agressives et les cellules souches hématopoïétiques (CD133+) (panneaux en haut ;(Jaatinen et al. 2006))mais une diminution de l'expression de plusieurs gènes, caractérisation des cellules souches embryonnaires (CSE) (panneaux au centre ; (Wong et al. 2008)) y compris les gènes associés au cycle et à la prolifération cellulaire (illustrés dans les panneaux inférieurs ; (Ben-Porath et al. 2008)).

Tableaux S1 a S5

ID	AGE	SEX	WBC counts(x10 ⁹)	Immunophenotype	t(9;22)/BCR-ABL	blast infiltration in BM	MRD Day 29	induction response (CR=early response; NR= no response)	8 genes prognostic class	pos_CAMSAP17	pos_PCDH157	pos_PCGF67	pos_SHR3F37	neg_AK0222117	neg_ENSG000002454797	neg_FASTKD17	neg_STARTD47
ALL 3	40	F	31,5	B-ALL	negative	0,916	positive, 0.22%	CR	P1	0	0	1	1	0	0	0	0
ALL 2	17	M	3,8	B-ALL	negative	0,944	negative,<0.01%	CR	P2	0	0	1	0	0	0	0	0
ALL 63	18	M	61,9	B-ALL	negative	0,963	negative,<0.01%	CR	P2	0	0	0	1	0	0	0	0
ALL 6	38	M	41,2	B-ALL	negative	0,843	negative,<0.01%	CR	P2	0	0	0	1	0	0	0	0
ALL 38	31	M	62,7	B-ALL	positive	0,938	positive, 0.74%	CR	P2	0	0	1	0	0	0	0	0
ALL 25	22	M	15,3	B-ALL	negative	0,87	negative,<0.01%	CR	P2	0	0	1	0	0	0	0	0
ALL 26	15	M	98,1	T-ALL	negative	0,866	negative,<0.01%	CR	P2	0	0	1	0	0	0	0	0
ALL 20	39	M	151	B-ALL	positive	0,959	positive, 51.8%	NR	P2	0	1	0	0	0	0	0	0
ALL 8	33	F	379	B-ALL	negative	0,971	negative,<0.01%	CR	P3	0	0	1	0	0	1	0	0
ALL 1	17	M	29	T-ALL	negative	0,866	negative,<0.01%	CR	P3	0	0	1	0	0	1	0	0
ALL 11	31	M	6,4	B-ALL	negative	0,86	negative,<0.01%	CR	P3	0	0	0	1	0	0	0	1
ALL 4	22	M	2,5	T-ALL	negative	0,981	positive,0.18%	CR	P3	0	0	1	0	0	1	0	0
ALL 15	15	M	50,2	B-ALL	negative	0,8	negative,<0.01%	CR	P3	0	0	0	0	0	1	0	0
ALL 17	15	M	6,8	B-ALL	negative	0,955	negative,<0.01%	CR	P3	0	0	0	0	0	1	0	0
ALL 30n	17	M	37,1	T-ALL	negative	0,898	negative,<0.01%	CR	P3	0	0	0	0	0	0	0	1
ALL 65	60	F	67,1	B-ALL	positive	0,523	positive,31.4%	dead	P3	0	0	0	0	0	0	0	1
ALL 32	27	F	14,4	T-ALL	negative	0,922	dead	dead	P3	0	0	0	0	0	1	0	1
ALL 50	38	M	460	T-ALL	negative	0,978	dead	dead	P3	0	0	1	0	0	0	1	0
ALL 64	24	M	84	B-ALL	positive	0,948	positive, 26%	NR	P3	0	0	1	0	0	1	1	0
ALL 62	35	F	25,8	B-ALL	positive	0,895	positive, 27.6%	NR	P3	0	0	0	0	0	0	0	1
ALL 9n	28	M	249	B-ALL	positive	0,895	positive, 12.6%	NR	P3	0	0	0	0	0	0	1	0
ALL 46n	49	M	49,3	B-ALL	negative	0,769	positive, 27%	NR	P3	0	0	0	0	0	0	1	1
ALL 58	56	F	25,7	B-ALL	negative	0,875	positive, 0.46%	NR	P3	0	0	0	0	0	0	1	1
ALL 66	44	M	16,7	B-ALL	negative	0,936	positive, 19.8%	NR	P3	0	0	0	1	0	0	1	0
ALL 53	20	M	52,8	B-ALL	positive	0,889	positive, 81.1%	NR	P3	0	0	1	0	0	1	0	0
ALL 36	15	M	79,3	T-ALL	negative	0,974	positive, 58.2%	NR	P3	0	0	0	0	0	1	0	0
ALL 34	24	M	48,1	T-ALL	negative	0,559	positive, 58.2%	NR	P3	0	1	0	0	0	0	0	1
ALL 14n	37	F	1,44	T-ALL	negative	0,942	positive, 33.2%	NR	P3	0	0	0	0	0	0	1	1
ALL 16	26	M	9	B-ALL	negative	0,899	positive, 51.9%	NR	P3	0	0	0	0	0	1	0	1
ALL 33	59	M	52,6	T-ALL	negative	0,913	positive, 58.1%	NR	P3	0	0	0	0	0	1	0	0
ALL 31	65	M	59,5	T-ALL	negative	0,965	positive, 88%	NR	P3	0	0	1	0	1	1	0	1

Tableau S1. Les données cliniques et biologiques de nos 31 patients tous, et les résultats détaillés de notre test de détection basé sur la RT-qPCR des 8 gènes associés au pronostic

Table S2		
Gene	Forward primer	Reverse primer
AK022211	acaggcttctttccccag	cacgcacccttagaactgt
ENSG00000245479	tggtgtgtagtctgactggc	tcgctctgacaccacgattt
STARD4	agaagggtttatctgtgga	ccaaccacagggatggttat
FASTKD1	aagaattaactttctgcattcca	cagaacagacacctcagttggt
PCDH15	acgcttcacacaggaggaata	gtcccttggtggcaagtt
CAMSAP1	ccggaagaacctgaatacctc	tggcaataaaggatgggatg
PCGF6	gaggacatgagtcacttctcggt	tggggtcagctcagagagat
SH3RF3	gcccatcgggtgtctgtc	ggagcccactcttctctcttt
U6	ctcgcttcggcagcaca	aacgcttcacgaattgcgt
Beta ACTIN	catgtacgttgctatccaggc	ctcctaatgtcacgcacgat
RELA	cgggatggcttctatgagg	ctccagggtcccgttctt
AUP1	tgcaactccgtgtacaacagc	tttgcgcttcatgtgctct

Tableau S2. Liste des amorces utilisées pour le test de détection des 8 gènes basé sur RT- qPCR

Table S3				
Gene ID	4 genes associated with poor prognosis in ALL			
AK022211	Homo sapiens cDNA FLJ12149 fis, clone MAMMA1000421.			
BC038778	Gene: RP11-387D10.3 ENSG00000245479			
STARD4	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4			
FASTKD1	FAST kinase domains 1			
	4 genes associated with favorable prognosis in ALL			
PCDH15	protocadherin-related 15			
CAMSAP1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1			
PCGF6	polycomb group ring finger 6			
SH3RF3	SH3 domain containing ring finger 3			

Tableau S3. Liste des 8 gènes dont l'expression est associée à un pronostic dans les LAL de l'enfant

Table S4						
Covariate (reference value)		coef	IR(exp(coef)	95%CI	p-value	
Gender (Female)						
	Male	0,131	1,14	0.54 - 2.39	0,730	
Age (>=10)						
	<10	-0,251	0,78	0.37 - 1.62	0,503	
WBC (<50G)						
	>=50G	0,135	1,15	0.54 - 2.42	0,723	
CNS (positive)						
	negative	-0,12	0,89	0.40 - 1.96	0,767	
MLL (negative)						
	positive	0,404	1,50	0.56 - 4.02	0,423	
MRD (Negative)						
	Positive	0,749	2,12	1.02 - 4.36	0,043	*
	Unknown	0,46	1,58	0.44 - 5.71	0,482	
CRLF2 (Off)						
	On	0,72	2,06	0.99 - 4.24	0,051	.
Prognostic groups (P1&2)						
	P3	1,895	6,65	3.04 - 14.57	2,16E-06	***

Tableau S4. Hazard ratios selon le modèle de régression de Cox testant l'association au pronostic de notre algorithme de 8 gènes classificateurs dans une analyse multivariée, avec d'autres paramètres cliniques et biologiques

Table S5			
Types ALL	P1&P2	P3	Total
ALL	112	22	134
with hyperd	38	2	40
with t(1;19)	30	6	36
with t(12;2)	44	14	58
c-ALL/Pre-B-A	204	155	359
with t(9;22)	62	60	122
wo t(9;22)	142	95	237
mature B-ALL	5	8	13
Pro-B-ALL	27	43	70
T-ALL	60	114	174
Total	408	342	750

Tableau S5. Répartition des sous-types moléculaires des LAL chez l'adulte dans les groupes P1 & 2 et P3 définis par notre algorithme de 8 gènes

DISCUSSION

Le travail présenté ici supporte notre précédent travail montrant que l'expression ectopique de gènes clés contribue à des formes agressives de cancer et à la réponse au traitement. Dans une étude précédente, nous avons montré tout d'abord que les tumeurs de toutes origines activent un grand nombre de gènes spécifiques des tissus, et, en deuxième lieu, que dans les cancers du poumon, l'activation d'un sous-ensemble de ces gènes pourrait identifier les tumeurs très agressives (Rousseaux et al. 2013a). Dans cet article, nous proposons que dans les cancers malins hématopoïétiques, comme dans les tumeurs solides, l'expression ectopique de gènes pourrait également être un facteur déterminant de la progression du cancer et que, là encore, la réponse des cellules malignes à la thérapie pourrait devenir dépendante de l'expression « hors contexte » d'un sous-ensemble de gènes critiques. En effet, nous avons trouvé que chez les patients pédiatriques et adultes atteints de LAL, un groupe de 8 gènes identifie efficacement les patients susceptibles de répondre au traitement. Comme ces 8 gènes ont été initialement identifiés sur la base de leur étroite association avec la survie chez les enfants et qu'un profil spécifique pour leur activation était biaisé vers des formes moléculaires agressives de LAL chez les patients adultes, nous avons fait l'hypothèse que leur statut d'expression peut également être associé à la réponse des patients adultes aux traitements actuels.

Dans une étude prospective, nous avons développé un test basé sur la RT-PCR quantitative pour détecter l'expression des 8 gènes et démontré notre capacité à prédire leurs réponses pour répondre à une chimiothérapie d'induction du CALGB modifiée (thérapie VDLCB), qui est aujourd'hui le traitement conventionnel de la LAL chez l'adulte (Larson et al. 1995; Mi et al. 2012a; Mi et al. 2012b).

Manifestement, dans notre série de 31 patients, le taux de RC était seulement

de 45 %, nettement inférieur au taux de rémission que nous avons rapporté précédemment pour une série plus importante (74,6 %, (Mi et al. 2012b)). En effet, dans cette série de patients, 3 des 31 patients atteints de LAL sont décédés au cours de la thérapie d'induction, et seulement 14 ont atteint la rémission parmi les 28 autres patients. Afin de comprendre la raison de ce faible taux de rémission, nous avons soigneusement examiné les informations cliniques correspondant aux patients qui sont décédés ou n'ont pas atteint la rémission. Parmi les trois patients décédés, un avait une LAL-T avec un nombre de globules blancs de $460 \times 10^9/L$ et est décédé d'une hémorragie cérébrale, un avait une LAL-B Ph-positif avec un nombre de globules blancs de $67,1 \times 10^9/L$ et est décédé d'une infection pulmonaire, et l'autre avait une LAL-T et est décédé d'une infection pulmonaire. Des facteurs pronostiques négatifs ont été associés à tous à l'exception d'un des 14 patients qui n'avaient pas atteint une rémission ; 5 étaient Ph positif, 5 étaient du sous-type à lymphocytes T, 2 avaient un caryotype complexe et un avait une LAL-B avec un nombre de globules blancs de $49,3 \times 10^9/L$. Par conséquent, dans cette population, le pourcentage de patients présentant des facteurs de mauvais pronostic était particulièrement élevé. Fait intéressant, dans notre série de 31 patients, en utilisant notre outil de classement à 8 gènes, seuls 8 patients, 1/4 du nombre total de patients, ont été assignés au groupe P1&2, alors que 3/4 des patients (n=23) étaient dans le groupe P3 . En revanche, chez les 750 patients atteints de LAL de l'étude GSE13204 (Haferlach et al. 2010), le groupe P1&2 représentait 54 % de la population (Fig. 24A, diagramme en secteurs à gauche).

Néanmoins, les résultats obtenus appuient fortement la robustesse de notre méthode de classification et surtout le rôle particulièrement important de nos gènes de classement. Utilisant la RT-PCR quantitative, les 8 patients qui avaient été affectés au groupe à bon pronostic P1&2, à l'exception d'un patient Ph-positif, ont répondu au protocole d'induction, et 16 des 17 non-répondeurs,

incluant trois patients décédés, avaient tous été correctement assignés au groupe P3 de LAL, ce qui démontre la capacité de notre méthode de classification pronostique pour détecter les patients qui ne répondront pas au protocole d'induction. Sept des 14 patients qui ont obtenu une réponse complète à l'induction ont été assignés au groupe P1&2, mais les 7 autres ont été classés parmi les LAL P3 agressives. Fait intéressant, 3 patients de ce dernier groupe avaient une LAL-T connue pour être potentiellement agressive et 2 autres patients avaient une LAL-B Ph négative et une leucocytose supérieure à $30 \times 10^9/L$ au moment du diagnostic, ce qui est considéré comme un facteur de risque élevé en LAL-B, avec $52 \times 10^9/L$ et $370 \times 10^9/L$, respectivement. Actuellement, les issues des deux autres patients atteints de LAL-B sont encore inconnues. Toutefois, le suivi de ces « bons répondeurs » nous dira si ce groupe aura en effet une probabilité de survie plus faible que les autres répondeurs précoces affectés au groupe P1&2. Actuellement, la Maladie Résiduelle Minimale (MRD) est considérée comme l'un des indicateurs les plus puissants pour l'évaluation du pronostic des LAL, même chez les patients ayant des caractéristiques à faible risque à leur première visite, surtout quand il s'avère être positif (Inaba et al. 2013).

Fait intéressant, nous observons ici que 15 patients MRD-positifs (cellules leucémiques $\geq 0,01\%$) sur 18 sont dans le groupe P3. Cependant, il est également remarquable que nous soyons en mesure d'identifier plus de nouveaux patients à haut risque au sein des patients MRD-négatifs ($n = 6$) (Tableau S1). En outre, il est également vrai que pour environ 20 % des patients, aucun profil défini de MRD n'est disponible pour diverses raisons, principalement techniques (Bassan and Hoelzer 2011). Dans cette situation, notre méthode de classification serait critique pour la prise de décision clinique.

Une recherche de la littérature sur les données existantes sur les 8 gènes trouvés ici associés au pronostic de LAL a démontré qu'ils sont probablement

impliqués dans des mécanismes oncogéniques encore inconnus, car les données sur leur fonction dans le cancer sont rares. Au sein des gènes associés individuellement à un mauvais pronostic, seul AK022211 avait déjà été trouvé spécifiquement et fortement régulé vers le haut dans la population de cellules souches hématopoïétiques à la fois du sang de cordon et du sang périphérique (Toren et al. 2005). Par conséquent, il est possible que l'expression ectopique de ce facteur non caractérisé fonctionnellement puisse participer à l'acquisition de caractéristiques de cellules souches par les cellules.

Étonnamment, parmi les gènes activés de manière ectopique, nous avons aussi trouvé des gènes associés individuellement avec une issue clinique favorable. Le premier, IGFBP5-IP (SH3RF3) est une protéine identifiée comme un partenaire de la protéine 5 de liaison au facteur de croissance analogue à l'insuline et est connue pour être nécessaire à la stimulation de la prolifération des ostéoblastes (Amaar et al. 2006). On peut supposer que ce facteur pourrait avoir un rôle similaire dans les lymphoblastes et donc être impliqués dans la sensibilisation des cellules envers des traitements préliminaires affectant les lymphoblastes proliférants. Un autre de ces gènes, PCGF6, est un membre du groupe Polycomb, qui a été trouvé dans un complexe avec la déméthylase de la lysine 4 de l'histone H3, JARID1d, et donc se comporte comme un puissant répresseur transcriptionnel (Lee et al. 2007). Le même facteur a été trouvé dans un complexe avec E2F6, liant l'activité de E2F6 à la fonction répressive de PCGF6 (Trojer et al. 2011). Fait intéressant, plusieurs études ont montré que E2F6 est un facteur critique dans le silençage des gènes spécifiques de lignée germinale dans les tissus somatiques (Kehoe et al. 2008; Spivak et al. 1992; Velasco et al. 2010). En outre, il a été montré que la surexpression d'E2F6 éteint l'expression ectopique du gène de la lignée germinale (Kehoe et al. 2008). Tenant compte de toutes ces données, on

pourrait spéculer que la régulation positive de PCGF6 peut aider E2F6 aux « re-silencage » des gènes qui avaient été exprimés de manière ectopique, privant ainsi les cellules cancéreuses de la contribution des facteurs correspondants, dont elles ont besoin pour leur survie et la progression du cancer (Rousseaux et al. 2013b).

Le fait que nous avons pu identifier tous les sous-groupes de LAL associés à un mauvais pronostic chez les enfants et chez les adultes nous a permis de dévoiler leur profil moléculaire caractéristique. Fait intéressant, l'approche GSEA a montré que, dans les deux cas, un programme d'expression génique caractérisant les cellules souches embryonnaires est régulé à la baisse, alors que les gènes qui définissent les cellules souches hématopoïétiques sont surexprimés. Une inspection minutieuse de ces gènes suggère que, bien que ces tumeurs agressives conservent un profil de type cellule souche hématopoïétique, ils éteignent la nature proliférative des cellules souches embryonnaires (voir Figure 25D et sa légende pour plus de détails).

Les formes moins sensibles de LAL pourraient effectivement être celles avec moins de prolifération et, par conséquent, moins susceptibles de répondre aux agents qui ciblent le cycle cellulaire. Cependant, malgré l'utilisation de G-CSF pour sensibiliser la LAM aux agents cytotoxiques, la capacité du G-CSF à stimuler toutes les LAL-B reste incertaine (Tafari and Andreeff 1990; Wei et al. 2011; Xue et al. 2013).

Ici, nous avons démontré la puissance d'une approche basée sur les activations ectopiques de gènes pour trouver de nouveaux facteurs pronostiques, améliorant ainsi notre système pronostique existant, de sorte que les patients à haut risque, en particulier ceux qui sont actuellement cachés au sein des groupes à faible risque, puissent être identifiés dès que possible, afin de permettre l'augmentation de la thérapie.

Références

1. Allis CD, Reinberg D, Jenuwein T (2007) *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
2. Amaar YG, Tapia B, Chen ST, Baylink DJ, Mohan S (2006) Identification and characterization of novel IGFBP5 interacting protein: evidence IGFBP5-IP is a potential regulator of osteoblast cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C900-6
3. Aprelikova O, Pandolfi S, Tackett S, Ferreira M, Salnikow K, Ward Y, Risinger JI, Barrett JC, Niederhuber J (2009) Melanoma antigen-11 inhibits the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 and activates hypoxic response. *Cancer Res* 69: 616-24
4. Armstrong SA, Look AT (2005) Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 23: 6306-15
5. Aspland SE, Bendall HH, Murre C (2001) The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene* 20: 5708-17
6. Ayton PM, Cleary ML (2001) Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene* 20: 5695-707
7. Bader P, Kreyenberg H, Henze GH, Eckert C, Reising M, Willasch A, Barth A, Borkhardt A, Peters C, Handgretinger R, Sykora KW, Holter W, Kabisch H, Klingebiel T, von Stackelberg A (2009) Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol* 27: 377-84
8. Bai S, Wilson EM (2008) Epidermal-growth-factor-dependent phosphorylation and ubiquitylation of MAGE-11 regulates its interaction with the androgen receptor. *Mol Cell Biol* 28: 1947-63
9. Balduzzi A, Valsecchi MG, Uderzo C, De Lorenzo P, Klingebiel T, Peters C, Stary J, Felice MS, Magyarosy E, Conter V, Reiter A, Messina C, Gadner H, Schrappe M (2005) Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. *Lancet* 366: 635-42
10. Bassan R, Hoelzer D (2011) Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 29: 532-43
11. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R, Silvestri D, Benetello A, Buldini B, Maglia O, Masera G, Conter V, Arico M, Biondi A, Gaipa G (2009) Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 27: 5168-74
12. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40: 499-507
13. Berdasco M, Esteller M (2010) Aberrant epigenetic landscape in cancer: how

- cellular identity goes awry. *Dev Cell* 19: 698-711
14. Bhatia S, Landier W, Shangquan M, Hageman L, Schaible AN, Carter AR, Hanby CL, Leisenring W, Yasui Y, Kornegay NM, Mascarenhas L, Ritchey AK, Casillas JN, Dickens DS, Meza J, Carroll WL, Relling MV, Wong FL (2012) Nonadherence to oral mercaptopurine and risk of relapse in Hispanic and non-Hispanic white children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 30: 2094-101
 15. Bhojwani D, Kang H, Menezes RX, Yang W, Sather H, Moskowitz NP, Min DJ, Potter JW, Harvey R, Hunger SP, Seibel N, Raetz EA, Pieters R, Horstmann MA, Relling MV, den Boer ML, Willman CL, Carroll WL (2008) Gene expression signatures predictive of early response and outcome in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: A Children's Oncology Group Study [corrected]. *J Clin Oncol* 26: 4376-84
 16. Bornkamm GW (2009) Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. *Int J Cancer* 124: 1745-55
 17. Borowitz M, Chan J (2008) T leucémie lymphoblastique / lymphome. . Classification OMS des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes, 4th edn. IARC, Lyon, pp 176-178
 18. Bouhallier F, Allioli N, Laval F, Chalmel F, Perrard M-H, Durand P, Samarut J, Pain B, Rouault J-P (2010) Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *RNA* 16: 720-31
 19. Boussouar F, Jamshidikia M, Morozumi Y, Rousseaux S, Khochbin S (2013) Malignant genome reprogramming by ATAD2. *Biochim Biophys Acta* in press
 20. Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S (2008) A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code. *Cell Cycle* 7: 3499-502
 21. Caron C, Lestrat C, Marsal S, Escoffier E, Curtet S, Virolle V, Barbry P, Debernardi A, Brambilla C, Brambilla E, Rousseaux S, Khochbin S (2010) Functional characterization of ATAD2 as a new cancer/testis factor and a predictor of poor prognosis in breast and lung cancers. *Oncogene* 29: 5171-81
 22. Carroll WL (2013) Safety in numbers: hyperdiploidy and prognosis. *Blood* 121: 2374-6
 23. Carroll WL, Raetz EA (2012) Clinical and laboratory biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr* 160: 10-8
 24. Chen B, Wang YY, Shen Y, Zhang WN, He HY, Zhu YM, Chen HM, Gu CH, Fan X, Chen JM, Cao Q, Yang G, Jiang CL, Weng XQ, Zhang XX, Xiong SM, Shen ZX, Jiang H, Gu LJ, Chen Z, Mi JQ, Chen SJ (2012) Newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in China (I): abnormal genetic patterns in 1346 childhood and adult cases and their comparison with the reports from Western countries. *Leukemia* 26: 1608-16
 25. Ciró M, Prosperini E, Quarto M, Grazini U, Walfridsson J, McBlane F, Nucifero P, Pacchiana G, Capra M, Christensen J, Helin K (2009) ATAD2 is a novel cofactor for MYC, overexpressed and amplified in aggressive tumors. *Cancer Res* 69: 8491-8

26. Copelan EA, McGuire EA (1995) *The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. Blood 85: 1151-68*
27. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, O'Hare T, Hu S, Narasimhan NI, Rivera VM, Clackson T, Turner CD, Haluska FG, Druker BJ, Deininger MW, Talpaz M (2012) *Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med 367: 2075-88*
28. Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS, Ren B (2012) *Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. Nature 485: 376-80*
29. Downing JR (2003) *The core-binding factor leukemias: lessons learned from murine models. Curr Opin Genet Dev 13: 48-54*
30. Doyle JM, Gao J, Wang J, Yang M, Potts PR (2010) *MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. Mol Cell 39: 963-74*
31. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R, Talpaz M (2001) *Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. N Engl J Med 344: 1038-42*
32. Eapen M, Rocha V, Sanz G, Scaradavou A, Zhang MJ, Arcese W, Sirvent A, Champlin RE, Chao N, Gee AP, Isola L, Laughlin MJ, Marks DI, Nabhan S, Ruggeri A, Soiffer R, Horowitz MM, Gluckman E, Wagner JE (2010) *Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. Lancet Oncol 11: 653-60*
33. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, Kurtzberg J, Scaradavou A, Loberiza FR, Champlin RE, Klein JP, Horowitz MM, Wagner JE (2007) *Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. Lancet 369: 1947-54*
34. Emadali A, Rousseaux S, Bruder-Costa J, Rome C, Duley S, Hamaidia S, Betton P, Debernardi A, Leroux D, Bernay B, Kieffer-Jaquinod S, Combes F, Ferri E, McKenna CE, Petosa C, Bruley C, Garin J, Ferro M, Gressin R, Callanan MB, Khochbin S (2013) *Identification of a novel BET bromodomain inhibitor-sensitive, gene regulatory circuit that controls Rituximab response and tumour growth in aggressive lymphoid cancers. EMBO Mol Med*
35. Ernst P, Wang J, Korsmeyer SJ (2002) *The role of MLL in hematopoiesis and leukemia. Curr Opin Hematol 9: 282-7*
36. Esparza SD, Sakamoto KM (2005) *Topics in pediatric leukemia--acute lymphoblastic leukemia. MedGenMed 7: 23*
37. Esteller M (2007) *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nat Rev Genet 8: 286-98*
38. Faderl S, O'Brien S, Pui CH, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D, Kantarjian HM (2010) *Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. Cancer 116: 1165-76*
39. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, Morse EM,

- Keates T, Hickman TT, Felletar I, Philpott M, Munro S, McKeown MR, Wang Y, Christie AL, West N, Cameron MJ, Schwartz B, Heightman TD, La Thangue N, French CA, Wiest O, Kung AL, Knapp S, Bradner JE (2010) Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 468: 1067-73
40. French CA (2012) Pathogenesis of NUT midline carcinoma. *Annu Rev Pathol* 7: 247-65
41. French D, Yang W, Cheng C, Raimondi SC, Mullighan CG, Downing JR, Evans WE, Pui CH, Relling MV (2009) Acquired variation outweighs inherited variation in whole genome analysis of methotrexate polyglutamate accumulation in leukemia. *Blood* 113: 4512-20
42. Gaucher J, Boussouar F, Montellier E, Curtet S, Buchou T, Bertrand S, Hery P, Jounier S, Depaux A, Vitte AL, Guardiola P, Pernet K, Debernardi A, Lopez F, Holota H, Imbert J, Wolgemuth DJ, Gerard M, Rousseaux S, Khochbin S (2012) Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J* 31: 3809-20
43. Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S (2010) From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J* 277: 599-604
44. Gokul G, Ramakrishna G, Khosla S (2009) Reprogramming of HeLa cells upon DNMT3L overexpression mimics carcinogenesis. *Epigenetics* 4: 322-9
45. Goldberg JM, Silverman LB, Levy DE, Dalton VK, Gelber RD, Lehmann L, Cohen HJ, Sallan SE, Asselin BL (2003) Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J Clin Oncol* 21: 3616-22
46. Goll MG, Bestor TH (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74: 481-514
47. Gostissa M, Yan CT, Bianco JM, Cogne M, Pinaud E, Alt FW (2009) Long-range oncogenic activation of Igh-c-myc translocations by the Igh 3' regulatory region. *Nature* 462: 803-7
48. Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 271: 3459-69
49. Govin J, Schug J, Krishnamoorthy T, Dorsey J, Khochbin S, Berger SL (2010) Genome-wide mapping of histone H4 serine-1 phosphorylation during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 38: 4599-606
50. Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeijer A (2006) Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia* 20: 1496-510
51. Grayson AR, Walsh EM, Cameron MJ, Godec J, Ashworth T, Ambrose JM, Aserlind AB, Wang H, Evan GI, Kluk MJ, Bradner JE, Aster JC, French CA (2013) MYC, a downstream target of BRD-NUT, is necessary and sufficient for the blockade of differentiation in NUT midline carcinoma. *Oncogene*
52. Haferlach T, Kohlmann A, Wieczorek L, Basso G, Kronnie GT, Bene MC, De Vos J, Hernandez JM, Hofmann WK, Mills KI, Gilkes A, Chiaretti S, Shurtleff

- SA, Kipps TJ, Rassenti LZ, Yeoh AE, Papenhausen PR, Liu WM, Williams PM, Foa R (2010) *Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. J Clin Oncol* 28: 2529-37
53. Hanahan D, Weinberg RA (2011) *Hallmarks of cancer: the next generation. Cell* 144: 646-74
54. Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, Wharton W, Mikhail FM, Carroll AJ, Kang H, Liu W, Dobbin KK, Smith MA, Carroll WL, Devidas M, Bowman WP, Camitta BM, Reaman GH, Hunger SP, Downing JR, Willman CL (2010) *Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. Blood* 115: 5312-21
55. He G, Chen L, Ye Y, Xiao Y, Hua K, Jarjoura D, Nakano T, Barsky SH, Shen R, Gao J-X (2010) *Piwil2 expressed in various stages of cervical neoplasia is a potential complementary marker for p16. Am J Transl Res* 2: 156-69
56. Hong JA, Kang Y, Abdullaev Z, Flanagan PT, Pack SD, Fischette MR, Adnani MT, Loukinov DI, Vatolin S, Risinger JI, Custer M, Chen GA, Zhao M, Nguyen DM, Barrett JC, Lobanenko VV, Schrupp DS (2005) *Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. Cancer Res* 65: 7763-74
57. Hsieh MS, French CA, Liang CW, Hsiao CH (2009) *NUT midline carcinoma: case report and review of the literature. Int J Surg Pathol* 19: 808-12
58. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG (2013) *Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet* 381: 1943-55
59. Jaatinen T, Hemmoranta H, Hautaniemi S, Niemi J, Nicorici D, Laine J, Yli-Harja O, Partanen J (2006) *Global gene expression profile of human cord blood-derived CD133+ cells. Stem Cells* 24: 631-41
60. Jabbour EJ, Faderl S, Kantarjian HM (2005) *Adult acute lymphoblastic leukemia. Mayo Clin Proc* 80: 1517-27
61. Jaffe E, Harris N, Stein H, Vardiman J (2001) *World Health Organization Classification of Tumours. , Lyon, France*
62. Janic A, Mendizabal L, Llamazares S, Rossell D, Gonzalez C (2011) *Ectopic expression of germline genes drives malignant brain tumor growth in Drosophila. Science* 330: 1824-7
63. Kager L, Cheok M, Yang W, Zaza G, Cheng Q, Panetta JC, Pui CH, Downing JR, Relling MV, Evans WE (2005) *Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics. J Clin Invest* 115: 110-7
64. Kalashnikova EV, Revenko AS, Gemo AT, Andrews NP, Tepper CG, Zou JX, Cardiff RD, Borowsky AD, Chen H-W (2010) *ANCCA/ATAD2 overexpression identifies breast cancer patients with poor prognosis, acting to drive proliferation and survival of triple-negative cells through control of B-Myb and EZH2. Cancer Res* 70: 9402-12
65. Kang H, Chen IM, Wilson CS, Bedrick EJ, Harvey RC, Atlas SR, Devidas M,

