

TLEMCEM

N° d'Ordre XXXXX



UNIVERSITÉ DE TLEMCEM – ABOU-BEKRBELKAÏD
FACULTÉ SNV-STU – DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE –
BIOMOLIM

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur 3ème Cycle LMD en Biologie
Spécialité Immunologie Appliquée
Année Universitaire 2018/2019

Caractérisation des ARN longs non codants
régulés par la signalisation du TCR dans les lymphocytes
T immatures

Par :

SAADI Wiam

Sous la direction du Pr. Mourad ARIBI & Dr. Salvatore SPICUGLIA

Soutenue le **/**/2019 devant le jury :

Président : Pr. LAHFA Farid

Rapporteur : Dr. PUTHIER Denis

Rapporteur : Pr. MAHDJOUR Tewfik

Rapporteur : Pr. TOUIL-BOUKOFFA Chafia

TLEMCEM
N° d'Ordre XXXXX



UNIVERSITÉ DE TLEMCEM – ABOU-BEKRBELKAÏD
FACULTÉ SNV-STU – DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE ET IMMUNOLOGIE –
BIOMOLIM

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur 3ème Cycle LMD en Biologie
Spécialité Immunologie Appliquée
Année Universitaire 2018/2019

Caractérisation des ARN longs non codants
régulés par la signalisation du TCR dans les lymphocytes
T immatures

Par :

SAADI Wiam

Sous la direction du Pr. Mourad ARIBI & Dr. Salvatore SPICUGLIA

Soutenue le **/**/2019 devant le jury :

Président : Pr. LAHFA Farid

Rapporteur : Dr. PUTHIER Denis

Rapporteur : Pr. MAHDJOUR Tewfik

Rapporteur : Pr. TOUIL-BOUKOFFA Chafia

Résumé

Introduction : La transcription omniprésente dans notre organisme génère des milliers d'ARN non codants (ARNnc) pouvant réguler l'expression des gènes et jouer un rôle important dans divers processus biologiques tel que le développement. Parmi ces ARN, les long ARN non codants (lncARN) qui restent jusqu'à présent mal caractérisés malgré leurs rôles importants dans la régulation génique.

Objectifs : L'objectif principale a été d'identifier et de caractériser les lncARN impliqués dans le développement des lymphocytes T. La présente étude a été menée en se servant des données de séquençage à haut débit de la lignée cellulaire P5424 stimulée par le PMA/ionomycin, générées par le laboratoire de Théories et approches de la complexité génomique (TAGC) à Luminy (Université Aix-Marseille, AMU).

Résultats : L'analyse des données de séquençage à haut débit de l'ARN (ARN-seq), nous a permis de sélectionner huit paires de lncARN et gènes codants, voisins co-régulés par la stimulation au PMA/ionomycin, dont trois réprimés et cinq induits. Aussi, l'expression différentielle de ces candidats a été validée par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) classique et par la PCR quantitative en temps réel (qPCR). L'étude de la cinétique d'expression des paires lncARN/gènes codants, après la stimulation au PMA/ionomycin, nous a permis de sélectionner des couples lncARN/gènes codants voisins, avec des profils d'expression hautement corrélés, ce qui suggère une régulation par les lncARN. Parmi ces paires, nous avons constaté que XLOC_000895/*Bcl2* (B-cell lymphoma 2) présentait une cinétique d'activation très similaire, suggérant un lien fonctionnel de régulation en cis. La délétion de XLOC-000895 (*Robnr*) par la technique CRISPR-Cas9 affecte l'expression de son gène codant voisin *Bcl2*. Par ailleurs, l'analyse de ChIP (chromatine immunoprécipitation) pour étudier l'enrichissement H3K4me3 (La tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3) a révélé que la délétion de *Robnr* affecte également l'enrichissement en H3K4me3 du locus *Bcl2*.

Conclusions : Nos résultats constituent une première étape dans la caractérisation des lncARN, qui peuvent être impliqués dans la différenciation et l'activation des cellules T. Ils méritent d'être enrichi à l'aide d'études complémentaires, afin de confirmer la contribution spécifique du locus de *Robnr* au développement des cellules T, et son rôle critique dans la régulation de l'expression du gène *Bcl2*.

Mots clés : lncARN ; ARN-seq ; lymphocytes T ; CRISPR-Cas9.