- Mullighan CG, Wang X, Murphy M, Ar K, Wharton W, Borowitz MJ, Bowman WP, Bhojwani D, Carroll WL, Camitta BM, Reaman GH, Smith MA, Downing JR, Hunger SP, Willman CL (2009) Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 115: 1394-405
66. Kang Y, Hong JA, Chen GA, Nguyen DM, Schrupp DS (2007) Dynamic transcriptional regulatory complexes including BORIS, CTCF and Sp1 modulate NY-ESO-1 expression in lung cancer cells. *Oncogene* 26: 4394-403
67. Kantarjian H, Thomas D, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Jeha S, Bueso-Ramos CE, Pierce S, Shan J, Koller C, Beran M, Keating M, Freireich EJ (2004) Long-term follow-up results of hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (Hyper-CVAD), a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *Cancer* 101: 2788-801
68. Kantarjian HM, O'Brien S, Smith TL, Cortes J, Giles FJ, Beran M, Pierce S, Huh Y, Andreeff M, Koller C, Ha CS, Keating MJ, Murphy S, Freireich EJ (2000) Results of treatment with hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 18: 547-61
69. Karpf AR (2006) A Potential Role for Epigenetic Modulatory Drugs in the Enhancement of Cancer/Germ-Line Antigen Vaccine Efficacy. *Epigenetics* 1
70. Karpf AR (2007) Epigenomic reactivation screening to identify genes silenced by DNA hypermethylation in human cancer. *Curr Opin Mol Ther* 9: 231-41
71. Karpf AR, Jones DA (2002) Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene* 21: 5496-503
72. Kehoe SM, Oka M, Hankowski KE, Reichert N, Garcia S, McCarrey JR, Gaubatz S, Terada N (2008) A conserved E2F6-binding element in murine meiosis-specific gene promoters. *Biol Reprod* 79: 921-30
73. Khochbin S (2001) Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* 271: 1-12.
74. Khochbin S, Verdel A, Lemerrier C, Seigneurin-Berny D (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* 11: 162-166.
75. Khorasanizadeh S (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116: 259-72
76. Kim Y, Jeoung D (2009) The cancer/testis antigen CAGE induces MMP-2 through the activation of NF-kappaB and AP-1. *BMB Rep* 42: 758-63
77. Kim Y, Park H, Park D, Lee Y-S, Choe J, Hahn J-H, Lee H, Kim Y-M, Jeoung D (2010) Cancer/testis antigen CAGE exerts negative regulation on p53 expression through HDAC2 and confers resistance to anti-cancer drugs. *J Biol Chem* 285: 25957-68
78. Klenova EM, Morse HCr, Ohlsson R, Lobanenkova VV (2002) The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* 12: 399-414
79. Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its

- mediators. *Trends Biochem Sci* 31: 89-97
80. Kohlmann A, Kipps TJ, Rassenti LZ, Downing JR, Shurtleff SA, Mills KI, Gilkes AF, Hofmann WK, Basso G, Dell'orto MC, Foa R, Chiaretti S, De Vos J, Rauhut S, Papenhausen PR, Hernandez JM, Lumbreras E, Yeoh AE, Koay ES, Li R, Liu WM, Williams PM, Wieczorek L, Haferlach T (2008) An international standardization programme towards the application of gene expression profiling in routine leukaemia diagnostics: the Microarray Innovations in LEukemia study prephase. *Br J Haematol* 142: 802-7
 81. Kornberg RD (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184: 868-71
 82. Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M (2003) Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* 138: 819-30
 83. Laduron S, Deplus R, Zhou S, Kholmanskikh O, Godelaine D, De Smet C, Hayward SD, Fuks F, Boon T, De Plaen E (2004) MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Res* 32: 4340-50
 84. Larson RA, Dodge RK, Burns CP, Lee EJ, Stone RM, Schulman P, Duggan D, Davey FR, Sobol RE, Frankel SR, et al. (1995) A five-drug remission induction regimen with intensive consolidation for adults with acute lymphoblastic leukemia: cancer and leukemia group B study 8811. *Blood* 85: 2025-37
 85. Laval F, Acloque H, Bachelard E, Nieto MA, Samarut J, Pain B (2009) Ectopic expression of *Cvh* (Chicken Vasa homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate. *Dev Biol* 330: 73-82
 86. Lee EJ, Petroni GR, Schiffer CA, Freter CE, Johnson JL, Barcos M, Frizzera G, Bloomfield CD, Peterson BA (2001) Brief-duration high-intensity chemotherapy for patients with small noncleaved-cell lymphoma or FAB L3 acute lymphocytic leukemia: results of cancer and leukemia group B study 9251. *J Clin Oncol* 19: 4014-22
 87. Lee JH, Schütte D, Wulf G, Füzesi L, Radzun H-J, Schweyer S, Engel W, Nayernia K (2006) Stem-cell protein *Piwil2* is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of *Stat3/Bcl-XL* pathway. *Hum Mol Genet* 15: 201-11
 88. Lee MG, Norman J, Shilatifard A, Shiekhattar R (2007) Physical and functional association of a trimethyl H3K4 demethylase and *Ring6a/MBLR*, a polycomb-like protein. *Cell* 128: 877-87
 89. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, Xu W, Tan B, Goldschmidt N, Iqbal J, Vose J, Bast M, Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Armitage JO, Kyle A, May L, Gascoyne RD, Connors JM, Troen G, Holte H, Kvaloy S, Dierickx D, Verhoef G, Delabie J, Smeland EB, Jares P, Martinez A, Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Campo E, Braziel RM, Miller TP, Rimsza LM, Cook JR, Pohlman B, Sweetenham J, Tubbs RR, Fisher RI, Hartmann E, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Wrench D, Lister TA, Jaffe ES, Wilson WH, Chan WC, Staudt LM (2008) Stromal gene signatures in

- large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 359: 2313-23
90. Leung W, Campana D, Yang J, Pei D, Coustan-Smith E, Gan K, Rubnitz JE, Sandlund JT, Ribeiro RC, Srinivasan A, Hartford C, Triplett BM, Dallas M, Pillai A, Handgretinger R, Laver JH, Pui CH (2011) High success rate of hematopoietic cell transplantation regardless of donor source in children with very high-risk leukemia. *Blood* 118: 223-30
 91. Leung W, Pui CH, Coustan-Smith E, Yang J, Pei D, Gan K, Srinivasan A, Hartford C, Triplett BM, Dallas M, Pillai A, Shook D, Rubnitz JE, Sandlund JT, Jeha S, Inaba H, Ribeiro RC, Handgretinger R, Laver JH, Campana D (2012) Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia. *Blood* 120: 468-72
 92. Levens D (2008) How the c-myc promoter works and why it sometimes does not. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 41-3
 93. Liu JJ, Shen R, Chen L, Ye Y, He G, Hua K, Jarjoura D, Nakano T, Ramesh GK, Shapiro CL, Barsky SH, Gao J-X (2010) Piwil2 is expressed in various stages of breast cancers and has the potential to be used as a novel biomarker. *Int J Clin Exp Pathol* 3: 328-37
 94. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution [see comments]. *Nature* 389: 251-60
 95. Mi JQ, Li JM, Shen ZX, Chen SJ, Chen Z (2012a) How to manage acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 26: 1743-51
 96. Mi JQ, Wang X, Yao Y, Lu HJ, Jiang XX, Zhou JF, Wang JH, Jiao B, Shen SH, Tang JY, Gu LJ, Jiang H, Ma LY, Hao SG, Chen FY, Xiong SM, Shen ZX, Chen Z, Chen B, Chen SJ (2012b) Newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia in China (II): prognosis related to genetic abnormalities in a series of 1091 cases. *Leukemia* 26: 1507-16
 97. Monte M, Simonatto M, Peche LY, Bublik DR, Gobessi S, Pierotti MA, Rodolfo M, Schneider C (2006) MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11160-5
 98. Moorman AV, Chilton L, Wilkinson J, Ensor HM, Bown N, Proctor SJ (2010a) A population-based cytogenetic study of adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 115: 206-14
 99. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, Vora A, Mitchell CD, Harrison CJ (2010b) Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol* 11: 429-38
 100. Moricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dordelmann M, Loning L, Beier R, Ludwig WD, Ratei R, Harbott J, Boos J, Mann G, Niggli F, Feldges A, Henze G, Welte K, Beck JD, Klingebiel T, Niemeyer C, Zintl F, Bode U, Urban C, Wehinger H, Niethammer D, Riehm H, Schrappe M (2008)

- Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. Blood 111: 4477-89*
101. Morinière J, Rousseaux S, Steuerwald U, Soler-López M, Curtet S, Vitte A-L, Govin J, Gaucher J, Sadoul K, Hart DJ, Krijgsveld J, Khochbin S, Müller CW, Petosa C (2009) Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* 461: 664-8
 102. Muller S, Filippakopoulos P, Knapp S (2010) Bromodomains as therapeutic targets. *Expert Rev Mol Med* 13: e29
 103. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LA, Miller CB, Ma J, Liu W, Cheng C, Schulman BA, Harvey RC, Chen IM, Clifford RJ, Carroll WL, Reaman G, Bowman WP, Devidas M, Gerhard DS, Yang W, Relling MV, Shurtleff SA, Campana D, Borowitz MJ, Pui CH, Smith M, Hunger SP, Willman CL, Downing JR (2009) Deletion of *IKZF1* and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 360: 470-80
 104. Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Trigg ME, Cherlow JM, Lukens JN, Wolff L, Uckun FM, Gaynon PS (1998) Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. *N Engl J Med* 338: 1663-71
 105. Naxerova K, Bult CJ, Peaston A, Fancher K, Knowles BB, Kasif S, Kohane IS (2008) Analysis of gene expression in a developmental context emphasizes distinct biological leitmotifs in human cancers. *Genome Biol* 9: R108
 106. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, Cowan-Jacob SW, Lee FY, Heinrich MC, Deininger MW, Druker BJ (2005) In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res* 65: 4500-5
 107. Olins AL, Olins DE (1974) Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183: 330-2
 108. Ottmann O, Dombret H, Martinelli G, Simonsson B, Guilhot F, Larson RA, Rege-Cambrin G, Radich J, Hochhaus A, Apanovitch AM, Gollerkeri A, Coutre S (2007) Dasatinib induces rapid hematologic and cytogenetic responses in adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia with resistance or intolerance to imatinib: interim results of a phase 2 study. *Blood* 110: 2309-15
 109. Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4: 281-300
 110. Patte C, Auperin A, Michon J, Behrendt H, Leverger G, Frappaz D, Lutz P, Coze C, Perel Y, Raphael M, Terrier-Lacombe MJ (2001) The Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. *Blood* 97: 3370-9
 111. Phillips DM, Johns EW (1965) A Fractionation of the Histones of Group F2a

- from Calf Thymus. *Biochem J* 94: 127-30
112. Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S (2003) Acetylation-Dependent Chromatin Reorganization by BRDT, a Testis-Specific Bromodomain-Containing Protein. *Mol Cell Biol* 23: 5354-65
113. Pohlers M, Truss M, Frede U, Scholz A, Strehle M, Kuban R-J, Hoffmann B, Morkel M, Birchmeier C, Hagemeyer C (2005) A role for E2F6 in the restriction of male-germ-cell-specific gene expression. *Curr Biol* 15: 1051-7
114. Por E, Byun H-J, Lee E-J, Lim J-H, Jung S-Y, Park I, Kim Y-M, Jeoung D-I, Lee H (2010) The cancer/testis antigen CAGE with oncogenic potential stimulates cell proliferation by up-regulating cyclins D1 and E in an AP-1- and E2F-dependent manner. *J Biol Chem* 285: 14475-85
115. Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Onciu M, Coustan-Smith E, Kun LE, Jeha S, Cheng C, Howard SC, Simmons V, Bayles A, Metzger ML, Boyett JM, Leung W, Handgretinger R, Downing JR, Evans WE, Relling MV (2009) Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med* 360: 2730-41
116. Pui CH, Evans WE (2006) Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 354: 166-78
117. Pui CH, Relling MV, Downing JR (2004) Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350: 1535-48
118. Pui CH, Robison LL, Look AT (2008) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371: 1030-43
119. Pui CH, Sallan S, Relling MV, Masera G, Evans WE (2001) International Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Workshop: Sausalito, CA, 30 November-1 December 2000. *Leukemia* 15: 707-15
120. Relogio A, Ben-Dov C, Baum M, Ruggiu M, Gemund C, Benes V, Darnell RB, Valcarcel J (2005) Alternative splicing microarrays reveal functional expression of neuron-specific regulators in Hodgkin lymphoma cells. *J Biol Chem* 280: 4779-84
121. Revenko AS, Kalashnikova EV, Gemo AT, Zou JX, Chen HW (2010) Chromatin loading of E2F-MLL complex by cancer-associated coregulator ANCCA via reading a specific histone mark. *Mol Cell Biol* 30: 5260-72
122. Reynoird N, Schwartz BE, Delvecchio M, Sadoul K, Meyers D, Mukherjee C, Caron C, Kimura H, Rousseaux S, Cole PA, Panne D, French CA, Khochbin S (2010) Oncogenesis by sequestration of CBP/p300 in transcriptionally inactive hyperacetylated chromatin domains. *EMBO J* 29: 2943-52
123. Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 A resolution. *Nature* 311: 532-7
124. Rots MG, Pieters R, Peters GJ, Noordhuis P, van Zantwijk CH, Kaspers GJ, Hahlen K, Creutzig U, Veerman AJ, Jansen G (1999) Role of foyl/polyglutamate synthetase and foyl/polyglutamate hydrolase in methotrexate accumulation and polyglutamylation in childhood leukemia. *Blood* 93: 1677-83

125. Rousseaux S, Boussouar F, Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Curtet S, Vitte A-L, Khochbin S (2011) Molecular models for post-meiotic male genome reprogramming. *Syst Biol Reprod Med* 57: 50-3
126. Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK, Khochbin S (2005) Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* 345: 139-53
127. Rousseaux S, Debernardi A, Jacquiau B, Vitte AL, Vesin A, Nagy-Mignotte H, Moro-Sibilot D, Brichon PY, Lantuejoul S, Hainaut P, Laffaire J, de Reynies A, Beer DG, Timsit JF, Brambilla C, Brambilla E, Khochbin S (2013a) Ectopic activation of germline and placental genes identifies aggressive metastasis-prone lung cancers. *Sci Transl Med* 5: 186ra66
128. Rousseaux S, Khochbin S (2009) New hypotheses for large-scale epigenome alterations in somatic cancer cells: a role for male germ-cell-specific regulators. *Epigenomics* 1: 153-61
129. Rousseaux S, Wang J, Khochbin S (2013b) Cancer hallmarks sustained by ectopic activations of placenta/male germline genes. *Cell Cycle* 12
130. Rowe JM, Buck G, Burnett AK, Chopra R, Wiernik PH, Richards SM, Lazarus HM, Franklin IM, Litzow MR, Ciobanu N, Prentice HG, Durrant J, Tallman MS, Goldstone AH (2005) Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood* 106: 3760-7
131. Scanlan MJ, Altorki NK, Gure AO, Williamson B, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ (2000) Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9. *Cancer Lett* 150: 155-64
132. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, Niemeyer C, Henze G, Feldges A, Zintl F, Kornhuber B, Ritter J, Welte K, Gadner H, Riehm H (2000) Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 95: 3310-22
133. Schultz KR, Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, Sather H, Devidas M, Wang C, Davies SM, Gaynon PS, Trigg M, Rutledge R, Burden L, Jorstad D, Carroll A, Heerema NA, Winick N, Borowitz MJ, Hunger SP, Carroll WL, Camitta B (2009) Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* 27: 5175-81
134. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN, Shuster JJ, Devidas M, Borowitz MJ, Carroll AJ, Heerema NA, Rubnitz JE, Loh ML, Raetz EA, Winick NJ, Hunger SP, Carroll WL, Gaynon PS, Camitta BM (2007) Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* 109: 926-35
135. Schwartz BE, Hofer MD, Lemieux ME, Bauer DE, Cameron MJ, West NH, Agoston ES, Reynoird N, Khochbin S, Ince TA, Christie A, Janeway KA,

- Vargas SO, Perez-Atayde AR, Aster JC, Sallan SE, Kung AL, Bradner JE, French CA (2011) Differentiation of NUT midline carcinoma by epigenomic reprogramming. *Cancer Res* 71: 2686-96
136. Seibel NL, Steinherz PG, Sather HN, Nachman JB, Delaat C, Ettinger LJ, Freyer DR, Mattano LA, Jr., Hastings CA, Rubin CM, Bertolone K, Franklin JL, Heerema NA, Mitchell TL, Pyesmany AF, La MK, Edens C, Gaynon PS (2008) Early postinduction intensification therapy improves survival for children and adolescents with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 111: 2548-55
137. Shen H, Laird PW (2013) Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* 153: 38-55
138. Shiramizu B, Barriga F, Neequaye J, Jafri A, Dalla-Favera R, Neri A, Guttierrez M, Levine P, Magrath I (1991) Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association. *Blood* 77: 1516-26
139. Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A, Chen Y-T, Old LJ (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 615-25
140. Sincic N, Herceg Z (2011) DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes. *Curr Opin Oncol* 23: 69-76
141. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, Gelber R, Heerema N, Korn EL, Link M, Murphy S, Pui CH, Pullen J, Reamon G, Sallan SE, Sather H, Shuster J, Simon R, Trigg M, Tubergen D, Uckun F, Ungerleider R (1996) Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 14: 18-24
142. Soussain C, Patte C, Ostronoff M, Delmer A, Rigal-Huguet F, Cambier N, Leprise PY, Francois S, Cony-Makhoul P, Harousseau JL, et al. (1995) Small noncleaved cell lymphoma and leukemia in adults. A retrospective study of 65 adults treated with the LMB pediatric protocols. *Blood* 85: 664-74
143. Speck NA, Gilliland DG (2002) Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2: 502-13
144. Spivak B, Schwartz B, Radwan M, Weizman A (1992) alpha-Tocopherol treatment for tardive dyskinesia. *J Nerv Ment Dis* 180: 400-1
145. Stielow B, Kruger I, Diezko R, Finkernagel F, Gillemans N, Kong-a-San J, Philipsen S, Suske G (2010) Epigenetic silencing of spermatocyte-specific and neuronal genes by SUMO modification of the transcription factor Sp3. *PLoS Genet* 6: e1001203
146. Stock W (2010) Adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010: 21-9
147. Stock W, La M, Sanford B, Bloomfield CD, Vardiman JW, Gaynon P, Larson RA, Nachman J (2008) What determines the outcomes for adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia treated on cooperative group protocols? A comparison of Children's Cancer Group and Cancer and Leukemia Group B studies. *Blood* 112: 1646-54
148. Stow P, Key L, Chen X, Pan Q, Neale GA, Coustan-Smith E, Mullighan CG,

- Zhou Y, Pui CH, Campana D (2010) Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 115: 4657-63
149. Sun L, Huang L, Nguyen P, Bisht KS, Bar-Sela G, Ho AS, Bradbury CM, Yu W, Cui H, Lee S, Trepel JB, Feinberg AP, Gius D (2008) DNA methyltransferase 1 and 3B activate BAG-1 expression via recruitment of CTCFL/BORIS and modulation of promoter histone methylation. *Cancer Res* 68: 2726-35
150. Suzuki T, Kosaka-Suzuki N, Pack S, Shin DM, Yoon J, Abdullaev Z, Pugacheva E, Morse HC, 3rd, Loukinov D, Lobanenkova V (2010) Expression of a testis-specific form of Gal3st1 (CST), a gene essential for spermatogenesis, is regulated by the CTCF paralogous gene BORIS. *Mol Cell Biol* 30: 2473-84
151. Tafuri A, Andreeff M (1990) Kinetic rationale for cytokine-induced recruitment of myeloblastic leukemia followed by cycle-specific chemotherapy in vitro. *Leukemia* 4: 826-34
152. Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y (2011) Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146: 1016-28
153. Thomas DA, Faderl S, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Cortes J, Garcia-Manero G, Giles FJ, Verstovsek S, Wierda WG, Pierce SA, Shan J, Brandt M, Hagemester FB, Keating MJ, Cabanillas F, Kantarjian H (2006) Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 106: 1569-80
154. Thomas DA, O'Brien S, Faderl S, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Wierda W, Ravandi F, Verstovsek S, Jorgensen JL, Bueso-Ramos C, Andreeff M, Pierce S, Garris R, Keating MJ, Cortes J, Kantarjian HM (2010) Chemoimmunotherapy with a modified hyper-CVAD and rituximab regimen improves outcome in de novo Philadelphia chromosome-negative precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 28: 3880-9
155. Thomas X, Boiron JM, Huguet F, Dombret H, Bradstock K, Vey N, Kovacsovic T, Delannoy A, Fegueux N, Fenaux P, Stamatoullas A, Vernant JP, Tournilhac O, Buzyn A, Reman O, Charrin C, Boucheix C, Gabert J, Lheritier V, Fiere D (2004) Outcome of treatment in adults with acute lymphoblastic leukemia: analysis of the LALA-94 trial. *J Clin Oncol* 22: 4075-86
156. Timar J, Tovari J, Raso E, Meszaros L, Bereczky B, Lapis K (2005) Platelet-mimicry of cancer cells: epiphenomenon with clinical significance. *Oncology* 69: 185-201
157. Toren A, Bielgorai B, Jacob-Hirsch J, Fisher T, Kreiser D, Moran O, Zeligson S, Givol D, Yitzhaky A, Itskovitz-Eldor J, Kventsel I, Rosenthal E, Amariglio N, Rechavi G (2005) CD133-positive hematopoietic stem cell "stemness" genes

- contain many genes mutated or abnormally expressed in leukemia. *Stem Cells* 23: 1142-53
158. Trojer P, Cao AR, Gao Z, Li Y, Zhang J, Xu X, Li G, Losson R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Farnham PJ, Reinberg D (2011) L3MBTL2 protein acts in concert with PcG protein-mediated monoubiquitination of H2A to establish a repressive chromatin structure. *Mol Cell* 42: 438-50
159. Turner BM (2005) Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat Struct Mol Biol* 12: 110-2
160. Unhavaithaya Y, Shin TH, Miliaras N, Lee J, Oyama T, Mello CC (2002) MEP-1 and a homolog of the NURD complex component Mi-2 act together to maintain germline-soma distinctions in *C. elegans*. *Cell* 111: 991-1002
161. van der Werff Ten Bosch J, Suciú S, Thyss A, Bertrand Y, Norton L, Mazingue F, Uyttebroeck A, Lutz P, Robert A, Boutard P, Ferster A, Plouvier E, Maes P, Munzer M, Plantaz D, Dresse MF, Philippet P, Sirvent N, Waterkeyn C, Vilmer E, Philippe N, Otten J (2005) Value of intravenous 6-mercaptopurine during continuation treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma: final results of a randomized phase III trial (58881) of the EORTC CLG. *Leukemia* 19: 721-6
162. Vatolin S, Abdullaev Z, Pack SD, Flanagan PT, Custer M, Loukinov DI, Pugacheva E, Hong JA, Morse H, 3rd, Schrupp DS, Risinger JI, Barrett JC, Lobanenkov VV (2005) Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res* 65: 7751-62
163. Velasco G, Hube F, Rollin J, Neuillet D, Philippe C, Bouzinba-Segard H, Galvani A, Viegas-Pequignot E, Francastel C (2010) Dnmt3b recruitment through E2F6 transcriptional repressor mediates germ-line gene silencing in murine somatic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 9281-6
164. Waddington CH (1952) Selection of the genetic basis for an acquired character. *Nature* 169: 625-6
165. Wang D, Kennedy S, Conte D, Jr., Kim JK, Gabel HW, Kamath RS, Mello CC, Ruvkun G (2005) Somatic misexpression of germline P granules and enhanced RNA interference in retinoblastoma pathway mutants. *Nature* 436: 593-7
166. Wang J, Emadali A, Le Bescont A, Callanan M, Rousseaux S, Khochbin S (2011) Induced malignant genome reprogramming in somatic cells by testis-specific factors. *Biochim Biophys Acta* 1809: 221-5
167. Wassmann B, Pfeifer H, Goekbuget N, Beelen DW, Beck J, Stelljes M, Bornhauser M, Reichle A, Perz J, Haas R, Ganser A, Schmid M, Kanz L, Lenz G, Kaufmann M, Binckebanck A, Bruck P, Reutzel R, Gschaidmeier H, Schwartz S, Hoelzer D, Ottmann OG (2006) Alternating versus concurrent schedules of imatinib and chemotherapy as front-line therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Blood* 108: 1469-77

168. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, Schubeler D (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39: 457-66
169. Wei G, Ni W, Chiao JW, Cai Z, Huang H, Liu D (2011) A meta-analysis of CAG (cytarabine, aclarubicin, G-CSF) regimen for the treatment of 1029 patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Hematol Oncol* 4: 46
170. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JPt, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC (2004) Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306: 269-71
171. Weng AP, Nam Y, Wolfe MS, Pear WS, Griffin JD, Blacklow SC, Aster JC (2003) Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling. *Mol Cell Biol* 23: 655-64
172. Weng XQ, Shen Y, Sheng Y, Chen B, Wang JH, Li JM, Mi JQ, Chen QS, Zhu YM, Jiang CL, Yan H, Zhang XX, Huang T, Zhu Z, Chen Z, Chen SJ (2013) Prognostic significance of monitoring leukemia-associated immunophenotypes by eight-color flow cytometry in adult B-acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J* 3: e133
173. Westbrook CA, Hooberman AL, Spino C, Dodge RK, Larson RA, Davey F, Wurster-Hill DH, Sobol RE, Schiffer C, Bloomfield CD (1992) Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study (8762). *Blood* 80: 2983-90
174. Whitehead VM, Vuchich MJ, Lauer SJ, Mahoney D, Carroll AJ, Shuster JJ, Esseltine DW, Payment C, Look AT, Akabutu J, et al. (1992) Accumulation of high levels of methotrexate polyglutamates in lymphoblasts from children with hyperdiploid (greater than 50 chromosomes) B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 80: 1316-23
175. Williamson R (1970) Properties of rapidly labelled deoxyribonucleic acid fragments isolated from the cytoplasm of primary cultures of embryonic mouse liver cells. *J Mol Biol* 51: 157-68
176. Wong DJ, Liu H, Ridky TW, Cassarino D, Segal E, Chang HY (2008) Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 2: 333-44
177. Xue SL, Cui HX, Zou JY, Xue MX, Tang XW, Zhang YM, Wu DP (2013) Low-dose cytarabine and aclarubicin combined with granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of relapsed or primary refractory acute lymphocytic leukemia: a retrospective study of 25 Chinese patients. *Hematol Oncol*
178. Yanada M, Takeuchi J, Sugiura I, Akiyama H, Usui N, Yagasaki F, Kobayashi T, Ueda Y, Takeuchi M, Miyawaki S, Maruta A, Emi N, Miyazaki Y, Ohtake S, Jinnai I, Matsuo K, Naoe T, Ohno R (2006) High complete remission rate and promising outcome by combination of imatinib and chemotherapy for newly diagnosed BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia: a phase II study by the Japan Adult Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 24: 460-6

179. Yang B, O'Herrin SM, Wu J, Reagan-Shaw S, Ma Y, Bhat KM, Gravekamp C, Setaluri V, Peters N, Hoffmann FM, Peng H, Ivanov AV, Simpson AJ, Longley BJ (2007) *MAGE-A, mMAGE-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. Cancer Res 67: 9954-62*
180. Ye Y, Yin DT, Chen L, Zhou Q, Shen R, He G, Yan Q, Tong Z, Issekutz AC, Shapiro CL, Barsky SH, Lin H, Li JJ, Gao JX (2010) *Identification of Piwi2-like (PL2L) proteins that promote tumorigenesis. PLoS One 5: e13406*
181. Zhu YM, Zhao WL, Fu JF, Shi JY, Pan Q, Hu J, Gao XD, Chen B, Li JM, Xiong SM, Gu LJ, Tang JY, Liang H, Jiang H, Xue YQ, Shen ZX, Chen Z, Chen SJ (2006) *NOTCH1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance and implication in multifactorial leukemogenesis. Clin Cancer Res 12: 3043-9*

Résumé

Les mécanismes épigénétiques, tels que la méthylation et les modifications d'histones, sont impliqués dans le contrôle à grande échelle de l'expression du génôme et contribuent à la mise en place des profils d'expression des gènes spécifiques de tissus et de types cellulaires. Dans les cellules en cours ou en fin de différenciation, ces mécanismes sont aussi impliqués dans la mise en place et le maintien de la répression d'un grand nombre de gènes. La transformation oncogénique est presque toujours associée à des anomalies de la signalisation épigénétique cellulaire, dont certaines, comme les méthylations aberrantes de gènes suppresseurs de tumeur, sont considérées comme des événements oncogènes. Un aspect beaucoup moins étudié de ces dérégulations épigénétiques est l'activation aberrante de gènes tissu-spécifiques dans des cellules pré-cancéreuses et transformées. De nombreuses études rapportent l'activation « hors contexte » de gènes spécifiques du testicule dans plusieurs cancers somatiques. Ces gènes sont décrits sous le nom de gènes « cancer testis » ou C/T. Il a été suggéré que ces expressions illégitimes pourraient être de bons indicateurs des cancers, et fournir de nouvelles cibles pour une immunothérapie anticancéreuse.

Au cours de cette thèse, nous avons développé une approche basée sur ce concept d'activation ectopique de gènes pour identifier les gènes exprimés de manière aberrante dans les lymphoblastes des patients atteints de leucémies lymphoblastiques aiguës (LAL). Nous avons ensuite évalué leur intérêt pour une utilisation comme marqueurs pronostics et de prédiction de la réponse au traitement.

Nous avons ainsi identifié une signature de huit gènes spécifiques de la lignée germinale / cellules souches embryonnaires, exprimés de manière aberrante dans les LAL pédiatriques et adultes : 4 gènes prédictifs de mauvais pronostic et 4 gènes associés à une issue favorable.

Nous avons par la suite montré qu'une combinaison de l'expression de ces 8 gènes peut identifier les formes agressives de LAL chez les enfants ainsi que chez les adultes.

Une étude prospective clinique a mis en évidence que notre système de détection des 8 gènes, basé sur un test RT- qPCR, pourrait aider à prédire la réponse précoce à un traitement (induction) dans un groupe de 31 patients adultes nouvellement recrutés, atteints de LAL.

Enfin, en exploitant notre méthode de classification, nous avons découvert des traits biologiques communs entre les formes agressives de LAL chez les enfants et chez les adultes. Nos données montrent que les formes les plus agressives de LAL présentent les caractéristiques de cellules souches hématopoïétiques au repos. Cette information pourrait être utilisée pour adapter les approches thérapeutiques.

Enfin, en plus de l'amélioration de la détection et du suivi des patients LAL, ce travail a un fort potentiel dans la définition de nouvelles stratégies thérapeutiques ainsi que d'ors et déjà dans les choix thérapeutiques les plus appropriés pour les patients porteurs des formes les plus agressives.

Abstract

Epigenetic mechanisms such as methylation and histone modifications are involved in large-scale control of the expression of the genome and contribute to the development of specific gene expression profiles of tissues and cell types. In cells, during and after differentiation, these mechanisms are also involved in the establishment and maintenance of the repression of many genes. Oncogenic transformation is almost always associated with abnormalities of cellular epigenetic signalling, some of which, such as aberrant methylation of tumour suppressor genes, are considered as oncogenic events. One much less studied aspect epigenetic deregulations, is the aberrant activation of tissue-specific genes in pre-cancerous and transformed cells. Many studies have reported the "out of context" activation of specific testicular genes in several somatic cancers. These genes are described as the "cancer / testis" genes or C/T. It has been suggested that these illegitimate expressions could be good indicators of cancer and provide new targets for cancer immunotherapy.

In this thesis, based on the concept of ectopic activation of genes, we have identified genes aberrantly expressed in lymphoblasts of patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). We have then assessed their potential for a use as markers for prognosis and prediction of treatment response.

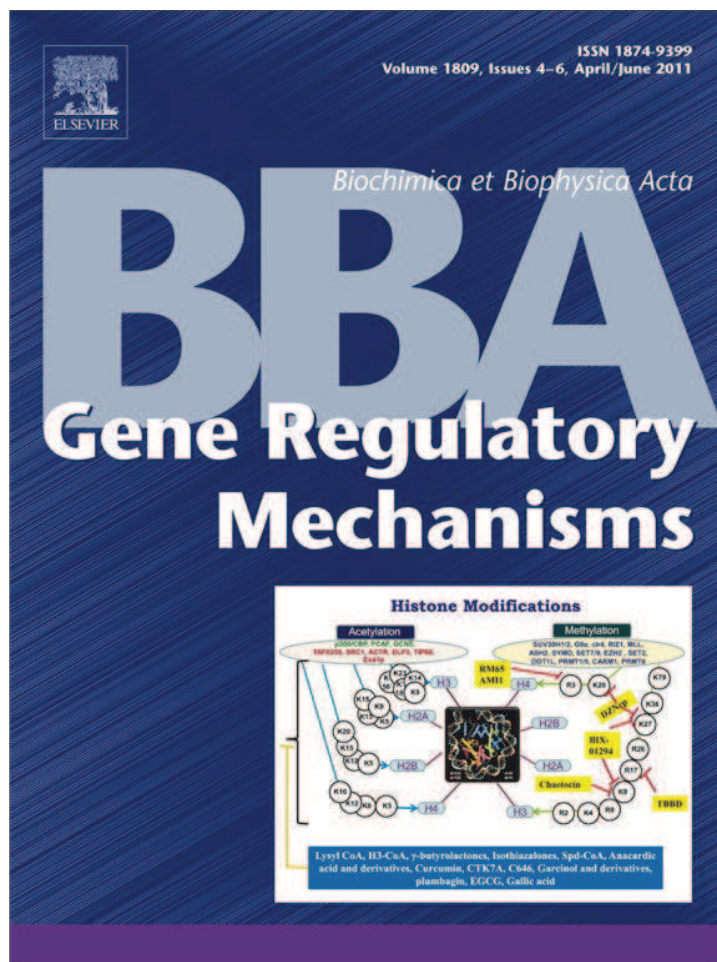
We have identified a signature of eight genes specific of germline/embryonic stem cells, aberrantly expressed in adult and paediatric ALL. The ectopic activation of four genes was predictive of poor prognosis and the expression of four other genes was associated with a favourable outcome.

We have subsequently shown that the combination of the expression of these eight genes can identify aggressive forms of ALL in children and adults.

A prospective clinical study showed that a test based on the detection of these 8 genes, by RT- qPCR could help predicting an early response to treatment (induction) in a group of 31 newly recruited ALL adult patients.

Finally, using our classification method, we discovered common biological traits between aggressive forms of ALL in children and adults. Our data show that the most aggressive forms of ALL have characteristics of dormant hematopoietic stem cells. This information could be used to refine therapeutic approaches.

Finally, in addition to improving the detection and monitoring of ALL patients, this work has great potentials in the definition of new therapeutic strategies as well as in the choice of the most appropriate therapeutic approaches for patients with aggressive forms of ALL.





Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagrm

Review

Induced malignant genome reprogramming in somatic cells by testis-specific factors

Jin Wang^{a,b}, Anouk Emadali^{c,d,e}, Aurore Le Bescont^a, Mary Callanan^{a,f},
Sophie Rousseaux^a, Saadi Khochbin^{a,*}^a INSERM, U823; Université Joseph Fourier - Grenoble 1; Institut Albert Bonniot, Grenoble, F-38706, France^b State Key Laboratory of Medical Genomics, Shanghai Institute of Hematology, Department of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China^c CEA, IRTSV, Laboratoire Biologie à Grande Echelle, F-38054 Grenoble, France^d INSERM, U1038, F-38054 Grenoble, France^e Université Joseph Fourier, Grenoble 1, F-38000, France^f Onco-Hematology Genetics Laboratory, Plateforme hospitalière de génétique moléculaire des cancers, Grenoble University Hospital Centre, Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2011

Received in revised form 4 April 2011

Accepted 6 April 2011

Available online 21 April 2011

Keywords:

BRD4-NUT

NUT

BRDT

ATAD2

iPS

ABSTRACT

Germline cell differentiation is controlled by a specific set of genes whose expression is tightly locked into the repressed state in somatic cells. Large-scale epigenome alterations, now evidenced in nearly all cancers, lead to aberrant activation of these normally silenced genes, as attested by the many reports describing the expression of testis-specific factors, known as cancer-testis genes, in various cancer cells. Here, based on the literature, we argue that off-context activity of some of the testis-specific epigenome regulators can reprogram the somatic cell epigenome toward a malignant state by favoring self-renewal and sustaining cell proliferation under stressful conditions, thereby constituting a major oncogenic mechanism.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

A multistep genome reprogramming process marks the generation and maturation of male germ cells [1–3]. A genome-wide demethylation and remethylation characterizes the first steps of the male genome programming when gene promoters and regulatory elements acquire their male-specific profile of methylation as well as chromatin modifications [1]. It is however the haploid post-meiotic genome that undergoes the most dramatic reprogramming characterized by an almost genome-wide displacement of histones and successive assembly of transition proteins and protamines [4]. Indeed, during this process the universal mode of genome packing in eukaryotes, based on nucleosomes, is drastically altered by transition to a new form of DNA compaction using small basic proteins, called protamines. Although these post-meiotic changes are of key importance for procreation and constitute an essential step in the life cycle, most of the mechanisms controlling the establishment of the male gamete genome remain obscure [5]. Taking into account the published investigations, it is however possible to highlight two essential events in male genome reprogramming which both aim at inducing large-scale destabilization of the “somatic type” genome organization. First, considerable amounts of testis-specific histone variants are synthesized and incorporated in

meiotic and post-meiotic stages. Most of these histones have been shown to induce nucleosome instability. Additionally, just before replacement, a massive histone hyperacetylation also occurs that contributes to chromatin relaxation [4]. Finally, these events as well as the subsequent chromatin disassembly and genome repackaging are hypothesized to be controlled by a variety of testis-specific factors. Although some of them are in the course of identification, many remain to be discovered and functionally characterized [5].

Drastic and genome-wide alterations of the epigenome have now been shown to occur almost without exception in cancer cells [6]. General loss of DNA methylation, as well as of specific histone marks associated with aberrant gain of methylation of some of the CpG islands, appear now as universal hallmarks of oncogenesis [7]. These modifications are expected to profoundly impact gene expression leading to unscheduled gene repression and activation. The oncogenic consequences of aberrant methylation of critical genes such as tumor suppressors have been under intense investigations by many laboratories [8]. In contrast, little attention has been paid to unprogrammed gene activation in cancer cells. Over the last twenty years, investigators looking for tumor specific antigens, have noticed in cancer cells, the abnormal expression of a group of genes which are normally expressed in male germ cells [9]. Some investigations showed that epigenetic mechanisms control their repression in normal somatic cells and concluded hence that their activation reflects the alteration of these mechanisms in somatic cells [10–12].

* Corresponding author. Tel.: +33 4 76 54 95 83; fax: +33 4 76 54 95 95.

E-mail address: khochbin@ujf-grenoble.fr (S. Khochbin).

Despite increasing reports in the literature of testis-specific genes de-repression in many different types of cancers, little is known on the impact of their off-context activity on malignant cell transformation [12].

Since some of these testis-specific genes encode potent epigenetic regulators that play a critical role in the male genome reprogramming [5], we would like to propose that aberrant activation of these factors in the course of somatic cell transformation could target the cell epigenome for abnormal re-programming events that would drive the emergence of fully transformed cancer cell clones.

2. Germ cell epigenetic regulators activated in somatic cancer cells

Although current research is far from providing a comprehensive picture of the epigenetic regulators that mediate the establishment of the germ cell epigenome, some of the determinant factors have been already identified [5] and all of these have been shown to be aberrantly activated in cancer cells [12]. Among these factors, Dnmt3L, a catalytically inactive member of DNA methyltransferases, can be mentioned. Dnmt3L interacts with *de novo* DNA methyltransferases Dnmt3a/3b and by stimulating their catalytic activities, plays an important role in the establishment of DNA methylation on retroposon and that of germ cell-specific genomic loci [13].

Dnmt3L has been shown to be aberrantly activated in a variety of cancers, where due to its ability to enhance the activity of the *de novo* DNA methyltransferases, it could contribute to CpG island methylation and pathological gene silencing [14].

Besides factors involved in DNA methylation, germ cells also express specific histone code readers. Brdt, a double bromodomain-containing protein, is one such factor that is strictly expressed in male germ cells [15]. The protein is capable of specifically acting on hyperacetylated chromatin and mediates a histone acetylation-dependent chromatin compaction [16]. Interestingly, a recent investigation showed that Bdf1, the Brdt ortholog in yeast, is also required for a histone acetylation-dependent genome compaction during the post-meiotic phases of sporulation [17], confirming therefore the particular role for Brdt/Bdf1 in acetylation-dependent chromatin remodeling. Here again, the unscheduled activation of *BRDT* in somatic cells [18] could lead to a large-scale alteration of acetylated chromatin in cancer cells.

Additionally, functional characterizations of several testis-specific factors expressed off-context in somatic cancer cells suggested that they also could function as epigenome regulators in their physiological setting, in the germ cells. One of these factors is NUT (nuclear protein in testis), encoded by a testis-specific gene, aberrantly activated in a subset of very aggressive carcinoma, known as NUT-Midline Carcinoma (NMC) affecting children and adults of different ages [19]. In this cancer, a chromosomal translocation fuses the double bromodomain protein encoded by the ubiquitous gene, *BRD4*, to almost the complete reading frame of *NUT* and hence taking control of its expression. Recent investigations showed that NUT strongly interacts with histone acetyltransferases (HATs) p300 and considerably stimulates its catalytic activity [20]. These findings also suggested that the normal function of NUT in spermatogenic cells could be the enhancement of the HAT activity of p300/CBP, or other HATs, to contribute to the wave of post-meiotic histone hyperacetylation leading to chromatin relaxation and histone replacement. In NMC cells, BRD4-NUT creates a histone super-acetylator, inducing the formation of hyperacetylated chromatin domains due to a combined action of BRD4's bromodomains and the NUT-mediated stimulation of p300 activity, through a feed-forward mechanism completely affecting the epigenetic landscape of the affected cells [20].

Another factor predominantly expressed in testis and capable of acting on chromatin is ATAD2. The protein harbors an AAA ATPase domain responsible for its multimerization and chromatin binding, as well as a bromodomain. This bromodomain, at least in a testis-specific splice variant, has been shown to specifically bind histone H4 bearing

acetyl-K5. ATAD2 appears to control chromatin dynamics and could also play an important role in male genome reprogramming in post-meiotic stages, when it is abundantly expressed [21]. Surprisingly, ATAD2 is activated in a great number of unrelated somatic cancers and in several cases its over-expression has been shown to correlate with a rapidly fatal outcome [21–23].

Finally, BORIS, a testis-specific paralog of CTCF, has been recently shown to be a critical regulator of other testis-specific genes required for normal spermatogenesis [24]. The illegitimate activation of BORIS affects somatic cell gene expression programs and in some cases could turn on several normally silenced testis-specific genes [25–29].

There are very probably many other important germ cell-specific epigenetic regulators activated in cancer cells but in the absence of more functional insights into the nature of factors involved in male genome reprogramming, they are at the present not identifiable.

3. Cancer-testis factors as mediators of critical transcriptional regulatory circuits in somatic cells

The off-context activity of the above-mentioned factors has the potential to profoundly and globally affect the cell epigenome but there are also several recent investigations reporting the ability of cancer-testis factors to alter the activity of critical cellular transcription factors and hence a specific downstream regulatory pathway. The majority of data on this aspect concerns proteins encoded by the *MAGE* family of cancer-testis genes as regulators of p53 activity. Early works showed that several members of the *MAGE* family can suppress p53-dependent apoptosis in melanoma cell lines [30]. Detailed investigations unraveled the capacity of a specific member, *MAGE-A2*, to recruit HDAC3 and to mediate p53 deacetylation and inactivation after a genotoxic treatment [31]. Additionally, a newly discovered function of *MAGE* family members is the stimulation of RING E3 ubiquitin ligases, which could be responsible for proteasomal degradation of a variety of critical cellular factors. With this respect, the *MAGE-C2-TRIM28* complex has been shown to induce ubiquitination and degradation of p53 [32].

In addition to modulating p53 activity, *MAGE* family members can also affect several unrelated transcriptional regulatory circuits such as those controlled by the androgen receptor (AR). Indeed, *MAGE-11*, another member of the *MAGE* family, has the ability to stimulate the transcriptional activity of this receptor [33]. A master transcription factor also controlled by *MAGE* members is Hif1- α . *MAGE-11*, as well as a closely related member, *MAGE-9*, interact with the major Hif1- α hydroxylating enzyme, PHD2, and reduce its catalytic activity. Prolyl-hydroxylases mediate site-specific hydroxylation of Hif1- α and induce its degradation by proteasome. The aberrant expression of *MAGE-11/9* in tumors therefore leads to the stabilization of Hif1- α and the subsequent stimulation of angiogenesis and glycolytic switch [34]. Finally, *MAGE-A1* through the recruitment of HDAC1 can turn a transcriptional activator, SKIP, into a repressor and hence modify the state of cancer cell gene expression [35].

The p53 gene appears however as a major target of the off-context activity of the C/T factors. Indeed, another member of C/T factors, *CAGE* has been recently shown to use HDAC2 to repress p53 gene expression in melanoma cell lines and thus confers resistance to drug-induced apoptosis [36]. The off-context activity of NUT, in fusion with BRD4 also affects p53 functions through the sequestration of CBP/p300 into BRD4-NUT foci, which hinders the activation of p53 in response to genotoxic treatments [20].

Like *MAGE* members, both NUT and *CAGE* also control critical transcriptional circuits. A recent work showed that a matrix metalloproteinase, MMP-2 could be induced through the action of *CAGE* on the NF- κ B and AP1 transcriptional pathways [37]. NUT in fusion with BRD4 titers out CBP/p300 and has the potential to affect the expression of numerous genes controlled by these HATs [20].

Cancer-testis factors could also turn on a cell proliferation program. Indeed, the C/T factor CAGE, has been reported to use AP-1 and E2F-1 transcription factors to activate D1 and E-type cyclins, thus enhancing G1 to S phase progression [38]. Interestingly, ATAD2 also turns on a proliferation program in cancer cells upon its aberrant activation. ATAD2 activity as a master regulator of cell proliferation is two fold: it cooperates with critical factors such as Myc [22] and E2F-1 [39] and it specifically or globally affects gene expression by modifying the expression of MLL and EZH2 histone methyltransferases.

Finally, the aberrant activation of testis-specific small RNA systems in cancer cells also represents an important mechanism for global or specific alterations of gene expression in transformed cells. For instance, *PIWIL2*, a member of PIWI/AGO gene family, specifically expressed in testis, has been shown to be ectopically expressed in a variety of cancers [40–42]. Interestingly, *PiwiL2* behaves as a potent oncogene and its ectopic expression alone is sufficient to induce the transformation of fibroblasts using a mechanism involving the anti-apoptotic factor Bcl-X(L) and Stat3 transcription factor [41,43].

3.1. Ectopic expression of testis-specific genes derives a soma-to-germline transformation

As discussed in this review, several key transcriptional regulators such as ATAD2, CAGE and *PIWIL2* could activate a cell proliferation-related gene expression program, but taking into account the properties of some the testis-specific epigenetic factors activated in cancer cells, one can hypothesize that their action could also turn on a specific developmental program. This hypothesis has very recently received important support from a work describing the ectopic expression of germline genes in malignant brain tumors generated in drosophila [44]. Indeed, a detailed analysis of cancer-related gene expression in drosophila brain tumors induced after the inactivation of tumor suppressor gene, *l(3)mbt*, showed that about 25% of the activated genes belong to the germ cell transcript repertoire. Several of these genes encode proteins involved in piRNA pathways and probably account for the ectopic expression of small RNAs, which are

normally present in ovaries, in these brain tumors. Interestingly, *vasa*, a component of a germ cell RNA-processing organelle, *nuage*, is among the ectopically expressed genes. This is highly relevant to the activation of germ cell gene expression, since it has recently been shown that the ectopic expression of the chicken *vasa* homolog, *Cvh*, mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to germ cell fate [45]. This action of *Cvh* was strongly stimulated when a testis-specific microRNA, miR-34c, was co-expressed with *Cvh*. Additionally, miR-34c seems to be sufficient to turn on a germline gene expression program when expressed alone in HeLa cells [46].

Here again, as in the case of the C/T factors discussed above, several of these germ cell genes ectopically expressed in the drosophila brain tumors, have been shown to be responsible for the tumor growth, indicating that in addition to the germline genes they can also turn on a proliferation program.

Although it appears beyond doubt that the ectopic expression of C/T factors contributes to the cancer-specific pattern of gene expression, it has not been clearly established how and why the germline gene expression program becomes activated in cancer cells. In the case of drosophila [44] as well as *C. elegans* [47,48], the retinoblastoma pathway seems to be important in the repression of germline genes in somatic cells. In vertebrates, the epigenetic landscape, mainly DNA methylation and histone H3 K9 methylation appear important in the repression of these genes [6,12,49]. Germline-specific gene promoter methylation could however be dependent on the activity of a particular transcription factor, E2F6, an Rb-independent transcriptional repressor, which has been shown to be critical in the restriction of testis-specific genes in somatic cells [50] through recognition of a motif common to germline genes and induction of DNA methylation through the action of Dnmt3b [51]. Post-translational SUMO modification of a particular transcription factor, Sp3, has also been shown to be responsible for the repression of spermatocyte-specific genes in somatic cells, which somehow also controls the methylation of these genes [52].

These data suggest that in addition to global epigenetic alterations, the deregulated function of a group of specific factors could lead to the activation of a significant number of germline genes in somatic cells.

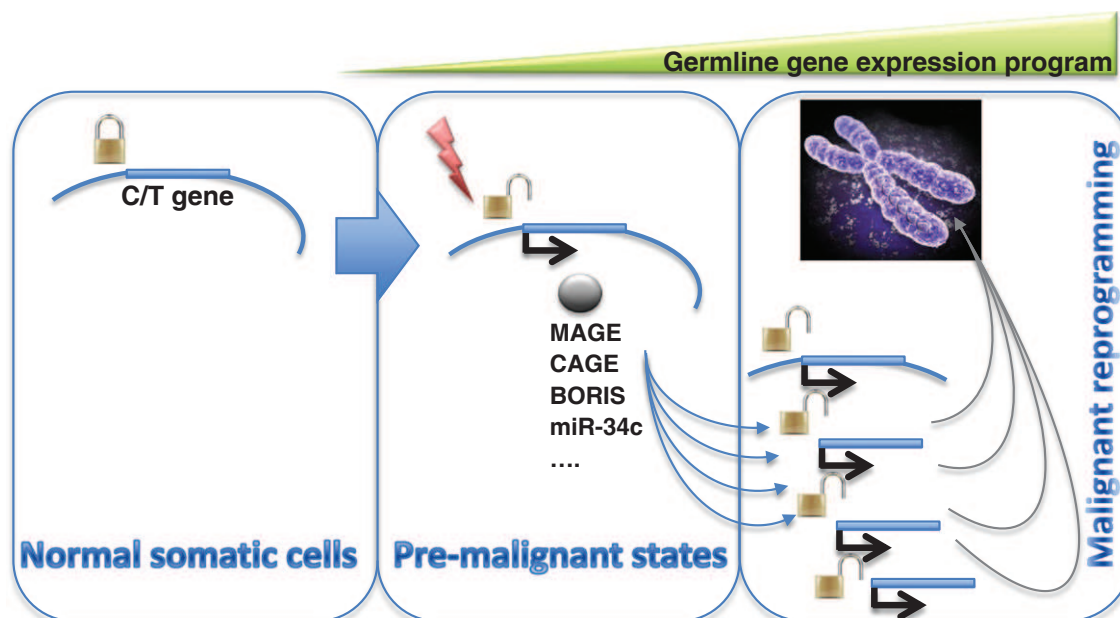


Fig. 1. Somatic cell genome reprogramming to the malignant state by aberrant activation of testis-specific factors. Under transformation-prone conditions, very limited or subtle alterations of gene silencing due to abnormal epigenetic signaling or deregulated activity of specific factors could activate one or several cancer-testis (C/T) gene members whose expression is normally tightly locked into a silenced state in somatic cells. Off-context activity of these factors on critical regulatory circuits would activate anti-apoptotic and proliferative gene expression programs. De-repression of testis-specific epigenome regulators within the C/Ts gene family could further extend epigenetic deregulations in these cells and initiate an amplification process leading to activation of more C/Ts and accentuation of epigenetic alterations leading to complete reprogramming of the affected cell epigenome, toward the malignant state. For an overview of all the known C/T genes and insight into their function, please refer to: <http://www.cta.lncc.br/index.php>.

3.2. Concluding remarks

A direct consequence of large-scale epigenetic alterations now reported in almost all cancers, is the induction of an “identity crisis” in the affected cells due to inappropriate activation of tissue-restricted genes. Analysis of the literature indicates however that there is a tendency toward the activation of the germ cell genetic program in malignant cells [44]. Based on this observation, it can be suggested that germline-specific genes confer a selective advantage in the process of oncogenic transformation. The fact that a subset of testis-specific factors constitutes very potent epigenome regulators, could at least in part explain why the ectopic expression of testis-specific genes could confer a selective advantage.

Indeed, the expression of factors such as testis-specific histone variants, which almost systematically induce nucleosome instability [4], could trigger secondary alterations, globally affecting genome organization and the state of epigenome. This is also true for numerous other factors controlling male germ cell genome methylation and chromatin remodeling. An amplification loop mechanism could be hypothesized postulating that limited initial alterations in gene expression leading to the derepression of potent testis-specific epigenome regulators could initiate a cascade of aberrant gene activations due to successive waves of gene activation/repression and epigenome alteration cycles (Fig. 1). The germline program could then become a preferential target for activation, since most of the corresponding genes present a very distinct epigenetic status in somatic cells [53], and would thus constitute a pool of genes that would be particularly sensitive to global epigenetic alterations.

Additionally, some of the testis-specific factors could act as master regulators controlling the expression of other germline genes. An example is the ectopic activation of *miR-34c* and *vasa*, which in turn could activate many other spermatogenic genes [45,46]. The primary deregulation of such genes could therefore also account for the turning on of a spermatogenic program, which in the context of somatic cells, would confer considerable growth advantages particularly under highly unfavorable or stressful conditions.

Acknowledgments

This review corresponds to a research project supported by INCa-DHOS in J. Garin, MC and SK laboratories and by ARC and ANR in SK laboratory. AE is a recipient of a post-doctoral fellowship by INCa-DHOS (JG laboratory). JW's work is supported by a grant from the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (09540700800).

References

- [1] S. Rousseaux, C. Caron, J. Govin, C. Lestrat, A.-K. Faure, S. Khochbin, Establishment of male-specific epigenetic information, *Gene* 345 (2005) 139–153.
- [2] F. Boussouar, S. Rousseaux, S. Khochbin, A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code, *Cell Cycle* 7 (2008) 3499–3502.
- [3] J. Govin, C. Caron, C. Lestrat, S. Rousseaux, S. Khochbin, The role of histones in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 3459–3469.
- [4] J. Gaucher, N. Reynoird, E. Montellier, F. Boussouar, S. Rousseaux, S. Khochbin, From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance, *FEBS J.* 277 (2010) 599–604.
- [5] S. Rousseaux, F. Boussouar, J. Gaucher, N. Reynoird, E. Montellier, S. Curtet, A.-L. Vitte, S. Khochbin, Molecular models for post-meiotic male genome reprogramming, *Syst. Biol. Reprod. Med.* 57 (2011) 50–53.
- [6] M. Berdasco, M. Esteller, Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry, *Dev. Cell* 19 (2010) 698–711.
- [7] M. Esteller, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps, *Nat. Rev. Genet.* 8 (2007) 286–298.
- [8] N. Sincic, Z. Herceg, DNA methylation and cancer: ghosts and angels above the genes, *Curr. Opin. Oncol.* 23 (2011) 69–76.
- [9] A.J.G. Simpson, O.L. Caballero, A. Jungbluth, Y.-T. Chen, L.J. Old, Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer, *Nat. Rev. Cancer* 5 (2005) 615–625.
- [10] A.R. Karpf, D.A. Jones, Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer, *Oncogene* 21 (2002) 5496–5503.
- [11] A.R. Karpf, Epigenomic reactivation screening to identify genes silenced by DNA hypermethylation in human cancer, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9 (2007) 231–241.
- [12] S. Rousseaux, S. Khochbin, New hypotheses for large-scale epigenome alterations in somatic cancer cells: a role for male germ-cell-specific regulators, *Epigenomics* 1 (2009) 153–161.
- [13] R.J. Klose, A.P. Bird, Genomic DNA methylation: the mark and its mediators, *Trends Biochem. Sci.* 31 (2006) 89–97.
- [14] G. Gokul, G. Ramakrishna, S. Khosla, Reprogramming of HeLa cells upon DNMT3L overexpression mimics carcinogenesis, *Epigenetics* 4 (2009) 322–329.
- [15] C. Pivot-Pajot, C. Caron, J. Govin, A. Vion, S. Rousseaux, S. Khochbin, Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 5354–5365.
- [16] J. Morinière, S. Rousseaux, U. Steuerwald, M. Soler-López, S. Curtet, A.-L. Vitte, J. Govin, J. Gaucher, K. Sadoul, D.J. Hart, J. Krijgsveld, S. Khochbin, C.W. Müller, C. Petosa, Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain, *Nature* 461 (2009) 664–668.
- [17] J. Govin, J. Schug, T. Krishnamoorthy, J. Dorsey, S. Khochbin, S.L. Berger, Genome-wide mapping of histone H4 serine-1 phosphorylation during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 4599–4606.
- [18] M.J. Scanlan, N.K. Altorki, A.O. Gure, B. Williamson, A. Jungbluth, Y.T. Chen, L.J. Old, Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, *Cancer Lett.* 150 (2000) 155–164.
- [19] C.A. French, C.L. Ramirez, J. Kolmakova, T.T. Hickman, M.J. Cameron, M.E. Thyne, J. L. Kutok, J.A. Toretsky, A.K. Tadavarthy, U.R. Kees, J.A. Fletcher, J.C. Aster, BRD-NUT oncoproteins: a family of closely related nuclear proteins that block epithelial differentiation and maintain the growth of carcinoma cells, *Oncogene* 27 (2008) 2237–2242.
- [20] N. Reynoird, B.E. Schwartz, M. Delvecchio, K. Sadoul, D. Meyers, C. Mukherjee, C. Caron, H. Kimura, S. Rousseaux, P.A. Cole, D. Panne, C.A. French, S. Khochbin, Oncogenesis by sequestration of CBP/p300 in transcriptionally inactive hyperacetylated chromatin domains, *EMBO J.* 29 (2010) 2943–2952.
- [21] C. Caron, C. Lestrat, S. Marsal, E. Escoffier, S. Curtet, V. Viroille, P. Barbry, A. Debernardi, C. Brambilla, E. Brambilla, S. Rousseaux, S. Khochbin, Functional characterization of ATAD2 as a new cancer/testis factor and a predictor of poor prognosis in breast and lung cancers, *Oncogene* 29 (2010) 5171–5181.
- [22] M. Ciró, E. Prosperini, M. Quarto, U. Grazini, J. Walfridsson, F. McBlane, P. Nucifero, G. Pacchiana, M. Capra, J. Christensen, K. Helin, ATAD2 is a novel cofactor for MYC, overexpressed and amplified in aggressive tumors, *Cancer Res.* 69 (2009) 8491–8498.
- [23] E.V. Kalashnikova, A.S. Revenko, A.T. Gemo, N.P. Andrews, C.G. Tepper, J.X. Zou, R. D. Cardiff, A.D. Borowsky, H.-W. Chen, ANCCA/ATAD2 overexpression identifies breast cancer patients with poor prognosis, acting to drive proliferation and survival of triple-negative cells through control of B-Myb and EZH2, *Cancer Res.* 70 (2010) 9402–9412.
- [24] T. Suzuki, N. Kosaka-Suzuki, S. Pack, D.M. Shin, J. Yoon, S. Abdullaev, E. Pugacheva, H.C. Morse III, D. Loukinov, V. Lobanenko, Expression of a testis-specific form of Gal3st1 (CST), a gene essential for spermatogenesis, is regulated by the CTCF paralogous gene BORIS, *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 2473–2484.
- [25] E.M. Klenova, H.C. Morse, R. Ohlsson, V.V. Lobanenko, The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer, *Semin. Cancer Biol.* 12 (2002) 399–414.
- [26] L. Sun, L. Huang, P. Nguyen, K.S. Bish, G. Bar-Sela, A.S. Ho, C.M. Bradbury, W. Yu, H. Cui, S. Lee, J.B. Trepel, A.P. Feinberg, D. Gius, DNA methyltransferase 1 and 3B activate BAG-1 expression via recruitment of CTCF/BORIS and modulation of promoter histone methylation, *Cancer Res.* 68 (2008) 2726–2735.
- [27] S. Vatolin, Z. Abdullaev, S.D. Pack, P.T. Flanagan, M. Custer, D.I. Loukinov, E. Pugacheva, J.A. Hong, H. Morse III, D.S. Schrupp, J.I. Risinger, J.C. Barrett, V.V. Lobanenko, Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes, *Cancer Res.* 65 (2005) 7751–7762.
- [28] J.A. Hong, Y. Kang, Z. Abdullaev, P.T. Flanagan, S.D. Pack, M.R. Fischette, M.T. Adnani, D.I. Loukinov, S. Vatolin, J.I. Risinger, M. Custer, G.A. Chen, M. Zhao, D.M. Nguyen, J.C. Barrett, V.V. Lobanenko, D.S. Schrupp, Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells, *Cancer Res.* 65 (2005) 7763–7774.
- [29] Y. Kang, J.A. Hong, G.A. Chen, D.M. Nguyen, D.S. Schrupp, Dynamic transcriptional regulatory complexes including BORIS, CTCF and Sp1 modulate NY-ESO-1 expression in lung cancer cells, *Oncogene* 26 (2007) 4394–4403.
- [30] B. Yang, S. O'Herrin, J. Wu, S. Reagan-Shaw, Y. Ma, M. Nihal, B.J. Longley, Select cancer testis antigens of the MAGE-A, -B, and -C families are expressed in mast cell lines and promote cell viability in vitro and in vivo, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 267–275.
- [31] M. Monte, M. Simonatto, L.Y. Peche, D.R. Bublik, S. Gobessi, M.A. Pierotti, M. Rodolfo, C. Schneider, MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 11160–11165.
- [32] J.M. Doyle, J. Gao, J. Wang, M. Yang, P.R. Potts, MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases, *Mol. Cell* 39 (2010) 963–974.
- [33] S. Bai, E.M. Wilson, Epidermal-growth-factor-dependent phosphorylation and ubiquitinylation of MAGE-11 regulates its interaction with the androgen receptor, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 1947–1963.
- [34] O. Aprelikova, S. Pandolfi, S. Tackett, M. Ferreira, K. Salnikow, Y. Ward, J.I. Risinger, J.C. Barrett, J. Niederhuber, Melanoma antigen-11 inhibits the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 and activates hypoxic response, *Cancer Res.* 69 (2009) 616–624.

- [35] S. Laduron, R. Deplus, S. Zhou, O. Kholmanskikh, D. Godelaine, C. De Smet, S.D. Hayward, F. Fuks, T. Boon, E. De Plaen, *MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription*, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 4340–4350.
- [36] Y. Kim, H. Park, D. Park, Y.-S. Lee, J. Choe, J.-H. Hahn, H. Lee, Y.-M. Kim, D. Jeoung, *Cancer/testis antigen CAGE exerts negative regulation on p53 expression through HDAC2 and confers resistance to anti-cancer drugs*, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 25957–25968.
- [37] Y. Kim, D. Jeoung, *The cancer/testis antigen CAGE induces MMP-2 through the activation of NF-kappaB and AP-1*, *BMB Rep.* 42 (2009) 758–763.
- [38] E. Por, H.-J. Byun, E.-J. Lee, J.-H. Lim, S.-Y. Jung, I. Park, Y.-M. Kim, D.-I. Jeoung, H. Lee, *The cancer/testis antigen CAGE with oncogenic potential stimulates cell proliferation by up-regulating cyclins D1 and E in an AP-1- and E2F-dependent manner*, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 14475–14485.
- [39] A.S. Revenko, E.V. Kalashnikova, A.T. Gemo, J.X. Zou, H.-W. Chen, *Chromatin loading of E2F-MLL complex by cancer-associated coregulator ANCCA via reading a specific histone mark*, *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 5260–5272.
- [40] J.J. Liu, R. Shen, L. Chen, Y. Ye, G. He, K. Hua, D. Jarjoura, T. Nakano, G.K. Ramesh, C.L. Shapiro, S.H. Barsky, J.-X. Gao, *Piwil2 is expressed in various stages of breast cancers and has the potential to be used as a novel biomarker*, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 3 (2010) 328–337.
- [41] J.H. Lee, D. Schütte, G. Wulf, L. Füzesi, H.-J. Radzun, S. Schweyer, W. Engel, K. Nayernia, *Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway*, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 201–211.
- [42] G. He, L. Chen, Y. Ye, Y. Xiao, K. Hua, D. Jarjoura, T. Nakano, S.H. Barsky, R. Shen, J.-X. Gao, *Piwil2 expressed in various stages of cervical neoplasia is a potential complementary marker for p16*, *Am. J. Transl. Res.* 2 (2010) 156–169.
- [43] Y. Ye, D.T. Yin, L. Chen, Q. Zhou, R. Shen, G. He, Q. Yan, Z. Tong, A.C. Issekutz, C.L. Shapiro, S.H. Barsky, H. Lin, J.J. Li, J.X. Gao, *Identification of Piwil2-like (PL2L) proteins that promote tumorigenesis*, *PLoS One* 5 (2010) e13406.
- [44] A. Janic, L. Mendizabal, S. Llamazares, D. Rossell, C. Gonzalez, *Ectopic expression of germline genes drives malignant brain tumor growth in Drosophila*, *Science* 330 (2010) 1824–1827.
- [45] F. Laval, H. Acloque, E. Bachelard, M.A. Nieto, J. Samarut, B. Pain, *Ectopic expression of Cvh (Chicken Vasa homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate*, *Dev. Biol.* 330 (2009) 73–82.
- [46] F. Bouhallier, N. Allioi, F. Laval, F. Chalmel, M.-H. Perrard, P. Durand, J. Samarut, B. Pain, J.-P. Rouault, *Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis*, *RNA* 16 (2010) 720–731.
- [47] D. Wang, S. Kennedy, D. Conte Jr., J.K. Kim, H.W. Gabel, R.S. Kamath, C.C. Mello, G. Ruvkun, *Somatic misexpression of germline P granules and enhanced RNA interference in retinoblastoma pathway mutants*, *Nature* 436 (2005) 593–597.
- [48] Y. Unhavaithaya, T.H. Shin, N. Miliaras, J. Lee, T. Oyama, C.C. Mello, *MEP-1 and a homolog of the NURD complex component Mi-2 act together to maintain germline-soma distinctions in C. elegans*, *Cell* 111 (2002) 991–1002.
- [49] A.R. Karpf, *A potential role for epigenetic modulatory drugs in the enhancement of cancer/germ-line antigen vaccine efficacy*, *Epigenetics* 1 (2006) 116–120.
- [50] M. Pohlers, M. Truss, U. Frede, A. Scholz, M. Strehle, R.-J. Kuban, B. Hoffmann, M. Morkel, C. Birchmeier, C. Hagemeier, *A role for E2F6 in the restriction of male-germ-cell-specific gene expression*, *Curr. Biol.* 15 (2005) 1051–1057.
- [51] G. Velasco, F. Hube, J. Rollin, D. Neuillet, C. Philippe, H. Bouzinba-Segard, A. Galvani, E. Viegas-Pequignot, C. Francastel, *Dnmt3b recruitment through E2F6 transcriptional repressor mediates germ-line gene silencing in murine somatic tissues*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 9281–9286.
- [52] B. Stielow, I. Kruger, R. Diezko, F. Finkernagel, N. Gillemans, J. Kong-a-San, S. Philipsen, G. Suske, *Epigenetic silencing of spermatocyte-specific and neuronal genes by SUMO modification of the transcription factor Sp3*, *PLoS Genet.* 6 (2010) e1001203.
- [53] M. Weber, I. Hellmann, M.B. Stadler, L. Ramos, S. Paabo, M. Rebhan, D. Schubeler, *Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome*, *Nat. Genet.* 39 (2007) 457–466.

Cancer hallmarks sustained by ectopic activations of placenta/male germline genes

Sophie Rousseaux¹, Jin Wang^{1,2}, and Saadi Khochbin^{1,*}

¹INSERM; U823; Université Joseph Fourier-Grenoble 1; Institut Albert Bonniot; Grenoble, France; ²State Key Laboratory of Medical Genomics; Shanghai Institute of Hematology; Department of Hematology; Ruijin Hospital; Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai, China

The acquisition of at least 8 new biological capabilities by cells characterizes the transformation from normal to malignant states.¹ Accordingly, cancer cells need to reprogram their genome to express these new biological properties. The question is therefore how could such a *de novo* and coherent gene expression program become active and operational?

A loss of the control of genetic stability leading to mutations as well as to minor and major genome rearrangements is very often considered as an essential element in the establishment of the diversity required to set up new functions driving cell transformation. Profound alterations of the cancer cell epigenome also systematically accompany oncogenic transformations and clearly contribute to the establishment of the indispensable cancer gene expression profile and its relative stability over time.² Recent investigations are now demonstrating that cancer cells also largely use their reservoir of normal silent genes to acquire these new biological capabilities by activating a variety of unscheduled gene expression programs. The genes ectopically activated during the process of malignant cell transformation, due to genetic or epigenetic upheavals, have the potential to provide the cells with *de novo* molecular pathways required to develop new capabilities.³ One could postulate that many genes sustaining cancer hallmarks could simply be normal silent genes, present in the genome of all cells, but whose expression is normally restricted to a given cell type or a specific developmental stage. Recently, we demonstrated that male germ cells express the largest number

of tissue-restricted genes, and that many of them become ectopically reactivated in almost any cancer.⁴ Therefore, cells in the course of malignant transformation have the possibility to “open” their male-specific genes “reservoir” to take various building blocks required to achieve new functions. Important questions would then be why do male germ cells use such a large number of specific genes? Why are these genes strictly “locked” in a repressed state in all somatic cells? How could the “out of context” functions of these genes help malignant transformation?

Male germ cells are unique in the whole organism not only because they undergo genome-wide meiotic genes and chromosomes shuffling, but also because they activate a highly specialized genetic program leading to the generation of the only cells capable of leaving their production site to “travel” into the hostile environment of another organism. The acquisition of these extraordinary functions relies on specific genes, among which some are specialized to act on the genome and profoundly alter its organization. In particular, after meiosis, there are specific factors directing a genome-wide histone hyperacetylation, followed by genome-wide histone removal and assembly of new DNA-packaging structures.⁵ Most of the underlying drivers are themselves testis-specific, such as *Brtd*,⁶ and can be aberrantly activated in cancers.⁴ It is hence foreseeable that, among other actions, the ectopic activation of these factors could create a ground for a sustained alteration of the genome/epigenome and a subsequent stably modified state of gene

expression. The use of an elegant model of inducible tumorigenesis recently provided us with a solid basis for this hypothesis. Indeed, in an inducible brain tumor model in *Drosophila*, malignant transformation was not only associated with, but also highly dependent on, the ectopic activation of a variety of germline-specific genes.⁷ In the case of human lung cancers, we observed that, among several hundreds of ectopically activated male and placental specific genes, 26 were tightly associated with the most aggressive and metastasis-prone tumors.⁴ It is not known whether the activation of these genes is actually required to sustain tumor aggressiveness, but it clearly identified tumors presenting striking common features, despite being of various histopathological origins. These aggressive tumors show highly increased expression levels of genes encoding nuclear factors fueling cell proliferation while downregulating genes encoding membrane and signaling factors, many involved in the immune response. This “aggressive” gene expression profile can support at least two of the acquired properties of cancers, i.e., avoiding immune destruction and pushing cell proliferation. It can be therefore predicted that these newly acquired properties directly depend on the underlying ectopically activated genes. Following the hypothesis that cancer cells use the ectopic gene expression to establish new functions, it can be proposed that lung cancer cells become “addicted” to these factors. The situation would be somehow similar to *Drosophila* brain tumors, where cell proliferation becomes dependent on some of the ectopically activated

*Correspondence to: Saadi Khochbin; Email: khochbin@ujf-grenoble.fr

Submitted: 06/24/2013; Accepted: 06/25/2013

<http://dx.doi.org/10.4161/cc.25545>

Comment on: Rousseaux S, et al. *Sci Transl Med* 2013; 5:86ra66; PMID:23698379; <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3005723>

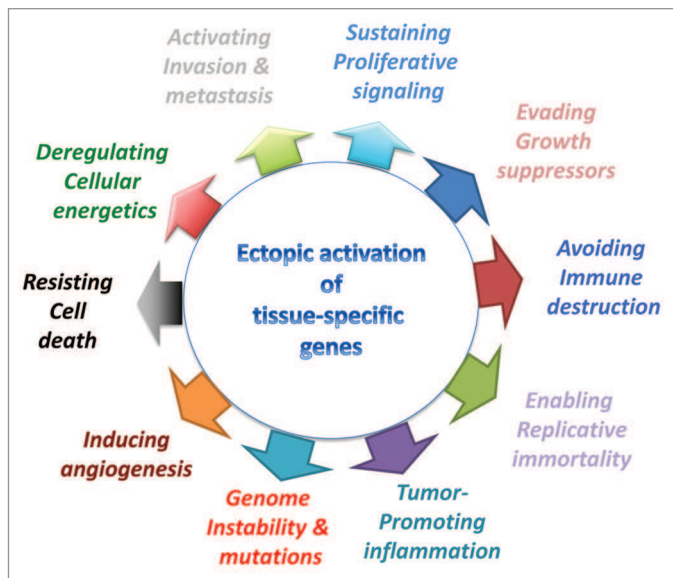


Figure 1. The observation of a large-scale activation of normally silent tissue-specific genes and the demonstration of their critical contribution to the characteristics of malignant cells is at the basis of a working hypothesis, which postulates that the “out of context” activity of various normally silent genes, is essential to support the acquired capabilities of cancer cells. The figure was inspired by Hanahan and Weinberg.¹

germline genes.⁷ The extinction of ectopic gene activations, which very likely help all cancer cells to maintain their malignant states, could therefore be a very promising therapeutic approach. Our very recent work brings a proof of principle

for this hypothesis in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). Indeed, we found that the overexpression of a specific gene, CYCLON, which is normally predominantly expressed in testis, is associated with a poor response to chemotherapy in

combination with the monoclonal therapeutic antibody Rituximab, the current standard treatment for this malignancy. Most, importantly the downregulation of CYCLON by pharmacological means restored sensitivity of the tumor cells to Rituximab.⁸ Therefore, a promising field of research would be the understanding of the mechanisms underlying ectopic gene activations in cancer and the determination of critical elements allowing their extinction. (Fig. 1)

References

1. Hanahan D, et al. Cell 2011; 144:646-74; PMID:21376230; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
2. Shen H, et al. Cell 2013; 153:38-55; PMID:23540689; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.008>
3. Wang J, et al. Biochim Biophys Acta 2011; 1809:221-5; PMID:21530697; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.04.003>
4. Rousseaux S, et al. Sci Transl Med 2013; 5:86ra66; PMID:23698379; <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3005723>
5. Gaucher J, et al. FEBS J 2010; 277:599-604; PMID:20015078; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07504.x>
6. Gaucher J, et al. EMBO J 2012; 31:3809-20; PMID:22922464; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2012.233>
7. Janic A, et al. Science 2010; 330:1824-7; PMID:21205669; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1195481>
8. Emadali A, et al. EMBO Mol Med 2013; PMID:23828858; <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201202034>



Sustaining cancer through addictive ectopic gene activation

Jin Wang^{a,b}, Sophie Rousseaux^a, and Saadi Khochbin^a

Purpose of review

Systematic genetic and epigenetic alterations occurring in almost all cancer cells result in the ectopic expression of a variety of tissue-specific potent regulatory factors. This review sheds light on a new aspect of cancer based on the integration of the 'out of context' activity of tissue-restricted genes into the biology of cancer cells.

Recent findings

A systematic screen for the ectopic activation of tissue-restricted genes in a variety of cancers has revealed that many normally silent genes are expressed in tumours of all origins. This aberrant gene activation not only could be used as a source of biomarkers, but also, in several cases, reveals clear oncogenic mechanisms associated with the corresponding ectopically expressed factors.

Summary

The characteristic of all cancer cells, which systematically reprogram tissue-specific gene expression and activate silent genes, can be exploited to develop new anticancer strategies aiming at the detection of malignant states, the prediction of their evolution and drug sensitivity and the discovery of new therapeutic approaches.

Keywords

ATAD2, BRD4-NUT, bromodomain inhibitors, cancer testis antigen, CYCLON

INTRODUCTION

Malignant cell transformation profoundly disrupts many of the regulatory networks that are responsible for characteristic cell-type gene expression patterns. Dramatic genome alterations, including amplifications, deletions and numerous mutations affecting various genes, have now been reported that surely sustain tumour growth and progression. In addition to these genetic variations, global modifications of epigenetic marks accompany all cancers [1]. Within this frame, most of the investigations so far have focused either on the loss of expression of a specific category of genes, recognized as 'tumour suppressor' genes, due to genetic and/or epigenetic abnormalities, or, in contrast, on the activating mutations, amplification and functional consequences of the upregulation of genes encoding cancer drivers [2]. However, much less attention has been paid on the ectopic activation of normally silent genes. Indeed, in many cases, the expression of tissue-specific factors out of their normal and physiological context has remained unnoticed. In order to detect the aberrant expression of normally silent cell-type-specific genes in cancer cells, not

only a prior definition of physiological gene expression patterns needs to be considered, but also specific criteria should be established to define a threshold for the 'ON/OFF' state of gene expression in a given cancer transcriptome. In many studies, these two parameters have not been taken into account, and therefore ectopic gene activation has remained undetected. Accordingly, the analysis of the literature shows that unprogrammed gene activation has mostly been described sporadically. However, in a few cases, functional investigations were carried out and demonstrated the obvious

^aINSERM, U823, Université Joseph Fourier - Grenoble 1, Institut Albert Bonniot, Grenoble, La Tronche, France and ^bState Key Laboratory of Medical Genomics, Shanghai Institute of Hematology, Department of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China

Correspondence to Saadi Khochbin, INSERM, U823, Université Joseph Fourier - Grenoble 1, Institut Albert Bonniot, Grenoble, F-38700 France. Tel: +33 4 76 54 95 83; fax: +33 4 76 54 95 95; e-mail: khochbin@ujf-grenoble.fr

Curr Opin Oncol 2014, 26:73–77

DOI:10.1097/CCO.000000000000032

KEY POINTS

- Ectopic activation of normally silent tissue-specific genes occurs at a large scale in all cancers.
- Cancer cells 'fish' in their ectopically activated genes reservoir to acquire the required new properties of malignant cells.
- Cancer cells become 'addicted', and hence highly dependent on some of the ectopically activated genes, which could hence be considered as their Achilles heel.

contribution of this ectopic gene expression to oncogenesis, tumour progression and survival [3,4]. Additionally, when the ectopic expression of tissue-restricted genes was systematically investigated, aberrant gene activation was found to occur at a large scale in almost any cancer [5[¶]].

Here, following several examples, we will highlight the concept that the ectopic activity of tissue-specific genes could be determinant in oncogenesis, that they represent a universal source of biomarkers and could guide the development of new therapeutic strategies.

ADDICTIVE ECTOPIC GENE ACTIVATION IN CANCER

Research aiming at the identification of tumour-specific antigens constituted a turning point in revealing the occurrence of the ectopic activation of normal tissue-specific genes in cancers. Indeed, early works in this direction showed that the supposedly tumour antigens were in fact simply normal male germ cell-specific genes that were wrongly expressed in the investigated cancer cells. These observations fired dedicated research programs on their use as biomarkers and immunotherapeutic strategies [3]. Although the search for ectopic activation of additional testis-specific genes in cancers continued, other groups reported the unprogrammed expression of genes, in different cancer types, that are normally expressed in embryos and during development [6] or in a variety of adult and differentiated cells, ranging from neurons [5[¶],7] to megakaryocytes/platelets [8]. Taken together, these observations suggest that cancer cells face a severe loss of identity by expressing a variety of normally silent tissue-specific genes.

Although the initial gene activation occurring during malignant transformation as a result of the inability of cancer cells to efficiently maintain gene silencing could be stochastic, at later stages of tumour progression, the stable ectopic expression of these genes could reflect a selection of those

helping oncogenesis. Indeed, cancer cells need to acquire many new capabilities to face the numerous challenges associated with changes in cell metabolism, the need to migrate out of the original tissue and to nest and survive in new environments and so on... [2].

The hypothesis postulating that the product of some of the ectopically activated genes could become indispensable to ensure the new requirements of cancer cells, implies that there must be a relationship between the ectopic activation of each of these genes and tumour aggressiveness. Interestingly, the use of an inducible brain tumour model system in drosophila brought an unquestionable support to this hypothesis. It showed that 25% of the cancer-related upregulated genes are in fact normal germline genes ectopically activated and that tumour cell growth becomes highly dependent on the out of context activity of these genes [9]. In addition, focusing on the specific case of human lung cancer, we demonstrated that 26 male germline and placenta-specific genes can predict very aggressive metastasis-prone tumours [5[¶]]. Although this latter work did not show how cancer cells become dependent on this ectopic gene expression, our ability to identify such a homogeneous group of aggressive cancers, independently from the other clinical, pathological or molecular characteristics, allowed us to discover their most prominent molecular features. These include their embryonic stem cell/germline nature, a high proliferation ability and a loss of genes ensuring immune response, cell interactions and signalling capabilities. The examples discussed below strongly suggest that, among the ectopically activated genes, several should be playing pivotal roles in the establishment and maintenance of the malignant state.

ONCOGENESIS THROUGH ECTOPIC ACTIVATION OF GERMLINE GENES

The consideration of published work in fact strongly supports this hypothesis and shows how, in the few studied cases, the out of context activity of a factor can be essential in promoting oncogenesis. The important point that emerges is that each of these ectopically activated genes could contribute to oncogenesis depending on its intrinsic molecular characteristics, that is enzymatic activity, structural function and so on... In most studies, however, the precise impact of the out of context activity of these germline genes has not been identified. For instance, in the drosophila tumour system discussed above [9], although the ectopically activated germline genes have been shown to fuel cell proliferation, the underlying molecular basis of their action remains obscure. In a few reports, molecular

investigations have revealed possible oncogenic mechanisms for the ectopically activated genes. Most of the data concern the MAGE family of cancer/testis antigens, which have been shown to control P53 pathways as well as hypoxia-inducible factor 1- α stability [4]. It is, therefore, important to continue the basic research on the functional characterization of all the germline-specific regulators in order to better apprehend their contribution to malignant transformation upon their ectopic activation. Indeed, with the advent of a new generation of epigenetic drugs, namely inhibitors of the bromodomain and extra-terminal (BET) family, it is possible to counteract their oncogenic activities [10]. The testis-specific member of this family, bromodomain testis-specific (BRDT), drives specific meiotic and postmeiotic gene expression programs [11]. The molecular investigation of BRDT's functions in its physiological setting could help us to better understand its oncogenic potentials when ectopically activated [3,4], and hence give an indication for the use of BET inhibitors as a therapeutic strategy. With this regard, an example is the determinant contribution of a testis-specific factor, NUT, to the oncogenic activity of the BRD4-NUT fusion protein following a t(15;19)(q13;p13) chromosomal translocation. BRD4-NUT is responsible for a deadly cancer affecting children and adults known as NUT midline carcinoma (NMC) [12]. A molecular dissection of BRD4-NUT activity revealed a cooperation between the bromodomain of BRD4 (a nontissue restricted member of the BET family) and NUT in creating hyperacetylated transcriptionally inactive chromatin domains (Fig. 1). BRD4-NUT, upon its binding to acetylated chromatin, recruits CREB-binding protein (CBP/p300), stimulates their enzymatic histone acetyltransferase activity, and hence initiates a cycle of feed-forward histone acetylation and BRD4-NUT recruitment leading to the creation of hyperacetylated chromatin foci. These foci trap many critical cellular factors, including CBP and p300, required for proper cell response to various stimuli, which are indispensable for cell differentiation or to induce apoptosis following genotoxic treatments [13]. The identification of these molecular mechanisms provides, therefore, a rationale for the design of efficient therapeutic approaches based on the use of either a bromodomain inhibitor or histone-deacetylase (HDAC) inhibitors [14,15]. Indeed, the creation of BRD4-NUT foci was shown to require BRD4 bromodomains as a mutation in a BRD4 bromodomain abolished the formation of foci [13]. Additionally, HDAC inhibitors, by inducing a genome-wide hyperacetylation, mediate the dispersion of BRD4-NUT foci and a nontargeted binding of BRD4-NUT all over the genome [13]. In

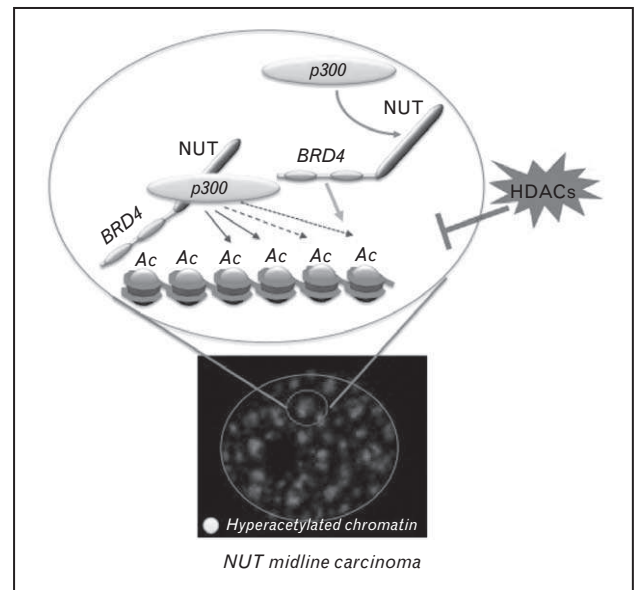


FIGURE 1. Oncogenesis through the out of context activity of a testis-specific factor. A chromosomal translocation fuses the testis-specific gene *NUT* to the ubiquitously-expressed gene *BRD4*. The resulting protein BRD4-NUT acts as a histone 'hyperacetylator' due to the ability of NUT to recruit CBP/p300 and to highly stimulate their histone acetyltransferase activity, and due to the bromodomains of BRD4 that target this activity to the initially acetylated chromatin regions. The fusion protein initiates a loop of feed-forward chromatin acetylation whose propagation is stopped by cellular HDACs. The discovery of this molecular mechanism indicates that both the inhibition of HDACs and the inhibition of BRD4 bromodomains should lead to the dispersion of BRD4-NUT and the restoration of cell response to various stimuli. HDACs, histone-deacetylases.

both cases, the dispersion of BRD4-NUT releases the trapped regulatory factors and restores cell differentiation or stress response.

Another factor normally predominantly expressed in male germ cells that becomes almost systematically activated in a large variety of cancer types is ATAD2, which bears a bromodomain and an AAA ATPase domain [16]. ATAD2 over-expression is clearly associated with poor prognosis in both lung and breast cancer. Although ATAD2's role has not been precisely unravelled, the protein is shown to cooperate with critical transcription factors such as Myc, E2F and androgen and estrogen receptors in controlling target gene activity and cell proliferation. Because of the fact that ATAD2 is found over-expressed in many cancers, it can be proposed that ATAD2 out of context activity, whatever its function is, constitutes an essential element in the malignant reprogramming of the affected cells. On the basis of these data, ATAD2 could be considered as an attractive target as its two functional domains,

a bromodomain and an AAA ATPase domain, could potentially be blocked by small molecule inhibitors [16].

Following these examples, it is clear that the out of context activity of germline genes is a significant event in malignant cell transformation.

TARGETING THE ECTOPICALLY EXPRESSED GENES AS A THERAPEUTIC APPROACH

The investigations from our laboratory and the few reported examples from the literature mentioned above, led us to propose that the ectopic gene activation occurring in almost all cancers [5[■]] should contribute to all types of malignant transformation. A recent example highly strengthens this hypothesis. We designed a transcriptome-powered targeted proteomics screen to find abundant ectopically expressed proteins in B-cell lymphoma, which led to the identification of CYCLON, a nuclear factor of unknown function that is normally predominantly expressed in testis. This work demonstrated that CYCLON is critical in sustaining aggressive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) proliferation [17[■]]. The state-of-care treatment of DLBCL combines rituximab, an anti-CD20 therapeutic antibody, with a cytotoxic chemotherapy, but resistance to this treatment exists and is responsible for the failure in the expected clinical response in a number of patients [18]. Our work [17[■]] showed that CYCLON is a factor conferring resistance to this therapeutic protocol. Interestingly, as in certain lymphoma, CYCLON is activated by MYC, the downregulation of the latter by the small molecule inhibitor of BET bromodomain factors, JQ1, also downregulated CYCLON and restored cell sensitivity to rituximab [17[■]]. These findings now open the way for a strategy to increase the efficiency of the response to a rituximab treatment. Additionally, another BET bromodomain inhibitor, named iBET, is now in clinical trial for NMC [19].

The use of ectopically activated genes as markers could also lead to new therapeutic strategies. Indeed, a recent work from our laboratory demonstrated that the ectopic activation of a subset of 26 testis and placenta-specific genes identifies a group of highly aggressive lung tumours independently from all histo-pathological and clinical parameters. A supervised comparison of their transcriptomic profile with that of less aggressive lung tumours showed a very characteristic state of gene expression associated with these highly aggressive tumours. Exploring the corresponding gene set enrichment data (gene set enrichment analysis) showed that the upregulated genes encode for nuclear factors, normally expressed in embryonic stem and germ

cells that are drivers of cell proliferation [5[■]]. The most interesting aspect of these analyses is that they also show that specific drugs can potentially counteract this state of expression. Therefore, new strategies could be proposed based on the ability of drugs to shift the aggressive gene expression profile towards a normal-like situation. Our work highlighted examples in which the treatments of lung cancer cell lines with the ras inhibitor Salirasib or with Aplidin could potentially attenuate the aggressive gene expression profile [5[■]].

Hence, elucidating the molecular functions of ectopically active genes, either in their physiological context or in cancer cells, should pave the way for innovative therapeutic strategies and approaches.

CONCLUSION

The integration of the concept of systematic ectopic activation of tissue-restricted genes in the biology of cancer opens a door not only to a better understanding of cancer, but also to innovative and more efficient therapeutic strategies. Indeed, beyond an interest in these genes as potential biomarkers, they also could be used as targets in anticancer approaches. Any druggable enzymatic activity or specific domain present in these ectopically activated genes could provide ideal targets as specific small molecule inhibitors would only affect germ cells and cancer cells. Additionally, the understanding of the epigenetic mechanisms responsible for their silencing could also provide additional strategies to restore the silencing of the ectopically activated genes, hence depriving cancer cells from their crutches, and severely crippling their acquired abilities.

Acknowledgements

None.

Conflicts of interest

The work in Shanghai is supported by a grant from the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (12410705400). This program is also supported by grants from INCa and ANR EpiSperm programs to SK.

There are no conflicts of interest.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Shen H, Laird PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* 2013; 153:38–55.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646–674.

3. Rousseaux S, Khochbin S. New hypotheses for large-scale epigenome alterations in somatic cancer cells: a role for male germ-cell-specific regulators. *Epigenomics* 2009; 1:153–161.
 4. Wang J, Emadali A, Le Bescont A, *et al.* Induced malignant genome reprogramming in somatic cells by testis-specific factors. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1809:221–225.
 5. Rousseaux S, Debernardi A, Jacquiau B, *et al.* Ectopic activation of germline and placental genes identifies aggressive metastasis-prone lung cancers. *Sci Transl Med* 2013; 5:186ra166.
- This study demonstrates the occurrence of large-scale ectopic activation of tissue-restricted genes in various types of human cancer.
6. Naxerova K, Bult CJ, Peaston A, *et al.* Analysis of gene expression in a developmental context emphasizes distinct biological leitmotifs in human cancers. *Genome Biol* 2008; 9:R108.
 7. Relogio A, Ben-Dov C, Baum M, *et al.* Alternative splicing microarrays reveal functional expression of neuron-specific regulators in Hodgkin lymphoma cells. *J Biol Chem* 2005; 280:4779–4784.
 8. Timar J, Tovari J, Raso E, *et al.* Platelet-mimicry of cancer cells: epiphenomenon with clinical significance. *Oncology* 2005; 69:185–201.
 9. Janic A, Mendizabal L, Llamazares S, *et al.* Ectopic expression of germline genes drives malignant brain tumor growth in *Drosophila*. *Science* 2010; 330:1824–1827.
 10. Muller S, Filippakopoulos P, Knapp S. Bromodomains as therapeutic targets. *Expert Rev Mol Med* 2011; 13:e29.
 11. Gaucher J, Boussouar F, Montellier E, *et al.* Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J* 2012; 31:3809–3820.
 12. French CA. Pathogenesis of NUT midline carcinoma. *Annu Rev Pathol* 2012; 7:247–265.
 13. Reynoird N, Schwartz BE, Delvecchio M, *et al.* Oncogenesis by sequestration of CBP/p300 in transcriptionally inactive hyperacetylated chromatin domains. *EMBO J* 2010; 29:2943–2952.
 14. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 2010; 468:1067–1073.
 15. Schwartz BE, Hofer MD, Lemieux ME, *et al.* Differentiation of NUT midline carcinoma by epigenomic reprogramming. *Cancer Res* 2011; 71:2686–2696.
 16. Boussouar F, Jamshidikia M, Morozumi Y, *et al.* Malignant genome reprogramming by ATAD2. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1829:1010–1014.
 17. Emadali A, Rousseaux S, Bruder-Costa J, *et al.* Identification of a novel BET bromodomain inhibitor-sensitive, gene regulatory circuit that controls Rituximab response and tumour growth in aggressive lymphoid cancers. *EMBO Mol Med* 2013; 5:1180–1195.
- A study based on the discovery of ectopically expressed proteins in DLBCL enabled the demonstration of a role for the out of context activity of a factor in the resistance to the current treatment of DLBCL, and indicated appropriate therapeutic strategies to circumvent this resistance.
18. Lenz G, Wright G, Dave SS, *et al.* Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2008; 359:2313–2323.
 19. Grayson AR, Walsh EM, Cameron MJ, *et al.* MYC, a downstream target of BRD-NUT, is necessary and sufficient for the blockade of differentiation in NUT midline carcinoma. *Oncogene* 2013. [Epub ahead of print]

blood

2012 120: 4215-4218
Prepublished online September 6, 2012;
doi:10.1182/blood-2012-05-428011

HDAC6 controls the kinetics of platelet activation

Karin Sadoul, Jin Wang, Boubou Diagouraga, Anne-Laure Vitte, Thierry Buchou, Thérèse Rossini, Benoît Polack, Xiaodong Xi, Patrick Matthias and Saadi Khochbin

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/120/20/4215.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections

[Brief Reports](#) (1641 articles)

[Platelets and Thrombopoiesis](#) (349 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.

Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



Brief report

HDAC6 controls the kinetics of platelet activation

Karin Sadoul,¹ Jin Wang,^{1,2} Boubou Diagouraga,¹ Anne-Laure Vitte,¹ Thierry Buchou,¹ Thérèse Rossini,³ Benoît Polack,³ Xiaodong Xi,⁴ Patrick Matthias,⁵ and Saadi Khochbin¹

¹Inserm U823, Université Joseph Fourier, Grenoble 1, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France; ²State Key Laboratory of Medical Genomics, Shanghai Institute of Hematology, Department of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China; ³Hématologie Biologique Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité/Informatique, Mathématiques et Applications de Grenoble—TheREX (Unité Mixte de Recherche 5525 Centre National de la Recherche Scientifique—Université Joseph Fourier), Grenoble, France; ⁴State Key Laboratory of Medical Genomics and Shanghai Institute of Hematology and Sino-French Research Center for Life Sciences and Genomics, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, China; and ⁵Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Novartis Research Foundation, Basel, Switzerland

HDAC6, a major cytoplasmic deacetylase, is shown here to fine-tune the kinetics of platelet activation, a process that must be precisely regulated to ensure hemostasis after blood vessel injury while preventing pathologic thrombus formation. The discoid shape of resting platelets in the circulation is maintained by several highly acetylated microtubules organized in a marginal band. During

platelet activation, microtubules undergo major reorganizations, which contribute to the shape change of activating platelets. We show that, during these activation-induced shape changes, a dramatic HDAC6-mediated tubulin deacetylation takes place, followed by microtubule reacylation in spread platelets. In addition, although HDAC6-controlled tubulin deacetylation is not required for

platelet activation, the capacity of HDAC6 to prevent tubulin hyperacetylation influences the speed of platelet spreading. These results are particularly important in view of HDAC6 inhibitors being currently used in clinical trials and represent the first example of cell signaling by lysine acetylation in platelet biology. (Blood. 2012;120(20):4215-4218)

Introduction

Acetylation of internal lysine residues within proteins is a posttranslational modification catalyzed by acetyltransferases and removed by deacetylases.¹⁻³ Because of its reversible character acetylation is used to regulate cellular processes.⁴ This has been extensively studied for nuclear processes, but there is still little knowledge concerning processes in the cytoplasm.⁵ Here we used blood platelets to study lysine acetylation in a strictly cytoplasmic context. Platelets are anucleated cell fragments generated by fragmentation of megakaryocytes.⁶ They circulate in the bloodstream as discoid particles with a diameter of 2-4 μm . On blood vessel injury, platelets become activated to ensure hemostasis. Platelet activation is composed of several consecutive and overlapping events, including adhesion to the extracellular matrix, cytoskeleton-induced shape changes, exocytosis of granules, and platelet aggregation.⁷ These processes must be precisely regulated to arrest bleeding in case of injury and prevent pathologic thrombus formation.^{8,9} When platelets are activated in vitro, they respond collectively within seconds. This rapid and synchronous response facilitates the detection of regulatory protein modifications, including acetylation.

Here we focused on the acetylation status of microtubules, which are implicated in the shape change during platelet activation. Indeed, platelets have no microtubule organizing center, yet microtubules are highly organized in resting platelets. Several tightly bundled microtubules form a ring structure, called marginal band, which is essential to maintain the discoid shape of resting platelets.^{10,11} Although it was shown previously that the marginal band of resting platelets is highly acetylated, the tubulin acetylation status during platelet activation had not been studied.¹⁰

We show that tubulin is deacetylated within minutes during platelet activation. Reacylation of microtubules is observed later on in spread platelets. Taking advantage of histone deacetylase 6 knock-out (*HDAC6* KO) mice,¹² we demonstrate that *HDAC6* is responsible for tubulin deacetylation in platelets and that tubulin deacetylation is not necessary for platelet spreading. Furthermore, we show that, in terms of platelet spreading, *HDAC6* KO platelets, with hyperacetylated marginal bands, have a kinetic advantage over their wild-type (WT) counterparts.

Methods

Preparation of human PRP

Nontherapeutic buffy coats were diluted with an equal volume of PBS, centrifuged 10 minutes, 400g at room temperature, and the upper phase corresponding to the platelet-rich plasma (PRP) was collected.

Preparation of mouse PRP

Blood was collected into 100 μL 3.2% Na-citrate from anesthetized mice by cardiac puncture. Na-citrate volumes were adjusted according to recovered blood volumes. Blood with identical *HDAC6* genotypes¹² was pooled, centrifuged 15 minutes, 200g at room temperature to obtain the PRP.

Spreading assay

The 24-well plates with coverslips and 1×10^6 platelets/400 μL /well were centrifuged 3 minutes, 600g at room temperature. Platelets were fixed in 4% neutral formalin after different spreading times. For 0 minute time

Submitted May 9, 2012; accepted August 24, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, September 6, 2012; DOI 10.1182/blood-2012-05-428011.

There is an Inside *Blood* commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

points, resting platelets were centrifuged onto glass coverslips through fixation solution.

HDAC6 activity assay

HDAC6 and control IgG immunoprecipitated complexes were incubated with an acetylated tubulin peptide (Ac-L-E-H-G-I-Q-P-D-G-Q-M-P-S-D-K(Ac)-MCA, MW1893) in reaction buffer (20mM Tris, 150mM NaCl, pH 8) for 2 hours at 37°C. Peptide mass was analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.

Results and discussion

Variations of tubulin acetylation in activated platelets

Platelets can be activated in vitro through various activation pathways, either by adding specific agonists to platelets in suspension or by letting them spread on a glass surface. To compare tubulin acetylation levels in resting and activated platelets, we performed a time course experiment of platelets spreading on glass (Figure 1A). Platelets fixed before touching the glass surface display the characteristic discoid shape of resting platelets and marginal band microtubules are highly acetylated (Figure 1A, 0 minutes). After 5 minutes of spreading, a dramatic shape change and an important decrease of acetylated tubulin are observed (Figure 1A, 5 minutes). Tubulin acetylation completely disappears after 30-60 minutes when maximal spreading is reached. Unexpectedly, microtubules become reacylated after 2-4 hours when microtubule asters, bundles, and imperfect marginal bands reform and platelets start to retract (Figure 1A, 4 hours, ON). This process of tubulin deacetylation and reacylation was confirmed by Western blot using platelets lysed after different incubation times on glass (Figure 1D). We next tested whether deacetylation is also induced after platelet spreading on more physiologic substrates. Like on uncoated glass, complete tubulin deacetylation is observed on spreading on fibronectin, fibrinogen, and collagen followed by reacylation of microtubules in spread platelets (Figure 1B). In contrast, platelets are unable to spread on poly-L-lysine-coated surfaces and disc shape and microtubule acetylation remain unchanged (Figure 1B). To test whether tubulin deacetylation also occurs during platelet activation in suspension, we compared lysates of resting and aggregated platelets. Again, tubulin deacetylation is observed on platelet activation triggered by different agonists (Figure 1C). Thus, tubulin deacetylation is observed under all activation conditions tested, suggesting that deacetylation always accompanies the activation process regardless of the activation pathway.

Hence, a deacetylase either gets activated or gains access to its substrate during platelet activation. The latter appears to be the case because deacetylation occurs even in resting platelets as soon as microtubules are depolymerized by nocodazole or incubation at 4°C, whereas acetylation is maintained during platelet spreading when microtubules are stabilized with taxol (Figure 1E-F).

The progressive reacylation of microtubules in spread platelets necessitates a tubulin acetyltransferase and consumes acetyl-CoA, the cofactor of the acetylation reaction. The fact that platelets are equipped with all players to produce these dynamic changes of tubulin acetylation points to a regulatory role of this posttranslational modification for cytoskeletal reorganizations.

HDAC6 mediates tubulin deacetylation in platelets

To characterize the deacetylase, spreading experiments on glass surfaces were performed in the presence of different deacetylase

inhibitors. Trichostatin A (inhibiting class I/II deacetylases)¹³ but not Na-butyrate (inhibiting class I/II deacetylases, except HDAC6 and HDAC10)^{14,15} or nicotinamide (inhibiting class III deacetylases),¹⁶ inhibits tubulin deacetylation during platelet spreading (Figure 2A). This suggested that HDAC6 or HDAC10 is the enzyme responsible for tubulin deacetylation. By Western blot, we could show that HDAC6 is present in platelets (Figure 2B). Furthermore, HDAC6 immunoprecipitated from resting platelets is active in an in vitro deacetylation assay (Figure 2C). The presence of active HDAC6 in resting platelets and its known preference for tubulin dimers rather than microtubules¹⁵ corresponds to the requirements of the deacetylation mechanism described in Figure 1E and F. We therefore compared platelets from *HDAC6* WT and KO mice.¹² Marginal bands in resting *HDAC6* KO platelets are hyperacetylated compared with WT platelets (Figure 2D). Noteworthy is that, even though spreading of mouse platelets on glass surfaces takes longer than for human platelets, rapid tubulin deacetylation parallels spreading of WT platelets similar to human platelets. During spreading of HDAC6-deficient platelets, the level of acetylated tubulin is maintained (Figure 2D), as for human platelets treated with TSA (Figure 2A). HDAC6-deficient platelets spread faster than WT platelets as observed by the larger size of KO versus WT platelets after 60 minutes of spreading (Figure 2D-E). This difference, however, was transient because WT and KO platelets occupy a similar surface area when fully spread after 90 minutes of incubation (Figure 2D).

These results confirm that HDAC6 is required for tubulin deacetylation during platelet activation and show that SIRT2, which deacetylates tubulin in other cells,¹⁷ cannot compensate for HDAC6 deficiency in KO platelets. Our results also demonstrate that tubulin deacetylation is not necessary for platelet spreading and show that the fine-tuning of cytoskeletal reorganizations is regulated by acetylation because the kinetics of platelet activation differ between *HDAC6* WT and KO platelets. A challenging task will be now to find out which molecular interactions are directly modulated by the acetylation status of microtubules in platelets.

Acknowledgments

The authors thank Joel Plumas, Sandrine Fournel, and Bernard Schweizer for arranging access to buffy coats; Corinne Albiges-Rizo for the generous gift of fibrinogen and fibronectin; Rémy Sadoul for helpful discussions; Jacques Mazzega of the optical microscopy platform (Cell imaging, CRI U823) for technical assistance; the staff of the animal care facility (PHTA, Grenoble) for excellent work; and Sophie Rousseaux for English language corrections.

The microscopy equipment was supported by the Association for Research on Cancer, MESR, and Rhone-Alpes region (CPER Exploration du vivant, imagerie biomédicale). The work in the S.K. laboratory was supported by ANR, INCa, and Association for Research on Cancer. This work was supported in part by the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (grant 09540700800). The work in the P.M. laboratory was supported by the Novartis Research Foundation.

Authorship

Contribution: K.S. initiated the study, designed and performed experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript; J.W. and

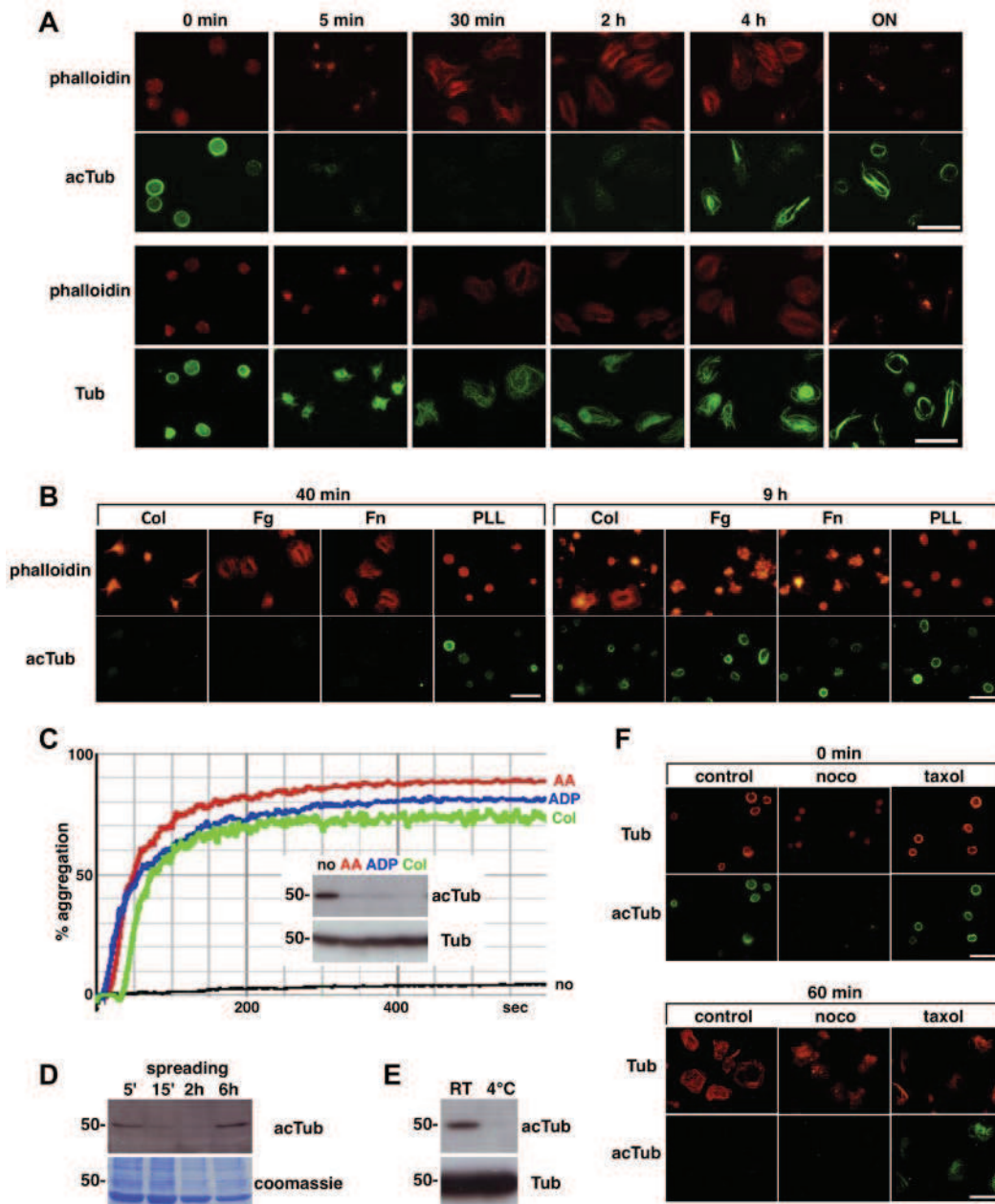


Figure 1. Dynamic changes of tubulin acetylation in activated platelets. (A) Human platelets were fixed after different spreading periods (as indicated, ON indicates overnight) on glass surfaces and stained using an acetylated tubulin antibody (clone 6-11B-1, Sigma-Aldrich, T6793; green, top panels) or an antitubulin antibody (clone B-5-1-2, Sigma-Aldrich, T5168; green, bottom panels) detected with AlexaFluor-488 goat anti-mouse IgGs (Invitrogen; A11029). Colabeling of the actin cytoskeleton with phalloidin-rhodamine (Sigma-Aldrich, P1951; red) served as an indicator for the extent of platelet spreading. Fluorescent images were acquired using an upright microscope (Olympus BX41) equipped with a color camera DP70 using a 100 \times oil immersion objective and the software analysisSIS. (B) Human platelets were incubated for 40 minutes (left panels) or 9 hours (right panels) on glass cover slips coated with 20 μ g/mL collagen (Col), fibrinogen (Fg), fibronectin (Fn), or poly-L-lysine (PLL) and blocked with 3% BSA. Platelets were then fixed and stained using an acetylated tubulin antibody and phalloidin-rhodamine for the actin cytoskeleton. (C) Platelets in human PRP were induced or not (no) to aggregate with 1.5mM arachidonic acid (AA), 10 μ M adenosine diphosphate (ADP), or 10 μ g/mL collagen (Col). Aggregation was followed using an APACT 4004/LABiTec aggregometer. The PRP was then centrifuged and the platelet pellet lysed and analyzed by Western blot using an acetylated tubulin and an antitubulin antibody (inset). (D) Human platelets were allowed to spread on glass Petri dishes (6 \times 10⁷/10 mL/dish) for the indicated periods of time and then scrapped and analyzed by Western blot using an acetylated tubulin antibody. The same membrane was stained with Coomassie as a loading control. (E) Human PRP was incubated for 20 minutes on ice or at room temperature and then centrifuged. The platelet pellet was lysed and analyzed by Western blot using an acetylated tubulin and an antitubulin antibody. (F) Human platelets were incubated for 30 minutes at room temperature with 15 μ g/mL nocodazole, 25 μ M taxol, or without drug and then either fixed in suspension (top panel) or allowed to spread on glass coverslips for 60 minutes (bottom panel). Platelets were then stained with the mouse monoclonal acetylated tubulin antibody and a monoclonal rabbit antitubulin antibody (clone EP1332Y, Millipore, 04-1117) detected with AlexaFluor-546 goat antirabbit IgGs (Invitrogen; A11035) as indicated. Scale bars represent 10 μ m.

B.D. performed experiments and discussed the data; A.-L.V. and T.B. handled the mice; T.R. and B.P. helped with aggregation assays; X.X. discussed the data; P.M. provided the *HDAC6* KO mice; and S.K. discussed experiments and data, financed the study, and contributed to writing the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Karin Sadoul, Inserm U823, Université Joseph Fourier, Grenoble 1, Institut Albert Bonniot, F-38700 Grenoble, France; e-mail: karin.sadoul@ujf-grenoble.fr.

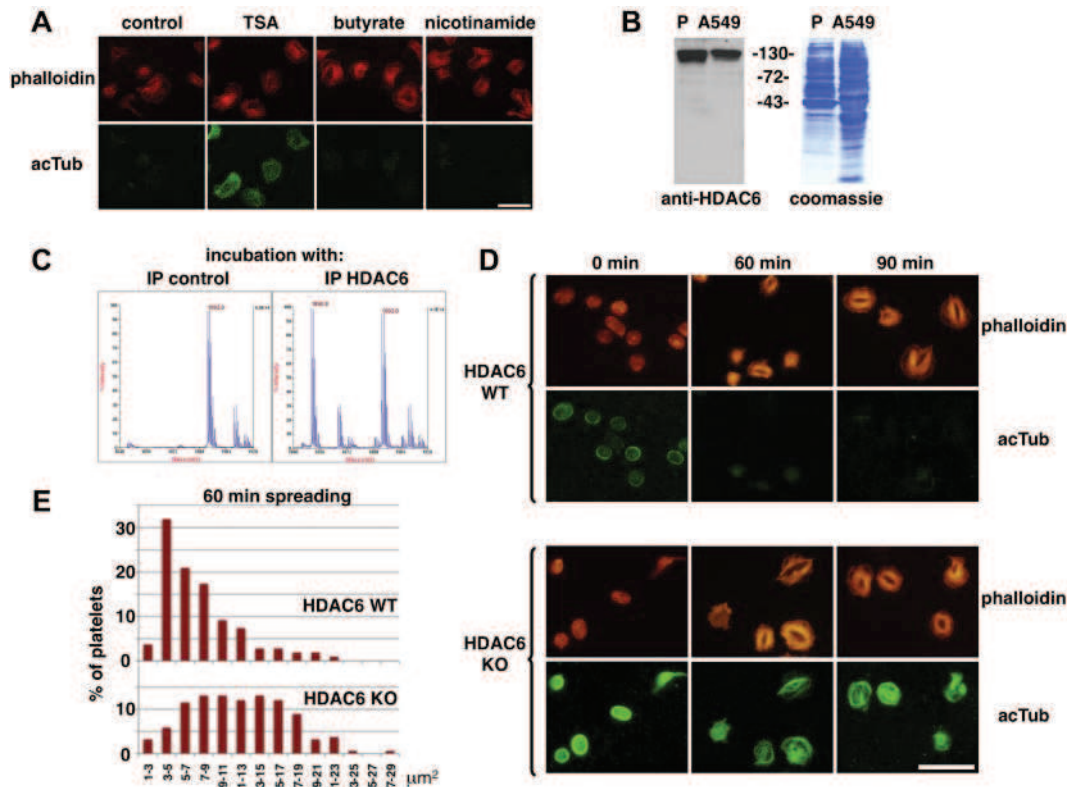


Figure 2. HDAC6 mediates tubulin deacetylation during platelet activation. (A) Human platelets were fixed after 30 minutes of spreading in the absence or presence of 100 ng/mL TSA, 10mM Na-butyrate, or 5mM nicotinamide and stained using an antiacetylated tubulin antibody and phalloidin-rhodamine for the actin cytoskeleton. (B) Western blot of a human platelet lysate and a lysate of the human lung carcinoma cell line A549 (cultured in RPMI 1640/10% FCS; 70 μ g/lane) revealed with an anti-HDAC6 antibody (Santa Cruz Biotechnology; sc-11420), followed by Coomassie staining of the transfer membrane. (C) Anti-HDAC6 antibodies were used for immunoprecipitation from a human platelet lysate, and unspecific IgGs were used as control. Immune complexes were incubated with an acetylated tubulin peptide (MW 1893), which was then analyzed by mass spectrometry for loss of acetylation (loss of 42 Da). Incubations with control IgGs resulted in 0% deacetylation versus $55.1\% \pm 2.9\%$ deacetylation for incubations with HDAC6 immune complexes ($n = 3$). (D) HDAC6 WT and KO platelets in the resting state or spread for 60 and 90 minutes on glass surfaces were fixed and stained with phalloidin-rhodamine and an acetylated tubulin antibody as indicated. (E) Quantification of the surface area occupied by the actin cytoskeleton using images taken as in Figure 2D for phalloidin-rhodamine stainings after 60 minutes of spreading. The histogram represents the percentage of platelets present in different size categories as indicated on the x-axis; ~ 150 platelets were counted for each condition of a typical experiment repeated 4 times. Scale bars represent 10 μ m.

References

- Berndsen CE, Denu JM. Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases. *Curr Opin Struct Biol.* 2008;18(6):682-689.
- Yang XJ, Seto E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):206-218.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet.* 2009;10(1):32-42.
- Kouzarides T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 2000;19(6):1176-1179.
- Sadoul K, Wang J, Diagouraga B, Khochbin S. The tale of protein lysine acetylation in the cytoplasm. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:970382.
- Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3348-3354.
- Hartwig JH. The platelet: form and function. *Semin Hematol.* 2006;43(1 Suppl 1):S94-S100.
- Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 2009;102(2):248-257.
- Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2007;357(24):2482-2494.
- Patel-Hett S, Richardson JL, Schulze H, et al. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood.* 2008;111(9):4605-4616.
- White JG, Rao GH. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am J Pathol.* 1998;152(2):597-609.
- Zhang Y, Kwon S, Yamaguchi T, et al. Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol Cell Biol.* 2008;28(5):1688-1701.
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem.* 1990;265(28):17174-17179.
- Guardiola AR, Yao TP. Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J Biol Chem.* 2002;277(5):3350-3356.
- Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, et al. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* 2002;21(24):6820-6831.
- Jackson MD, Schmidt MT, Oppenheimer NJ, Denu JM. Mechanism of nicotinamide inhibition and transglycosylation by Sir2 histone/protein deacetylases. *J Biol Chem.* 2003;278(51):50985-50998.
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell.* 2003;11(2):437-444.

Motor-driven marginal band coiling is part of the platelet activation process

Boubou Diagouraga¹, Alexei Grichine¹, Arnold Fertin², Jin Wang³, Saadi Khochbin¹ and Karin Sadoul¹

1 - INSERM, U823; Université Joseph Fourier - Grenoble 1; Institut Albert Bonniot, Grenoble, F-38700 France

2 - UJF-GRENOBLE-1 / CNRS / TIMC-IMAG UMR5525, Grenoble F-38041, France

3 - State Key Laboratory of Medical Genomics, Shanghai Institute of Hematology, Department of Hematology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Saadi Khochbin and Karin Sadoul contributed equally to this paper.

Correspondence to: Karin Sadoul

INSERM, U823; Université Joseph Fourier - Grenoble 1
Institut Albert Bonniot
F-38700 Grenoble, France

e-mail: karin.sadoul@ujf-grenoble.fr

Phone: (+33) (0)4 76 54 95 82

Fax: (+33) (0)4 76 54 95 95

Running title: Motor-driven marginal band coiling in platelets

Keywords: blood platelets, microtubules, actomyosin, dynein, kinesin

Abstract

Platelets float in the blood as discoid particles. Their shape is maintained by microtubules organized in a ring structure in the periphery of resting platelets, the so-called marginal band (MB). Platelets are activated after vessel injury and undergo a major shape change known as disc-to-sphere transition. It has been suggested that acto-myosin tension induces the contraction of the MB to a smaller ring. Here we show that antagonistic microtubule motors keep the MB in its resting state. During platelet activation dynein slides microtubules apart, leading to MB extension rather than contraction. The limited available space forces the MB to coil, which in turn induces the spherical shape of activating platelets. Newly polymerizing microtubules within the coiled MB will then take a new path to form, in concerted action with acto-myosin tension, the smaller microtubule ring. These results completely change the current view of the platelet activation mechanism and reveal principal mechanistic features underlying cellular shape changes.

Introduction

Mammalian platelets are small cell fragments with neither nucleus nor microtubule organizing centre. They circulate in the blood stream to survey vascular integrity. In their quiescent state they have a flat, discoid morphology due to a microtubular ring structure, called marginal band (MB), in the periphery of resting platelets (White and Rao, 1998). Endothelial damage will induce platelet activation, which is composed of several successive events (Hartwig, 2006). Within seconds they adopt a three-dimensional, sphere shaped morphology, extend filopodia, secrete the content of their granules and spread on the subendothelial layer or aggregate with surrounding platelets to form a haemostatic plug. In the activated platelet a smaller microtubule ring structure is observed and it has been suggested that acto-myosin tension leads to the spherical shape and induces the centripetal contraction of the MB (Johnson et al., 2007; White and Burris, 1984). So far microtubule motor proteins have not been implicated in the maintenance of the resting MB, the shape change or the MB reorganization during platelet activation (Hartwig, 2006; Patel et al., 2005).

MB microtubules in resting platelets are heavily acetylated (Patel-Hett et al., 2008) and tubulin is rapidly deacetylated during platelet activation (Sadoul et al., 2012). In general, prominent microtubule acetylation is observed when microtubule motor actions are important either for cellular transport processes (Dompierre et al., 2007; Reed et al., 2006) or for microtubule movements as for instance in mitotic spindles, primary cilia or flagella (Piperno et al., 1987; Schatten et al., 1988). We therefore hypothesized that microtubule motor proteins might be functionally important in platelets.

Results and Discussion

Microtubule motor actions in platelets

To investigate whether microtubule motors could play a functional role in platelets we first performed Western blots to test for their presence in platelet lysates using pan anti-kinesin heavy chain and dynein intermediate chain antibodies. Kinesin heavy chains of 68 and 72 kD as well as the dynein intermediate chain of 74 kD were detected in platelet lysates (Fig. 1A) as described previously (Patel et al., 2005; Rothwell and Calvert, 1997). We then treated resting platelets with the dynein inhibitor erythro-9-[3-(2-hydroxyethyl)]adenine (EHNA) (Penningroth et al., 1982) and either fixed them in suspension (resting state) or centrifuged them onto glass coverslips to let them spread for 10 min at 37°C as a test for their activation capacity. No obvious alteration of resting platelets is observed after dynein inhibition, while spreading is almost completely prevented. Surprisingly, use of the kinesin inhibitor aurintricarboxylic acid (ATA) (Duhl and Renhowe, 2005) in the same assay, results in a smaller microtubule ring in resting platelets, but platelets are still able to spread on a glass surface and do so with a more round morphology (Fig. 1B, Fig. s1A, B for quantification).

These inhibitor studies suggested that both microtubule motors have a functional role in platelets. To confirm these results we introduced the kinesin and dynein antibodies, previously shown to be function-blocking (Grabham et al., 2007; Theiss et al., 2005), into resting platelets using the chariot kit. Dynein antibodies inhibited platelet spreading, resulting in the appearance of a majority of star-shaped platelets, similar to EHNA treatments. After introduction of kinesin antibodies platelets were able to spread and a

higher number of fully, round spread platelets was observed, again similar to treatments with ATA (Fig. 1C, Fig. s1B for quantification).

MBs coil during platelet activation

Activated platelets have smaller microtubule rings than non-activated platelets and it has been suggested that this is due to MB contraction (White and Burris, 1984). Since kinesin inhibition leads to a smaller microtubule ring (Fig. 1B, upper panel), we wondered whether kinesin inhibition could trigger MB contraction. Thus platelets were treated with ATA for a shorter time period (3 min), fixed in suspension and stained for tubulin (not shown) or acetylated tubulin (Fig. 1D). Half of the platelets ($48.4 \pm 6.1\%$) still had the characteristic flat MB of resting platelets and $22.8 \pm 5.5\%$ had a smaller ring. To our surprise we observed in the remaining $28.8 \pm 8.3\%$ a three-dimensional twist of the MB (4 independent experiments). Platelets with coiled MBs had lost their disc shape and were more spherical. Thus MB coiling induced by kinesin inhibition results in a disc-to-sphere transition and ultimately in a smaller microtubule ring structure, two hallmarks of activating platelets. We thus wondered whether MB coiling is the molecular mechanism leading to sphere shape during platelet activation. If so, it should be possible to detect MB coiling under physiological conditions.

Immediately after venipuncture platelets are in a reversible activated state as a consequence of the mechanical stress (Lippi et al., 2013). In platelet populations prepared directly after blood sampling and stained for tubulin and acetylated tubulin (Fig. 2A, B+videos), only $32 \pm 12.6\%$ were in the resting state while the majority had a spherical shape with twisted MBs ($68.2 \pm 12.6\%$, 7 independent experiments using blood from 3

different donors) reinforcing the idea that MB coiling induces sphere shape. After a recovery period of about 2h at RT, platelets had regained their flat disc shape and a normal MB (Fig. 2B+video). MB coiling was also observed when resting platelets in suspension were activated for 60 seconds with low concentrations of different agonists (Fig. 2B+video), while concentrations used in standard aggregation assays resulted in the smaller microtubule ring (not shown).

Furthermore MB coiling is also observed during spreading of living microtubule tracker stained platelets on a glass surface (Fig. 2C+video). The fluorescent image of the time-lapse video shows that the MB started to coil (at time point 9'50") when the transmission image shows the beginning of disc-to-sphere transition (at 10'20" sphere shape is reached). We also used time-lapse video microscopy to follow platelet activation in suspension triggered with different agonists and observed MB coiling under all conditions tested (Fig. 2D, E+videos).

Thus MB coiling induces sphere shape and is part of the sequence of events leading to platelet activation. While it has long been recognized that the MB is essential to keep the discoid shape of resting platelets (White and Rao, 1998), this is the first description of MB coiling inducing the rapid disc-to-sphere transition of activating platelets, first described in 1965 (Bull and Zucker, 1965). Interestingly, highly similar microtubule coils have been described in limulus amoebocytes and nucleated thrombocytes of non-mammalian vertebrates indicating that this process is evolutionary conserved (Conrad et al., 2004; Lee et al., 2004).

Space constraints lead to MB coiling

One possible explanation for MB coiling could be the limited available space either after acto-myosin contraction or after MB extension. In favor of the latter hypothesis is the finding that MB length measurements after 3D-reconstructions of confocal image stacks show that coiling MBs in freshly prepared platelets are statistically longer compared to flat MBs in resting platelets (Fig. 3A). MB extension could be due to dynein induced sliding apart of microtubules similar to the dynein mediated microtubule sliding process responsible for proplatelet extension in megacaryocytes (Patel et al., 2005). Such a mechanism is supported by our observation that transiently activated platelets with coiled MBs present in freshly drawn blood rapidly get back to their resting discoid shape upon dynein inhibition (27.3 ± 10.7 % resting platelets in control versus 67.2 ± 13 % in EHNA treated populations, Fig. 3B; 5 independent experiments, $p < 0.01$). Furthermore we observed that EHNA treatment inhibits MB coiling induced by platelet activation with ADP (Fig. s2A).

However, while MB extension may be sufficient to induce MB coiling it is not essential. Coiling is also observed when microtubule motor actions are bypassed by directly activating acto-myosin contraction with calyculin (Fig. s2B+video). MB length measurements using the tracker films also show that MBs can coil without significantly elongating (Fig. s3). This may be attributed to the tracker stain in this case, since it has an unexpected effect on platelets. Platelets stained with the taxol-based tracker kit have enhanced activation responses to ADP while taxol treated platelets have reduced responses (Fig. s2A). One possible explanation for this result could be that the surfactant component

of the tracker stain destabilises acto-myosin/microtubule connections, which may facilitate acto-myosin contraction and bypass microtubule motor actions.

While our results demonstrate that MBs coil during platelet activation, they do not explain how the smaller ring structure observed in activated platelets might form.

Newly polymerizing microtubules form the smaller ring after acto-myosin contraction

To investigate the formation of the smaller ring structure we based our strategy on the pioneering work by Patel-Hett et al (Patel-Hett et al., 2008). They have shown that the MB is composed of stable and several actively polymerizing microtubules and that it can be stained with antibodies against acetylated and tyrosinated α -tubulin. Tyrosinated α -tubulin constitutes the pool of free tubulin subunits used by newly polymerizing microtubules (Janke and Bulinski, 2011). To visualize simultaneously stable/acetylated, newly formed/tyrosinated and total microtubules we acquired confocal images of triple stained platelets with MBs at different coiling stages. 3D reconstructions of individual stainings and merges are shown and to better appreciate co-localizations, images were thresholded and MBs skeletonized. All three stainings colocalize in resting platelets and in platelets with slightly coiled MBs (Fig. 4A, B, C, +video). In contrast, in platelets with strongly coiled MBs newly formed microtubules take a new path by switching to the proximal part of the microtubule bundle which leads to the formation of a smaller ring (Fig. 4D, E, F, +video). The coiling stage when microtubules just start to use a new path (Fig.4C) reaching for the opposite side of the coiled bundle is also illustrated in the video associated to Fig. 2E (arrow).

The more the coiled MB appears compressed, the smaller is the new ring and acto-myosin contraction may come into play at this point. To test this we treated resting platelets with the myosin inhibitor blebbistatin, shown previously to block acto-myosin contraction in platelets (Calaminus et al., 2007; Johnson et al., 2007) or used cytochalasin D to depolymerise the actin cytoskeleton. As expected, blebbistatin and cytochalasin D had no influence on the resting MB and platelet activation by ADP leads to the smaller microtubule ring in control platelets. This process requires an intact actin cortex since pre-treatment with cytochalasin D prevents the smaller ring formation. At a blebbistatin concentration of 25 μM the smaller ring appears slightly larger compared to the control. Similar results using blebbistatin and cytochalasin pre-treatment before thrombin-induced platelet activation have been obtained previously (Severin et al., 2013). This has been interpreted as a requirement of acto-myosin actions for the centripetal contraction of the MB to a smaller ring. However, careful examination of confocal image stacks reveals the presence of several platelets with coiled MBs, which is more evident when a blebbistatin concentration of 50 μM was used (Fig. 5A). Thus acto-myosin contraction is required to compress the coiled MB and its efficiency may decide about the fate of activating platelets. In case of sustained acto-myosin contraction platelets may proceed to full, irreversible activation and microtubules, polymerising along the coiled, compressed MB will form the smaller ring structure. In transiently activated platelets acto-myosin contraction is not maintained and the new path taken by actively polymerizing microtubules will attain the size of a resting MB, which leads to platelets having simultaneously a coiled/elongated and a flat/resting MB (Fig. 4D). Such platelets have been described previously by Behnke and Forer (Behnke and Forer, 1998). They can be found sporadically in populations of resting platelets (1-5%, not shown) and

more importantly in platelet populations prepared from freshly drawn blood after dynein inhibition, when they come back to the resting state (Fig. 3B, arrows). The flat newly polymerised MB may be progressively reacetylated while the coiled, acetylated bundle, no longer used by newly polymerizing microtubules, might be rapidly depolymerised and deacetylated. This could explain the high degree of heterogeneity of MB acetylation in resting platelets. A low acetylation level may be indicative of a recent transient activation event. The rapid tubulin deacetylation observed during platelet activation (Sadoul et al., 2012) may also depend on the depolymerisation of the coiled part of the MB to give the deacetylase HDAC6 access to its preferred substrate, unpolymerized tubulin (Matsuyama et al., 2002). Dynein induced MB coiling takes place when microtubules are acetylated (Fig. 1D, 2A). Like for dynein mediated cargo transport (Dompierre et al., 2007), acetylation may enhance dynein actions, which could speed up coiling and explain the faster spreading capacity of platelets with hyperacetylated MBs (Sadoul et al., 2012).

The combined results allow to deduce a putative model (Fig. 5B) to explain the cross-talk between the actin and tubulin part of the cytoskeleton, previously shown to be also important for platelet size determination (Thon et al., 2012). Similar to nucleated cells (Laan et al., 2012; Tolic-Norrelykke, 2008), dynein may be anchored to the actin cortex and slide microtubules apart once an activation signal reduces kinesin counteractions. Elongation of the MB may lead to its coiling generating force on and maybe rupture of microtubule/cortex interactions, which may serve as a signal for acto-myosin to contract leading to irreversible activation.

In conclusion, this study sheds a completely new light on the events leading to platelet activation. The information that microtubule motor actions play a role in platelet physiology and are possibly regulated by microtubule acetylation highlights new directions for the development of therapeutic strategies able to modify platelet function. Furthermore this study investigates cytoskeletal elements in a physiological cellular context in the absence of nucleus and centrosomes. It reveals a tight interplay between the acto-myosin and the microtubule part of the cytoskeleton governing rapid cell shape changes.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

The following antibodies were used: mouse anti-acetylated tubulin (clone 6-11B-1, Sigma, T6793); mouse anti- α -tubulin (clone B-5-1-2, Sigma, T5168); monoclonal rabbit anti- α -tubulin (clone EP1332Y, Millipore, 04-1117); monoclonal rat anti-tyrosinated α -tubulin (generous gift of Annie Andrieux); rabbit anti-kinesin heavy chain (Cytoskeleton, AKINO1); mouse anti-dynein intermediate chain (clone 74.1, Millipore, MAB1618); non-immune rabbit IgGs (Sigma, I5006); Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, A11029); Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, A11034); Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, A11030); Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, A11035); Alexa Fluor 546 goat anti-rat IgG (Invitrogen, A11081); Alexa Fluor 647 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, A21245); HRP goat anti-rabbit IgG (Dako, P0448); HRP goat anti-mouse IgG (Dako, P0447).

The following reagents were used: phalloidin-rhodamine (Sigma, P1951); tubulin tracker (Invitrogen, T34075); cytochalasin D (Sigma, C8273); poly-D-lysine (Sigma, P7280); thrombin (Sigma, T4648); arachidonic acid (Helena Biosciences, 5364); ADP (Helena Biosciences, 5366).

Cell culture

The human lung carcinoma cell line A549 and the human megakaryocytic cell line CHRF-288-11 were cultured in RPMI 1640/10%FCS.

Preparation of human platelet rich plasma (PRP)

Non-therapeutical buffy coats were diluted with an equal volume of PBS, centrifuged 10 min, 400 g, RT and the upper phase corresponding to the PRP was collected. Alternatively PRP from freshly drawn citrated blood (needle Becton Dickinson, 368608; vacutainer Becton Dickinson, 367714) is prepared identically but without prior PBS dilution.

Spreading assay

Platelets are diluted in PBS and pipetted into 24 well plates with coverslips ($1 \times 10^6/400 \mu\text{l/well}$). Plates are then centrifuged 3 min, 600 g, RT to assure simultaneous platelet contact with glass surfaces allowing synchronized spreading. Platelets are fixed in 4% neutral formalin after indicated spreading times. For the resting state, platelets are first fixed and then pipetted into 24 well plates with glass coverslips (coated with 0.02 mg/ml poly-D-lysine for 1 h at RT) and centrifuged for 5 min, 600 g, RT.

Motor inhibitor treatments

For kinesin inhibition platelets were diluted in PBS to a concentration of $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ and then incubated with freshly prepared aurintricarboxylic acid (ATA, Sigma, A1895) at a final concentration of 10 μM for initial experiments and at 40 μM for quantification experiments to account for different plasma concentrations due to varying platelet counts of individual donors and potential absorption of the drug by plasma proteins. For dynein inhibition platelets were incubated with 1 mM erythro-9-[3-2-(hydroxynonyl)]adenine (EHNA, Sigma, E114). For myosin II inhibition we used (-)-blebbistatin (Calbiochem, 203391), which was prepared as a 25 mM stock solution in DMSO and then diluted under vigorous agitation into

PBS preheated to 45°C to avoid precipitation as described (Swift et al., 2012). The solution was then centrifuged before addition of platelets.

Immunofluorescence

Fixed platelets on coverslips were permeabilized with PBS/0.2% Triton-X-100 for 15 min at RT and then incubated with blocking buffer (3% BSA, 10% goat serum in PBS) for 1 h at RT. Coverslips were then incubated with primary antibodies diluted in blocking buffer for 2 h, then washed 2x PBS and 1x PBS/0.2% Triton-X-100 and incubated with secondary antibodies diluted in blocking buffer for 2 h at RT. After 3 washing steps coverslips were mounted on glass slides using Mowiol. Fluorescent images were acquired using an upright microscope (Olympus BX41) equipped with a color camera DP70 using a 100x oil immersion objective. For z-stack images an inverted confocal microscope LSM710 (Zeiss) equipped with 100x/1.4 plan-apo objective was used. 3D reconstructions of z-stack images were done using the Metamorph or ImageJ software.

3D marginal band length measurements

After acquisition of confocal z-stacks, the stacks were first interpolated using the processing software ImageJ to obtain isotropic voxels (Abramoff et al., 2004). Then a band-pass filter was applied using the Difference of two Gaussian filters (DoG). With the first filter the original stack was smoothed by convolving with a three-dimensional Gaussian kernel of standard deviation s_1 . Using a second filter the original stack was smoothed with a Gaussian kernel of standard deviation s_2 with $s_2 < s_1$ (here we used $s_1=7$ and $s_2=2$). The DoG stack was computed from the difference of the two smoothed stacks. After thresholding the platelet skeleton was obtained and measured with the ImageJ plugin

“Analyze Skeleton”, which allows pruning and loop closing in a user defined manner for each platelet (Arganda-Carreras et al., 2010).

Delivery of antibodies into living platelets

Antibodies were introduced into platelets using the chariot protein delivery kit (Actif Motif, 30025). Briefly, 2 µg of antibodies in 50 µl PBS were incubated with 2 µl of Chariot in 50 µl H₂O for 30 min at RT. 1×10^6 platelets in 100 µl PBS are then added to the antibody/chariot mix and incubated for 1 h at RT to allow antibody internalization before being used in the spreading assay.

Marginal band staining of living platelets

For the spreading assay, PRP (2 ml prepared from buffy coats) is centrifuged 10 min, 900 g, RT. The platelet pellet is resuspended in 1 ml PBS containing the Tubulin Tracker reagent (taxol based compound coupled to a fluorochrom; Invitrogen, T34075) at a final concentration of 500 nM and incubated for 30 min at 37°C before time-lapse video microscopy. For suspension activations, platelets are diluted in PBS (1.6×10^7 /ml) and 1 µl tracker reagent is added per ml of platelet suspension. After 30-60 min of incubation at RT, the suspension is diluted with an equal volume of PBS and 500 µl are pipetted into 4 well labteks. Platelets are imaged at RT and activated by addition of 1 drop (36 µl) of agonist solution to obtain final concentrations as indicated.

Video microscopy

Imaging of spreading platelets by fluorescence and differential interference contrast was performed using the inverted confocal microscope LSM510 (Zeiss) equipped with 100x/1.4

plan-*a*po objective. The pinhole was adjusted to 2 AU and the confocal plane positioned slightly above the glass surface. The fluorescence excitation at 488 nm was attenuated to 0.2% AOTF transmission. Platelets were allowed to sediment on Lab-tek chambered coverslips (Nunc) at room temperature. Images were acquired every 5 seconds.

3D confocal videomicroscopy was performed in single photon detection mode with LSM710-Confocor3 confocal microscope, 63x/1.4 plan-*a*po objective, LP 505 emission filter and single photon avalanche photo-diode detector. The 488 nm excitation power at the objective output was only 30 nW (0.005% AOTF transmission) ensuring no fluorescence photobleaching throughout the whole time-lapse acquisition and no laser induced platelet activation as compared with the non-irradiated zones at the end of the experiment. The pinhole was closed to 1AU and the voxel size was set to 66x66x500 nm with a pixel dwell time of 6.3 μ s. Six planes spaced by 0.5 μ m were imaged in each Z-stack. The image treatment and colour depth coding were made with home written ImageJ macros.

Quantification

For all platelet quantification data more than 50 platelets were analyzed per experiment after confocal z-stack acquisitions. Data are expressed in percent as mean \pm standard error of the mean obtained from several individual experiments as indicated.

Acknowledgments

We are grateful to Joel Plumas and Sandrine Fournel for access to buffy coats, Veronique Gerson and Liliane Chollez for blood sampling, Didier Job and Bertrand Fourcade for helpful discussions and Richard Abbatt and Arthur Forer for critical reading of the manuscript. We acknowledge the assistance of Jacques Mazzega, platform Optical microscopy – Cell imaging, CRI U823. The microscopy equipment was supported by the Association for Research on Cancer (ARC), MESR and Rhone-Alpes region (CPER Exploration du vivant, imagerie biomédicale), work by JW by a grant from the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (12410705400) and work in SK laboratory by ANR and INCa grants.

Abbreviations List

ATA, aurintricarboxylic acid

EHNA, erythro-9-[3-2-(hydroxynonyl)]adenine

MB, marginal band

PRP, platelet rich plasma

References

- Abramoff, M.D., P.J. Magalhaes, and S.J. Ram. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*. 11:36-42.
- Arganda-Carreras, I., R. Fernandez-Gonzalez, A. Munoz-Barrutia, and C. Ortiz-De-Solorzano. 2010. 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microsc Res Tech*. 73:1019-1029.
- Behnke, O., and A. Forer. 1998. From megakaryocytes to platelets: platelet morphogenesis takes place in the bloodstream. *Eur J Haematol Suppl*. 61:3-23.
- Bull, B.S., and M.B. Zucker. 1965. Changes in platelet volume produced by temperature, metabolic inhibitors, and aggregating agents. *Proc Soc Exp Biol Med*. 120:296-301.
- Calaminus, S.D., J.M. Auger, O.J. McCarty, M.J. Wakelam, L.M. Machesky, and S.P. Watson. 2007. MyosinIIa contractility is required for maintenance of platelet structure during spreading on collagen and contributes to thrombus stability. *J Thromb Haemost*. 5:2136-2145.
- Conrad, M., J. DeNobile, I. Chaikhoutdinov, D. Escribano, K.G. Lee, and W.D. Cohen. 2004. Cytoskeletal organization of limulus amebocytes pre- and post-activation: comparative aspects. *Biol Bull*. 207:56-66.
- Dompierre, J.P., J.D. Godin, B.C. Charrin, F.P. Cordelieres, S.J. King, S. Humbert, and F. Saudou. 2007. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci*. 27:3571-3583.
- Duhl, D.M., and P.A. Renhowe. 2005. Inhibitors of kinesin motor proteins--research and clinical progress. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 8:431-436.
- Grabham, P.W., G.E. Seale, M. Bennecib, D.J. Goldberg, and R.B. Vallee. 2007. Cytoplasmic dynein and LIS1 are required for microtubule advance during growth cone remodeling and fast axonal outgrowth. *J Neurosci*. 27:5823-5834.
- Hartwig, J.H. 2006. The platelet: form and function. *Semin Hematol*. 43:S94-100.
- Janke, C., and J.C. Bulinski. 2011. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12:773-786.
- Johnson, G.J., L.A. Leis, M.D. Krumwiede, and J.G. White. 2007. The critical role of myosin IIA in platelet internal contraction. *J Thromb Haemost*. 5:1516-1529.
- Laan, L., S. Roth, and M. Dogterom. 2012. End-on microtubule-dynein interactions and pulling-based positioning of microtubule organizing centers. *Cell Cycle*. 11:3750-3757.
- Lee, K.G., T. Miller, I. Anastassov, and W.D. Cohen. 2004. Shape transformation and cytoskeletal reorganization in activated non-mammalian thrombocytes. *Cell Biol Int*. 28:299-310.
- Lippi, G., L. Ippolito, V. Zoppi, F. Sandei, and E.J. Favaloro. 2013. Sample collection and platelet function testing: influence of vacuum or aspiration principle on PFA-100 test results. *Blood Coagul Fibrinolysis*.
- Matsuyama, A., T. Shimazu, Y. Sumida, A. Saito, Y. Yoshimatsu, D. Seigneurin-Berny, H. Osada, Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, S. Horinouchi, and M. Yoshida. 2002. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J*. 21:6820-6831.

- Patel, S.R., J.L. Richardson, H. Schulze, E. Kahle, N. Galjart, K. Drabek, R.A. Shivdasani, J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr. 2005. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood*. 106:4076-4085.
- Patel-Hett, S., J.L. Richardson, H. Schulze, K. Drabek, N.A. Isaac, K. Hoffmeister, R.A. Shivdasani, J.C. Bulinski, N. Galjart, J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr. 2008. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood*. 111:4605-4616.
- Penningroth, S.M., A. Cheung, P. Bouchard, C. Gagnon, and C.W. Bardin. 1982. Dynein ATPase is inhibited selectively in vitro by erythro-9-[3-2-(hydroxynonyl)]adenine. *Biochem Biophys Res Commun*. 104:234-240.
- Piperno, G., M. LeDizet, and X.J. Chang. 1987. Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol*. 104:289-302.
- Reed, N.A., D. Cai, T.L. Blasius, G.T. Jih, E. Meyhofer, J. Gaertig, and K.J. Verhey. 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol*. 16:2166-2172.
- Rothwell, S.W., and V.S. Calvert. 1997. Activation of human platelets causes post-translational modifications to cytoplasmic dynein. *Thromb Haemost*. 78:910-918.
- Sadoul, K., J. Wang, B. Diagouraga, A.L. Vitte, T. Buchou, T. Rossini, B. Polack, X. Xi, P. Matthias, and S. Khochbin. 2012. HDAC6 controls the kinetics of platelet activation. *Blood*.
- Schatten, G., C. Simerly, D.J. Asai, E. Szoke, P. Cooke, and H. Schatten. 1988. Acetylated alpha-tubulin in microtubules during mouse fertilization and early development. *Dev Biol*. 130:74-86.
- Severin, S., F. Gaits-Iacovoni, S. Allart, M.P. Gratacap, and B. Payrastre. 2013. A confocal-based morphometric analysis shows a functional crosstalk between the actin filament system and microtubules in thrombin-stimulated platelets. *J Thromb Haemost*. 11:183-186.
- Swift, L.M., H. Asfour, N.G. Posnack, A. Arutunyan, M.W. Kay, and N. Sarvazyan. 2012. Properties of blebbistatin for cardiac optical mapping and other imaging applications. *Pflugers Arch*. 464:503-512.
- Theiss, C., M. Napirei, and K. Meller. 2005. Impairment of anterograde and retrograde neurofilament transport after anti-kinesin and anti-dynein antibody microinjection in chicken dorsal root ganglia. *Eur J Cell Biol*. 84:29-43.
- Thon, J.N., H. Macleod, A.J. Begonja, J. Zhu, K.C. Lee, A. Mogilner, J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr. 2012. Microtubule and cortical forces determine platelet size during vascular platelet production. *Nat Commun*. 3:852.
- Tolic-Norrelykke, I.M. 2008. Push-me-pull-you: how microtubules organize the cell interior. *Eur Biophys J*. 37:1271-1278.
- White, J.G., and S.M. Burris. 1984. Morphometry of platelet internal contraction. *Am J Pathol*. 115:412-417.
- White, J.G., and G.H. Rao. 1998. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am J Pathol*. 152:597-609.

Figure legends

Figure 1: Presence of microtubule motors in platelets and motor inhibitor treatments

(A) Western blot of 5 μg of lysates of the cell line A549 (A), the megakaryocyte precursor line CHR-288-11 (M) and of 1×10^7 platelets (P) revealed with a pan anti-kinesin heavy chain and an anti-dynein intermediate chain antibody.

(B) Resting platelets in PRP from buffy coats were diluted in PBS ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) and incubated with 1 mM EHNA or 10 μM ATA for 30 min at RT and then either fixed (upper panels, 30' inhibitors / 0' spreading) or allowed to spread on a glass surface for 10 min (lower panels, 30' inhibitors / 10' spreading) before fixation and α -tubulin staining; bar, 10 μm .

(C) Control rabbit IgGs as well as mouse-anti-dynein and rabbit-anti-kinesin function blocking antibodies were introduced into living platelets using the chariot kit. Platelets were then allowed to spread on glass coverslips for 10 min, fixed and stained using a monoclonal rabbit anti α -tubulin antibody for the anti-dynein chariot and a mouse anti α -tubulin antibody for the control and the anti-kinesin chariot conditions (in green) as well as secondary antibodies recognising the introduced antibodies (anti-mouse for the dynein chariot and anti-rabbit for the control and the kinesin chariot conditions, in red); bar, 10 μm .

(D) 3D-projection of a confocal z-stack of platelets treated as in Fig. 1B upper panel with 10 μM ATA but for only 3 min, fixed and stained for acetylated tubulin; bar, 5 μm . Associated video

Figure 2: MB coiling in activating platelets

(A) 3D reconstruction of confocal z-stacks of three representative examples of transiently activated platelets present in PRP prepared from freshly drawn blood, fixed and stained for acetylated tubulin; bar, 2 μm . Associated video.

(B) Left panels show transiently activated platelets present in PRP prepared from freshly drawn blood; either single platelets or platelets forming a small aggregate or platelets of the same PRP, which have regained the resting state after a recovery period (120 min, RT). Right panels show platelets present in PRP prepared from buffy coats activated for 60 seconds with the following agonists: arachidonic acid (6.25 μM), ADP (25 nM), thrombin (0.01 U/ml). Platelets are stained for α -tubulin; bar, 2 μm . Associated video.

(C) Time-lapse video of a microtubule tracker stained platelet spreading on a glass surface. Transmission (left) and fluorescence (right) images are taken simultaneously every 5 seconds; bar, 2 μm . Three time points of the activation sequence are shown: disc shape with

resting MB, sphere shape with coiled MB, spread platelet with small microtubule ring. Associated video.

(D) Two time points of time-lapse videos of 3D reconstructions of confocal stacks of microtubule tracker stained platelets activated with Thrombin (0.017 U/ml final), ADP (135 nM final) or treated with ATA (6.7 μ M final). 3D projections are depth-color coded as indicated. Associated video

(E) Two time points of a time-lapse video of 3D reconstructions of confocal stacks of microtubule tracker stained platelets activated with ADP (270 nM final). 3D projections are depth-color coded as indicated. Shown are two different view angles to observe microtubules short-cutting the coiled bundle (arrow). Associated video

Figure 3: Dynein-mediated MB extension induces its coiling

(A) The MB length of resting platelets (PRP prepared from freshly drawn blood after a recovery period) and transiently activated platelets, present in PRP prepared from freshly drawn blood, was measured as described in the methods section. Platelets were grouped in five categories according to different coiling stages (stage 1, resting platelets, n=66; stage 2, start of coiling, n=31; stage 3, slightly coiled, n=32; stage 4, more coiled, n=33; stage 5, maximum coiled, n=16; data are presented as mean \pm SEM; *p<0.017, **p<0.38, ***p<0.033, ****p<0.0009).

(B) Platelets prepared from freshly drawn blood with coiling MBs were diluted in PBS (2.5×10^6 /ml) and incubated with or without EHNA (1 mM final) for 10 min at RT, fixed and stained for α -tubulin. Arrows indicate platelets having simultaneously coiled and resting MBs; bar 2 μ m. Associated video

Figure 4: Newly polymerising microtubules form a smaller microtubule ring in activated platelets

Platelets with MBs at different coiling stages were triple-immunostained for acetylated α -tubulin (green), tyrosinated α -tubulin (red) and total α -tubulin (magenta). Individual stainings as well as merges of 3D reconstructions of confocal z-stacks are shown in upper panels. The lower panels are generated from the different stainings after thresholding and skeletonising of the MBs. Associated videos

(A) resting platelet (stage 1), MB 9.1 μ m

(B) platelet after ATA (10 μ M) treatment for 3 min, beginning of coiling (stage 3), MB 9 μ m

(C) platelet in PRP from freshly drawn blood, coiled MB (stage 4), 13.4 μ m

(D) platelet after ADP (5 μ M) activation for 10 sec, strongly coiled MB (stage 5), coiled MB 13.3 μ m, smaller ring 10.4 μ m

(E) platelet after ADP (5 μ M) activation for 10 sec, strongly coiled MB (stage 5), coiled MB 13.6 μ m, smaller ring 9 μ m

(F) platelet after ADP (5 μ M) activation for 10 sec, strongly coiled MB (stage 5), coiled MB 13.4 μ m, smaller ring 7.8 μ m

Figure 5: Acto-myosin contraction compresses the coiled MB

(A) Platelets were diluted in PBS (2.5×10^6 /ml) and pretreated without or with 25 μ M or 50 μ M blebbistatin or 1 μ g/ml cytochalasin D for 30 min at RT. Platelets were then either activated with ADP (2.5 μ M final) for 10 min at RT (lower) or not (upper panels), fixed and stained for α -tubulin; bar 2 μ m.

(B) Putative sequence of events leading to platelet activation (to simplify only 2 microtubules are shown in disc shaped platelets).

Supplementary Figure legends

Figure s1: Quantification of microtubule motor inhibitor treatments

(A) Platelets shown in figure 1B, upper panel had been double stained for tubulin and phalloidin-rhodamine. Platelet size has been estimated using the phalloidin staining. The histogram depicts the percent of platelets present in different size categories as indicated on the x-axis. 200 platelets were counted for each condition of a typical experiment repeated four times.

(B) Quantification of platelet spreading assays after EHNA and ATA inhibition (as shown in figure 1B, lower panels) as well as after introduction of function blocking dynein and kinesin antibodies (as shown in figure 1C).

Figure s2: Characterisation of MB coiling conditions

(A) Resting platelets in PRP from buffy coats were diluted in PBS ($16 \times 10^6/\text{ml}$) and preincubated without or with EHNA (1 mM final) or Tracker stain (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) or Taxol (25 μM final) for 45 min at RT before platelet activation for 60 sec with ADP at 25, 50 and 100 nM final concentrations. Platelets are then fixed and stained for α -tubulin; bar, 5 μm .

(B) Time-lapse videos of 3D reconstructions of confocal stacks of microtubule tracker stained platelets. MB coiling is induced by activation of acto-myosin contraction using calyculin (17 nM final). Shown are time points for resting and coiled MBs. 3D projections are depth-color coded as indicated. See also associated video.

Figure s3: MB length measurements

The MB length of four platelets shown in videos associated with figure 2D and E was measured at successive time points of the time-lapse videos (μm , blue curve) and compared to the degree of coiling (stages 1-5, red curve).

Video legends

Fig 1D video1:

Resting platelets in PRP from buffy coats were diluted in PBS (2.5×10^6 /ml) and incubated in suspension with $10 \mu\text{M}$ ATA (kinesin inhibitor) for 3 min at RT, then fixed in suspension, centrifuged onto glass coverslips and stained with an anti acetylated tubulin antibody. Shown is a 3D-reconstruction of confocal z-stack images (bar, $5 \mu\text{m}$).

Fig 2A video2:

Transiently activated platelets present in PRP prepared from freshly drawn blood, fixed and stained with an anti acetylated tubulin antibody. Three representative examples of platelets are shown after 3D-reconstruction of confocal z-stack images (bar, $2 \mu\text{m}$).

Fig 2B video3:

Left panels show transiently activated platelets present in PRP prepared from freshly drawn blood; either single platelets or platelets forming a rarely observed small aggregate or platelets of the same PRP, which have regained the resting state after a recovery period (120 min at RT with gentle agitation). Right panels show platelets present in PRP prepared from buffy coats activated for 60 seconds with the following agonists: arachidonic acid ($6.25 \mu\text{M}$), ADP (25 nM), thrombin (0.01 U/ml). Please note that in order to be able to observe marginal band coiling, agonist concentrations have to be adjusted for each experiment because of inter-donor variations and depending on the PRP preparation (resting platelets present in PRP prepared from buffy coats are less reactive compared to resting platelets prepared from freshly drawn blood after a recovery period). Platelets were fixed in suspension and stained with the mouse monoclonal anti α -tubulin antibody. Shown are 3D reconstructions of confocal z-stack images (bar, $2 \mu\text{m}$).

Fig 2C video4:

Time-lapse video microscopy of a microtubule tracker stained human platelet spreading on a glass surface. Transmission (left) and fluorescence (right) images are taken simultaneously every 5 seconds (bar, $2 \mu\text{m}$).

Fig 2D video5:

Time-lapse videos of 3D reconstructions of confocal stacks of microtubule tracker stained platelets activated with Thrombin (0.017 U/ml final), ADP (135 nM final) or treated with ATA (6.7 mM final). 3D projections are depth-color coded as indicated.

Fig 2E video6:

Time-lapse video of 3D reconstructions of confocal stacks of microtubule tracker stained platelets activated with ADP (270 nM final). 3D projections are depth-color coded as indicated. Shown are two different view angles to observe microtubules short-cutting the coiled bundle.

Fig 3B video7:

Platelets prepared from freshly drawn blood with coiling marginal bands were diluted in PBS (2.5×10^6 /ml) and incubated without inhibitor or with the dynein inhibitor EHNA (1 mM final) for 10 min at RT. Platelets were then fixed and stained with the monoclonal mouse anti α -tubulin antibody. Shown are 3D reconstructions of confocal z-stack images (bar, 2 μ m).

Fig 4ABC video8:

Shown are 3D-reconstructions of confocal z-stack images of platelets triple-immunostained with antibodies against acetylated α -tubulin (green), tyrosinated α -tubulin (red) and total α -tubulin (magenta). Individual stainings as well as merges are shown in the upper panels (bar, 2 μ m). The lower panels are generated from the different stainings after thresholding and skeletonizing of the marginal band.

(A) Resting platelet (stage 1; marginal band 9.1 μ m)

(B) Platelet after ATA (kinesin inhibitor, 10 μ M) treatment for 3 min (beginning of coiling, stage 3; marginal band 9 μ m)

(C) Platelet present in PRP from freshly drawn blood (coiled marginal band, stage 4; marginal band 13,4 μ m)

Fig 4DEF video9:

Shown are 3D-reconstructions of confocal z-stack images of platelets triple-immunostained with antibodies against acetylated α -tubulin (green), tyrosinated α -tubulin (red) and total α -tubulin (magenta). Individual stainings as well as merges are shown in the upper panels (bar, 2 μ m). The lower panels are generated from the different stainings after thresholding and skeletonizing of the marginal band.

(D) Platelet after ADP (5 μ M) activation for 10 sec (strongly coiled marginal band, stage 5; coiled marginal band 13.3 μ m, smaller ring 10.4 μ m)

(E) Platelet after ADP (5 μM) activation for 10 sec (strongly coiled marginal band, stage 5; coiled marginal band 13.6 μm , smaller ring 9 μm)

(F) Platelet after ADP (5 μM) activation for 10 sec (strongly coiled marginal band, stage 5; coiled marginal band 13.4 μm , smaller ring 7.8 μm)

Please note that there may be two reasons for the absence or faint staining of microtubule subpopulations by the general anti- α -tubulin antibody. First, antibodies directed against acetylated and tyrosinated tubulin have a very high affinity for the individual modification and will give a strong signal even when only very few microtubules are present, while a higher number of microtubules may be necessary to obtain a strong signal with the general tubulin antibody. Second, there might also be an effect of steric hindrance between the mouse monoclonal anti-acetylated tubulin and the rabbit monoclonal anti- α -tubulin antibody since their epitopes are in relative close proximity.

Fig s2B video10:

Time-lapse videos of 3D reconstructions of confocal stacks of microtubule tracker stained platelets. MB coiling is induced by addition of calyculin (17 nM final). 3D projections are depth-color coded as indicated.

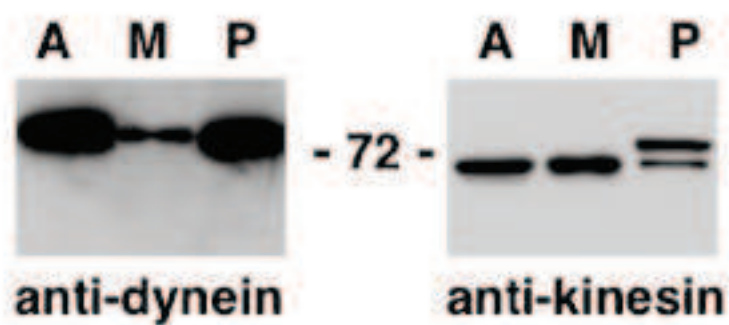
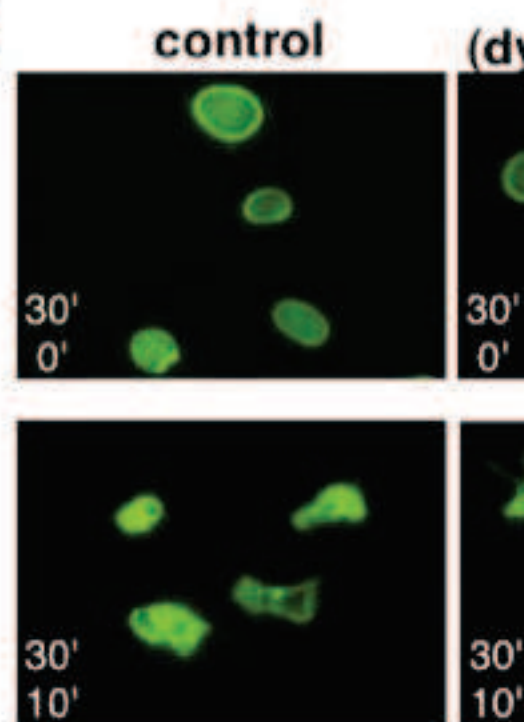
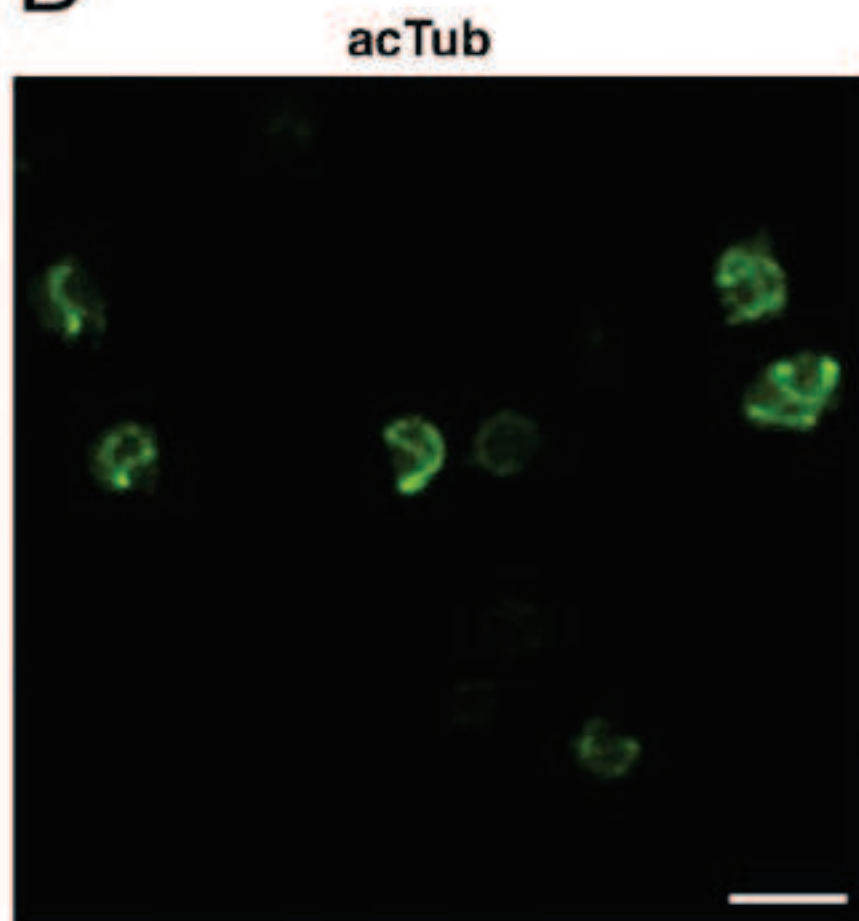
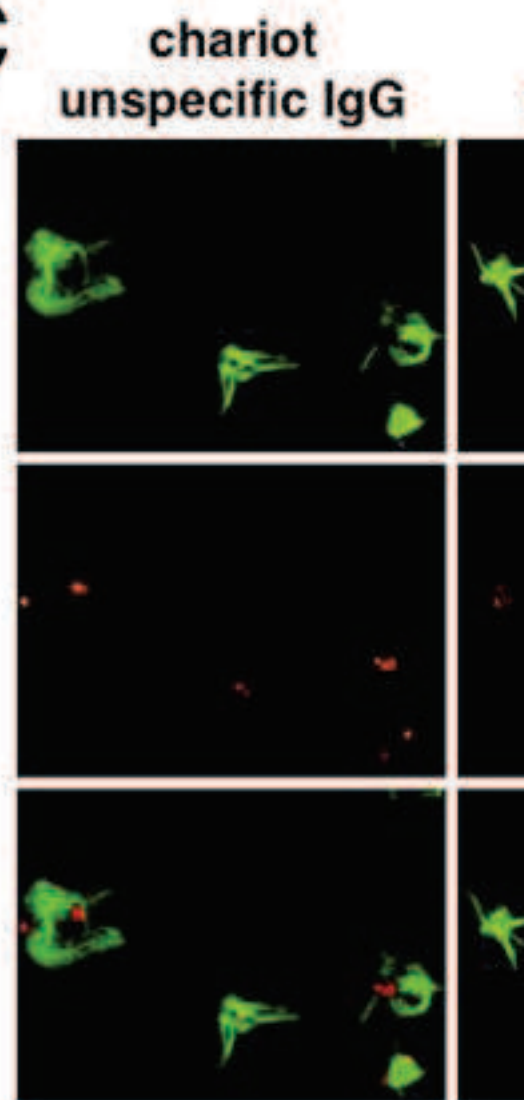
A**B****D****C**

Figure 1

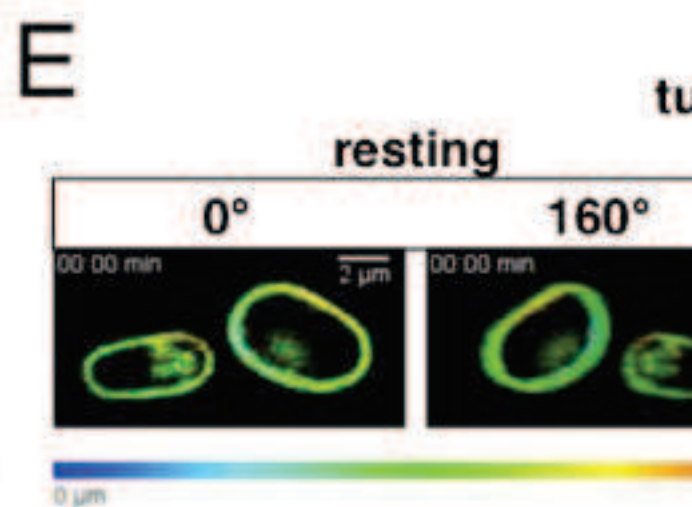
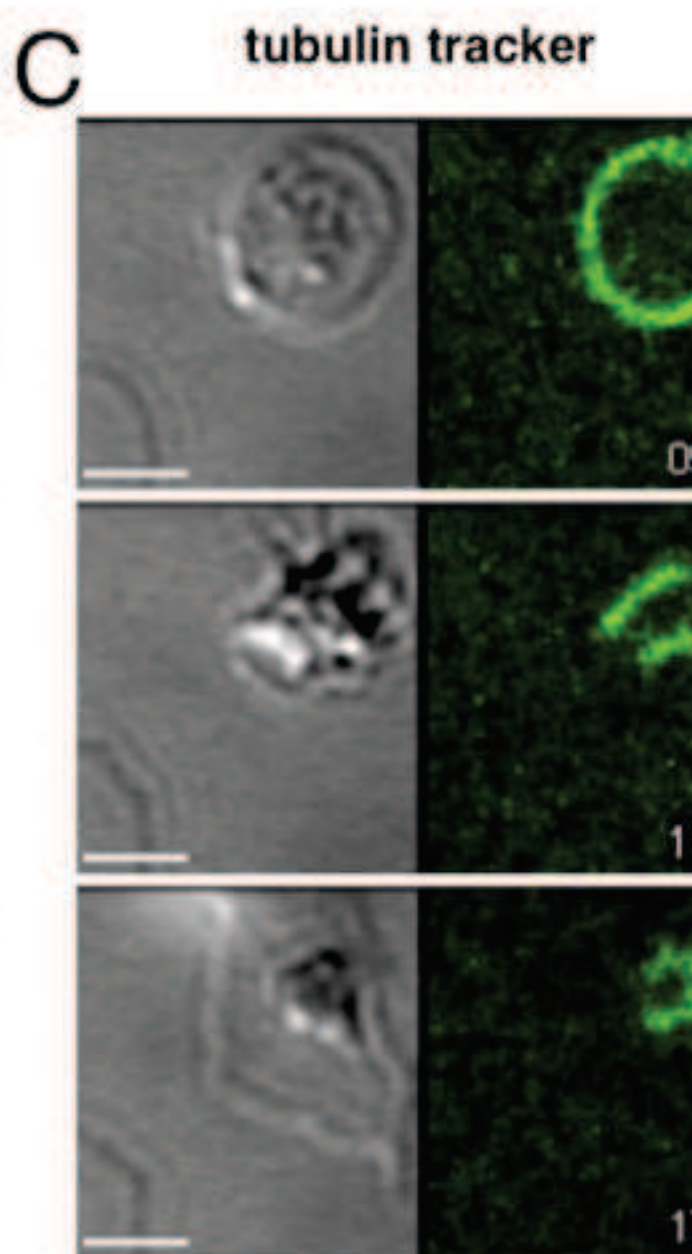
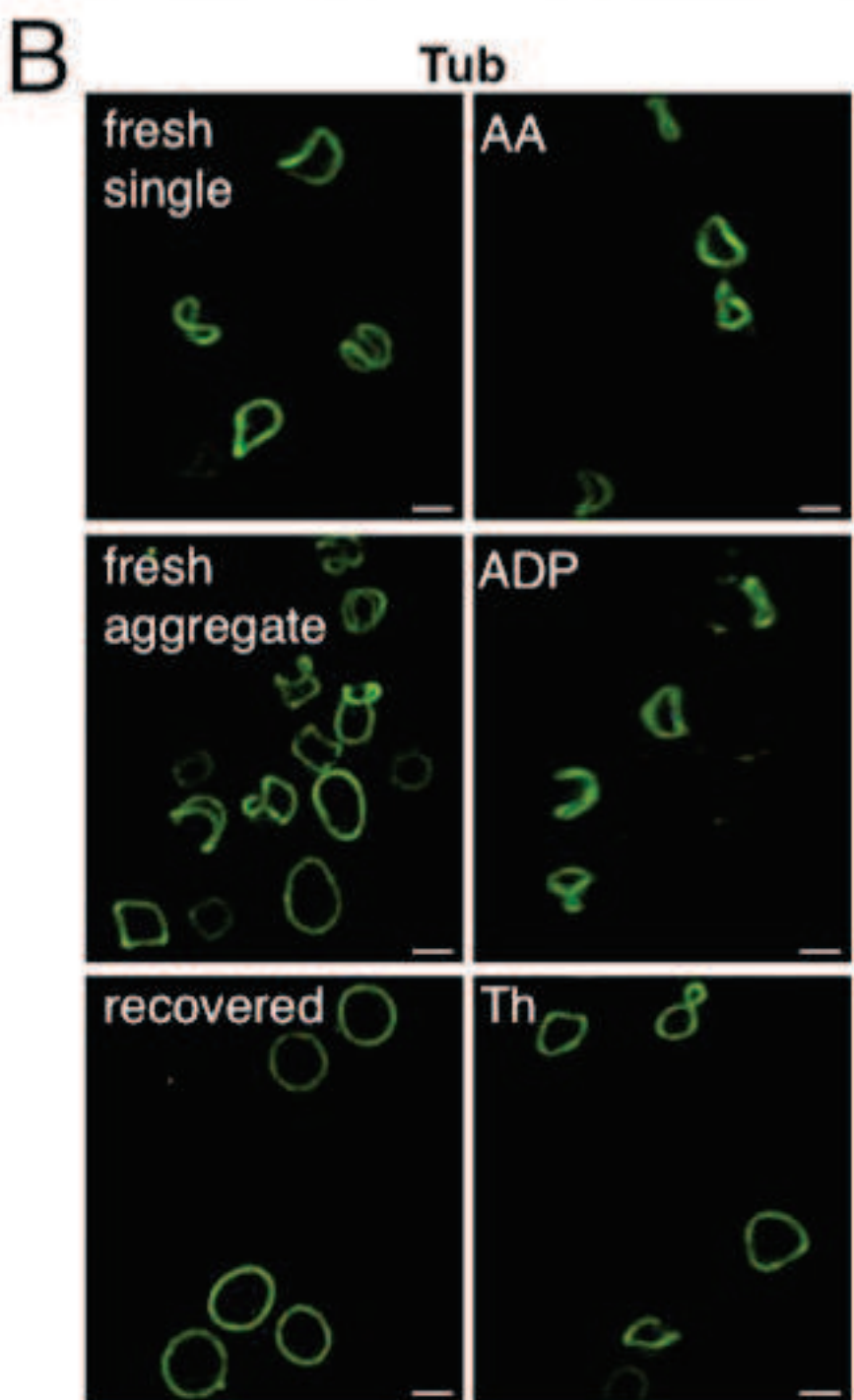
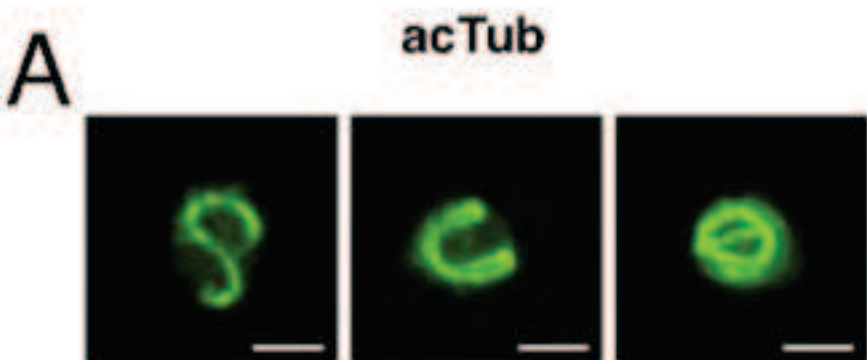


Figure 2

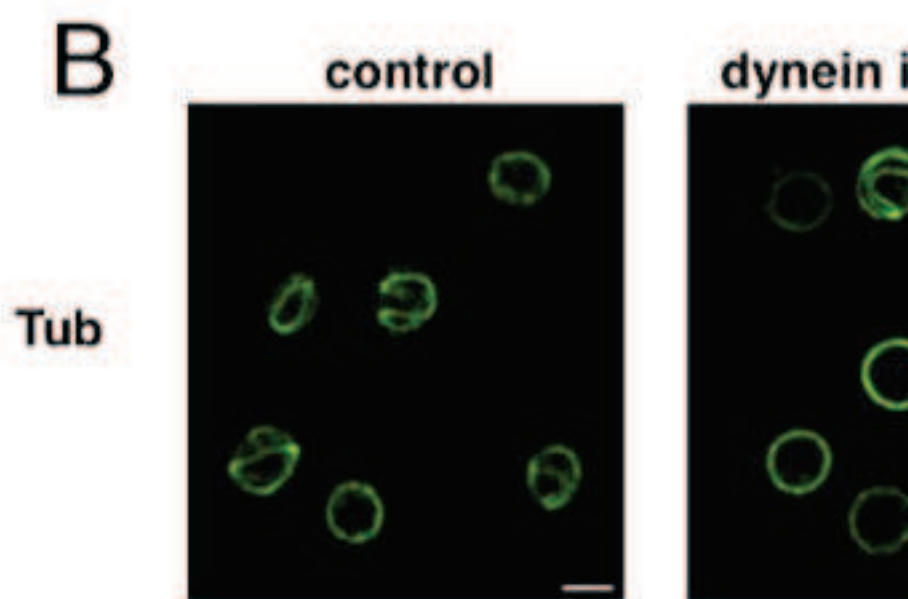
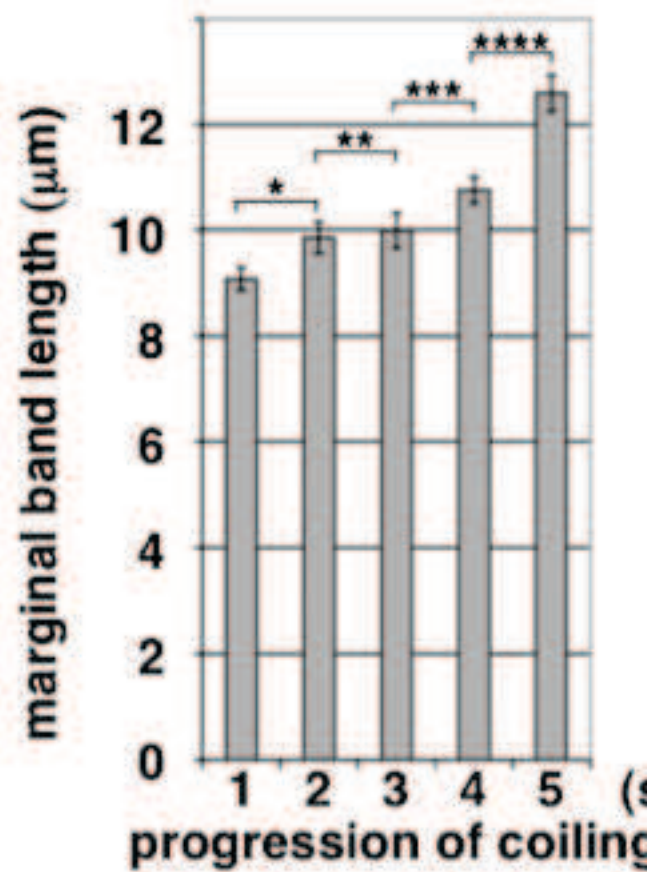
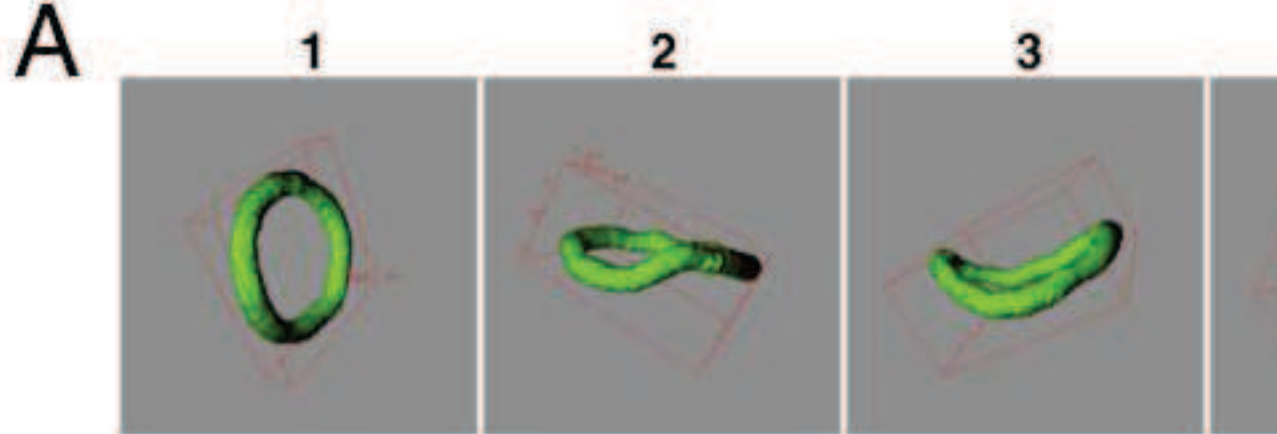


Figure 3

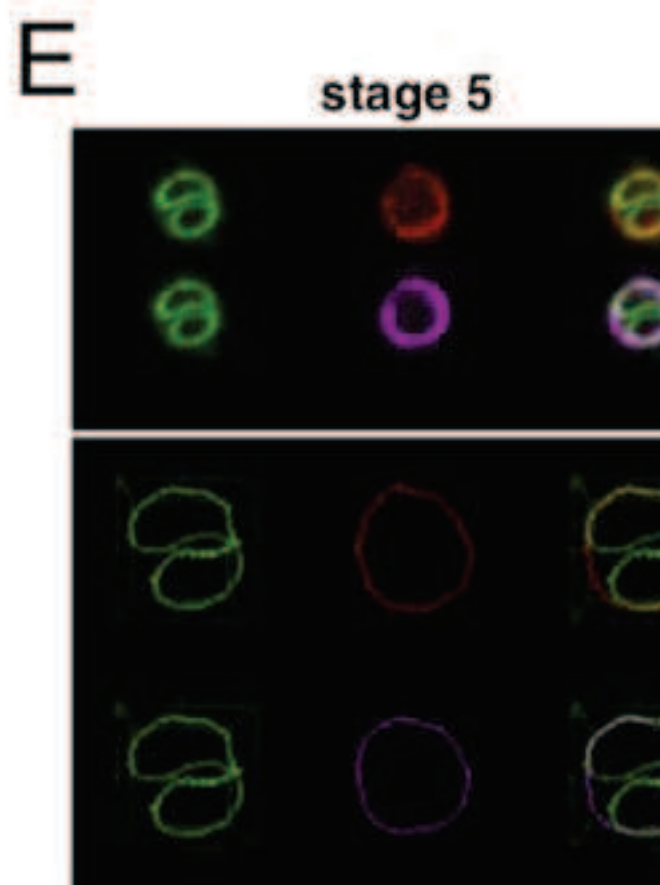
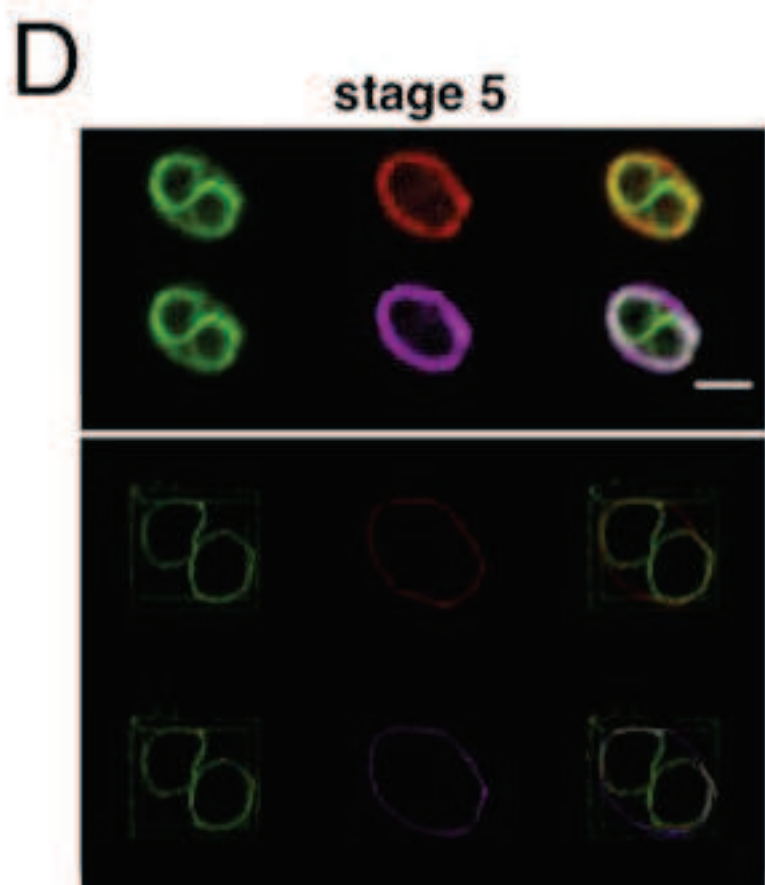
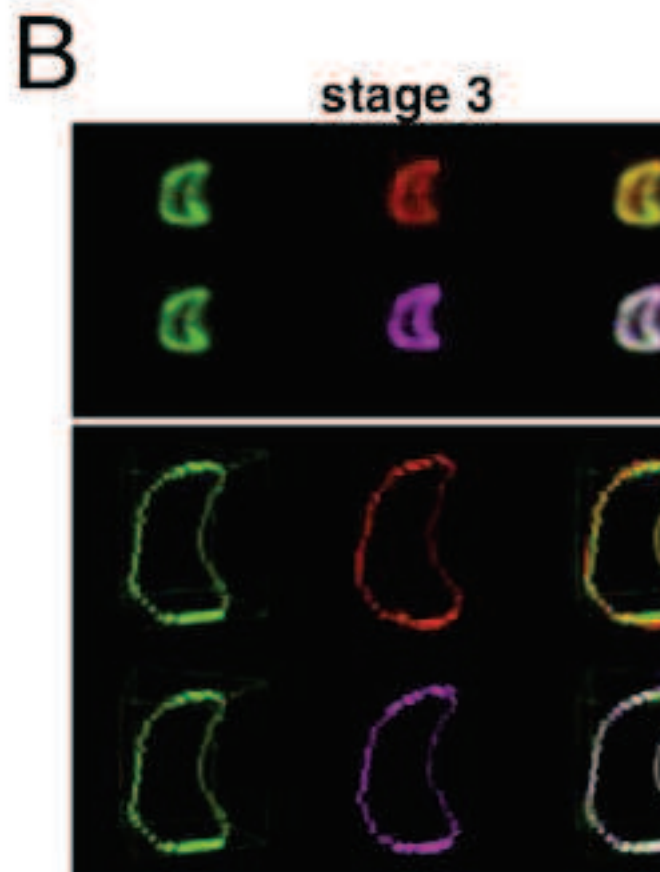
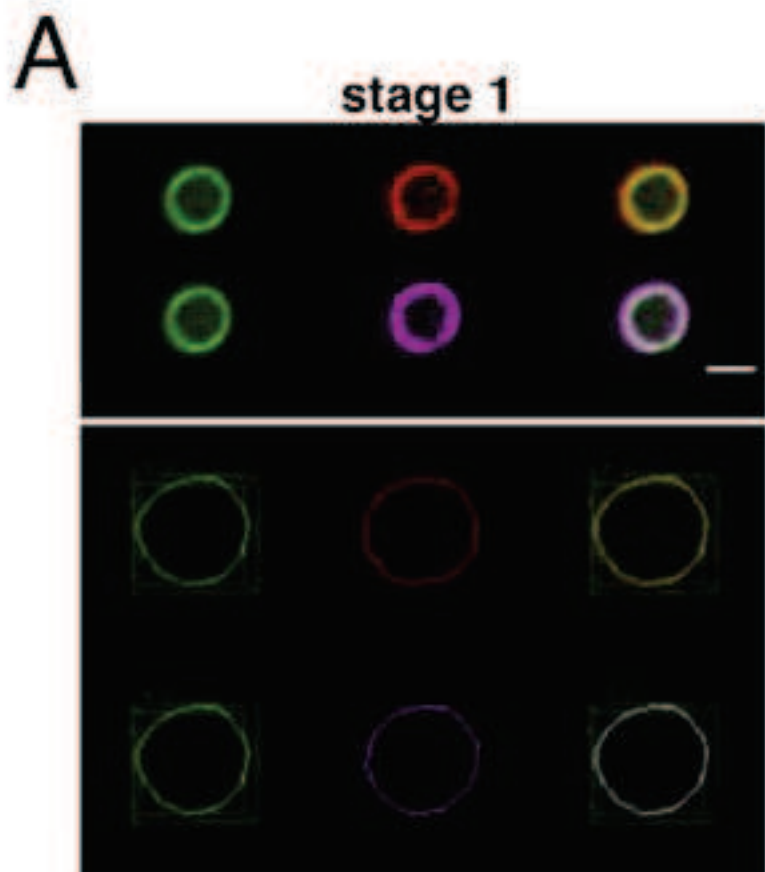


Figure 4

● acetylated

● tyrosinated

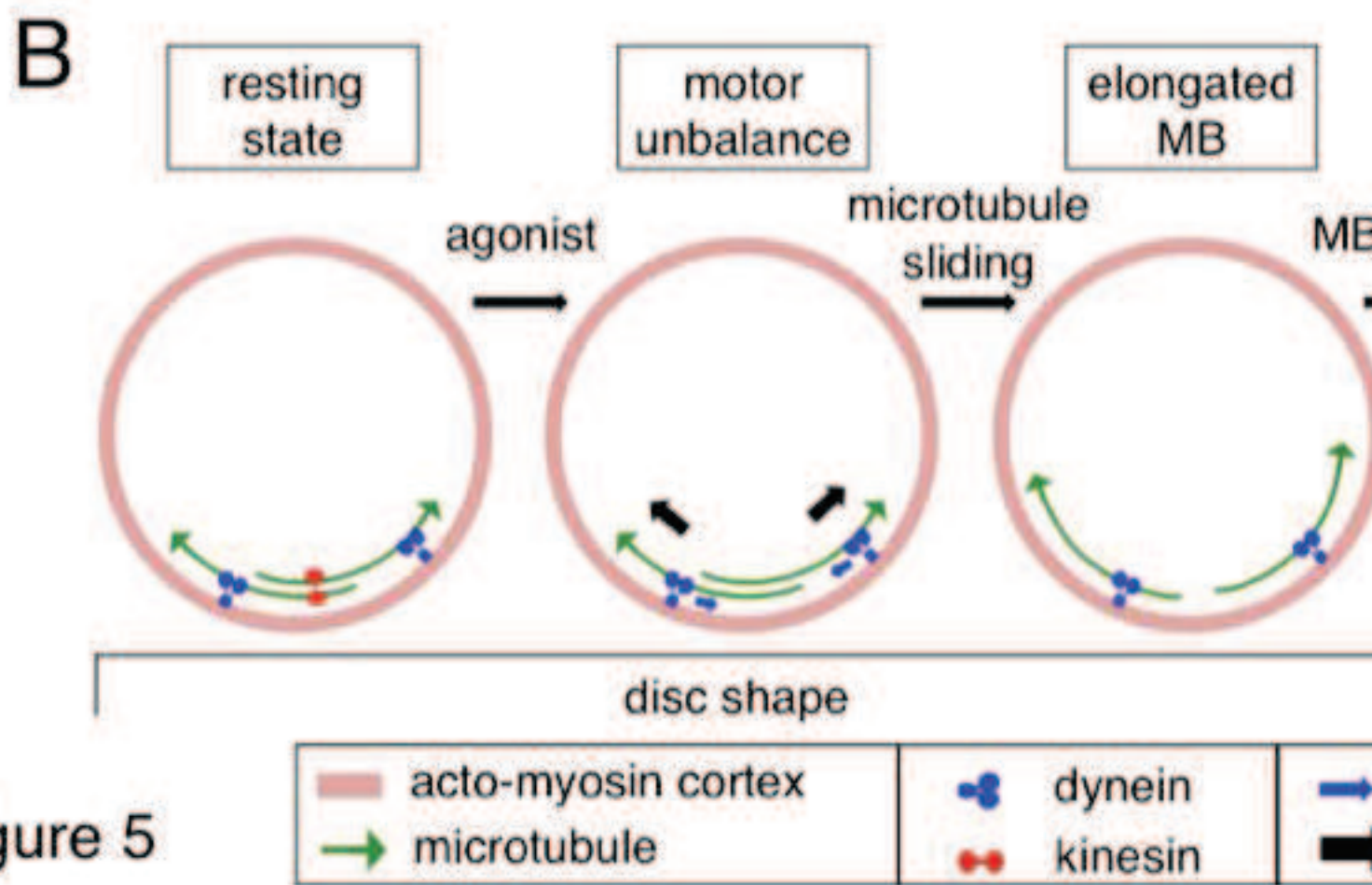
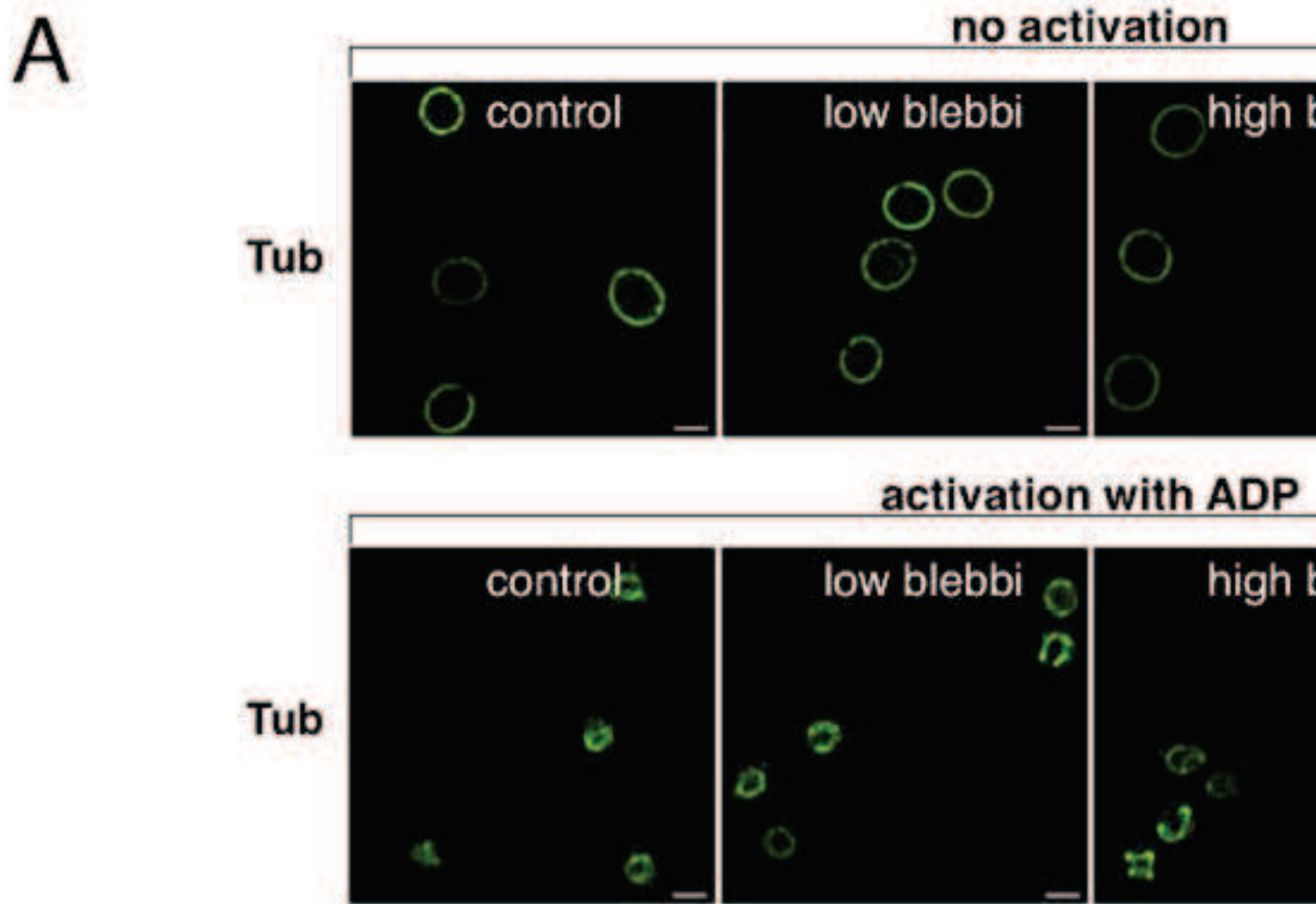
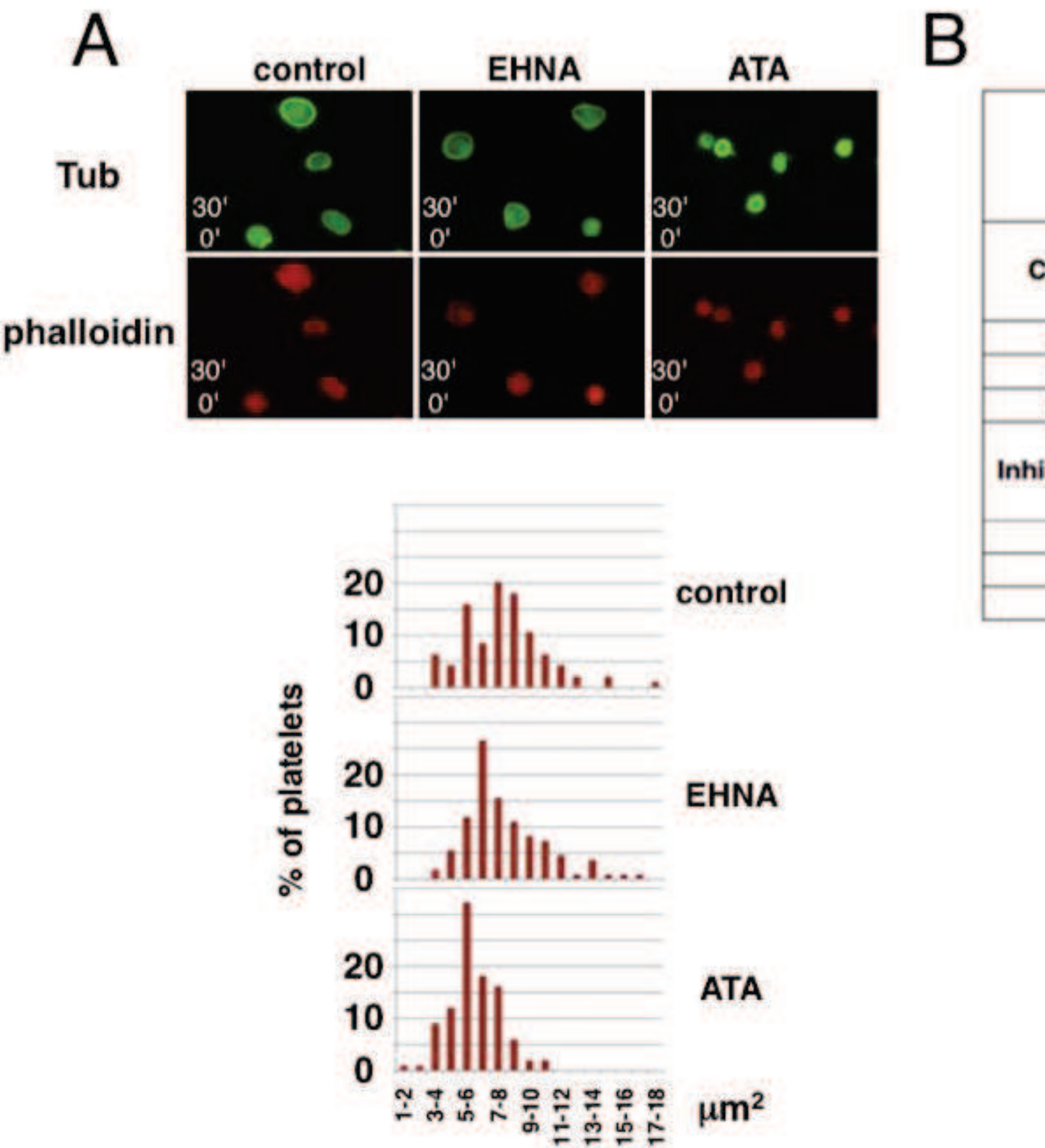
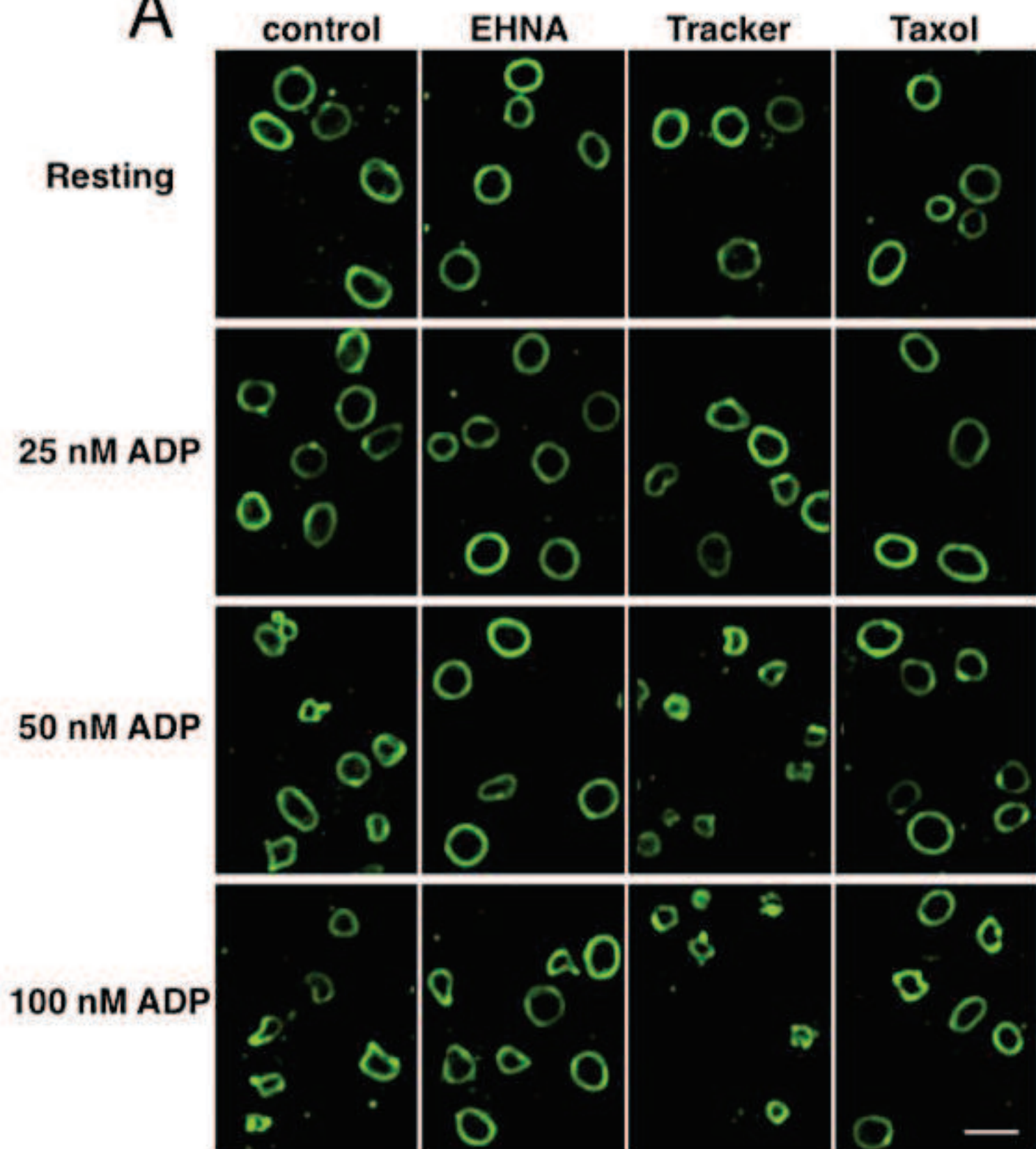


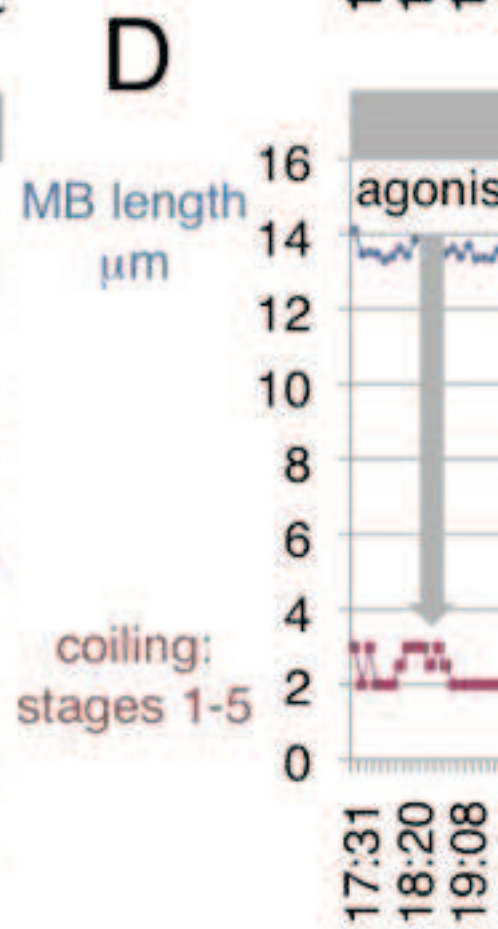
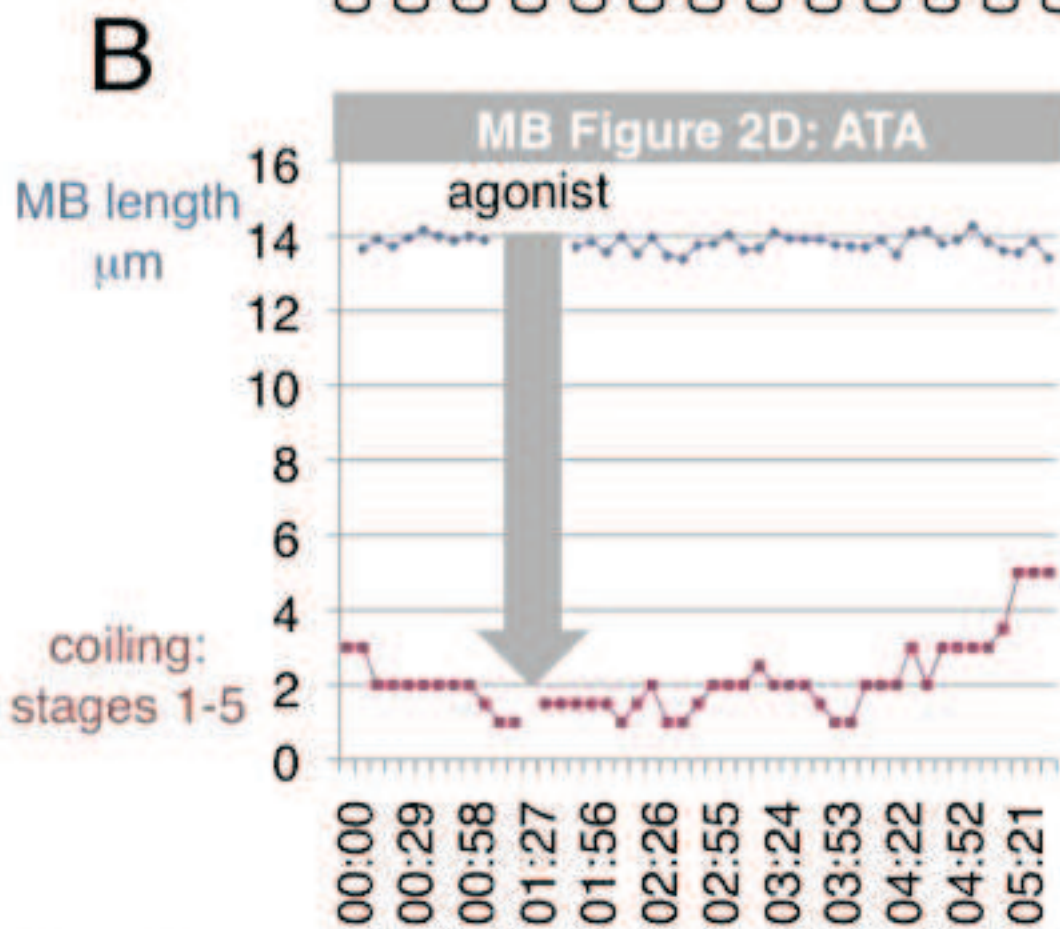
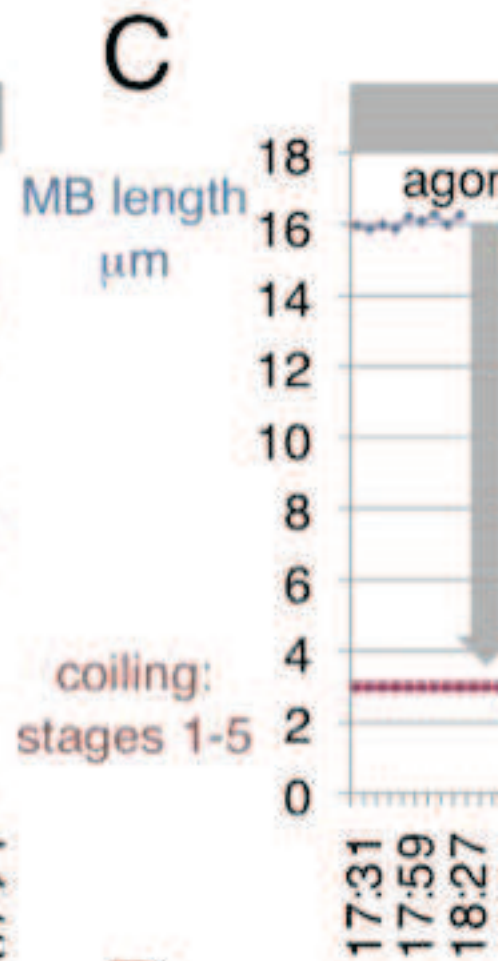
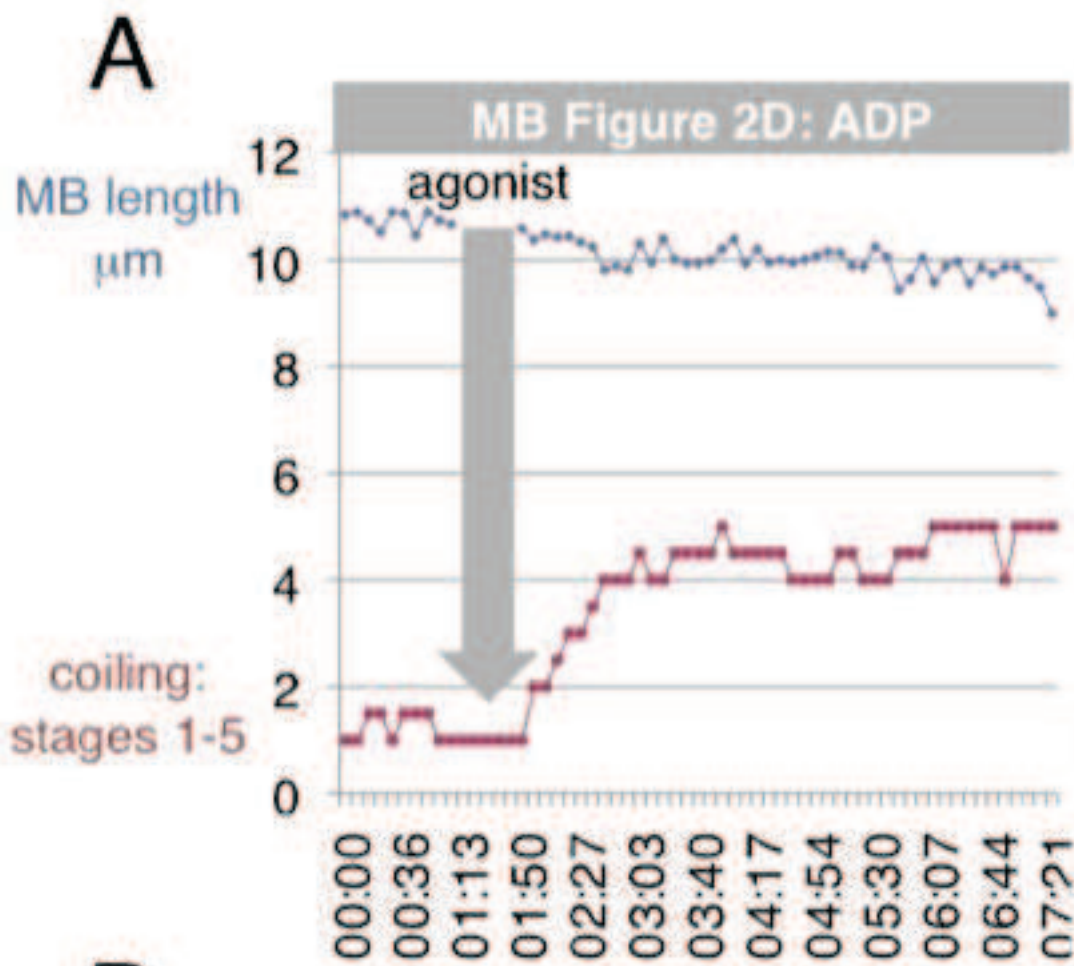
Figure 5



Supplementary Figure s1

A

Supplementary Figure s2



Supplementary Figure s3