Abstract

Introduction : The ubiquitous transcription in our body generates thousands of non-coding RNAs (ncRNAs) that can regulate gene expression, and plays an important role in various biological processes, like development. Among this RNAs, long non coding RNAs (lncRNAs), are still poorly characterized despite the importance of their regulatory roles.

Objectives : We tried to identified and characterize lncRNAs that could be involved in the development of T lymphocytes. The study was conducted by using the high throughput sequencing data, generated by the TAGC laboratory in MARSEILLE, of the P5424 cell line stimulated with PMA/ionomycin.

Results : Analysis of the RNA-seq data allowed us to select eight pairs of lncRNAs and neighboring coding genes, co-regulated by PMA/ionomycin stimulation, of which three where repressed and five where induced. The differential expression of these candidates was validated by conventional polymerase chain reaction (PCR) and by quantitative real-time PCR (qPCR). The gene expression kinetics after the PMA/ionomycin stimulation led to the selection of lncRNA/coding gene pairs with markedly well correlated expression profiles. Among this gene pairs, we found that the XLOC_000895/*Bcl2* pair display a highly similar kinetic of activation, hence strongly supporting a functional cis-regulatory link. The deletion of XLOC-000895 (*Robnr*) by the CRISPR-Cas9 method affects the expression of its neighbor coding gene, *Bcl2*. In addition, H3K4me3 (histone H3 tri-methylation at lysin 4) ChIP (Chromatin immunoprecipitation) analysis revealed that the *Robnr* deletion decreases H3K4me3 levels in the *Bcl2* locus.

Conclusions : Our findings are very promising given that they can constitute a first step in the characterization of lncRNAs, which may be involved in the differentiation and activation of the T-cells. The current study deserves to be pursued in order to confirm the specific implication of *Robnr*'s in T-cell development through the regulation of *Bcl2* gene.

Keywords : lncRNAs ; RNA-seq ; T lymphocytes ; CRISPR-Cas9.

ملخص

مقدمة: عملية النسخ المستمرة في اجسامنا تولد الاف النسخ من الحمض النووي الريبوزي أو الذي لا يحول الى بروتين ncrRNA ولكن ينظم التعبير الجيني ويلعب دورا هاما في الوظائف الحيوية وفي العمليات البيولوجية المختلفة. من بينها، الحمض النووي الريبوزي الطويل او lncRNA الذي لا يزال الى الوقت الحالي غير معروف بشكل جيد على الرغم من أهمية أدواره التنظيمية.

الهدف: الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو معرفة و تحديد lncRNA المشاركة في تطوير الخلايا للمفاوية الثانية (T-cell). أجريت الدراسة باستخدام بيانات تحليل التسلسل الوراثي باستخدام أدوات المعلوماتية الحيوية التي تم إنشاؤها في مختبر (TAGC) بمارسيليا، للخلية الثانية P5424 المحفزة ب PMA/ionomycin.

النتائج: تحليل بيانات (RNA-seq) سمح لنا اختيار ثمانية (08) ازواج متجاورة و بنفس التنظيم من lncRNA و الجينات التي تحول الى بروتين بعد التحفيز ب PMA/ionomycin منها ثلاثة (03) مكبوتة وخمس (05) مستحثة. أيضا، تم التحقق من صحة التعبير التفاضلي للازواج المختارة عن طريق PCR الكلاسيكي و PCR بالزمن الحقيقي. سمحت لنا دراسة حركية التعبير للازواج المختارة بعد تحفيزها ب PMA/ionomycin، لاختيار أزواج lncRNA و الجينات التي تحول الى بروتين التي تتميز ببروفايالات تعبير مترابطة تشير إلى تنظيم محتمل بواسطة lncRNA. من بين الأزواج المترابطة بشكل جيد، وجدنا أن الزوج XLOC_000895/*Bcl2* أظهر حركية تنشيطية متشابهة جدًا، مما يشير إلى احتمال وجود ارتباط تنظيمي وظيفي. يؤثر حذف XLOC_000895 (*Robnr*) بواسطة تقنية CRISPR-Cas9 على تعبير الجين المجاور *Bcl2*. بالإضافة إلى ذلك، تحليل CHIP الرامي لمعرفة مدى وفرة H3K4me3 , كشف أن حذف *Robnr* يؤثر على مدى وفرة H3K4me3 في الجين المجاور *Bcl2*. كل هذه النتائج تدل على انه من المحتمل ان يمثل *Robnr* منظم حاسم لتعبير الجين *Bcl2*.

الاستنتاجات: النتائج التي تم الحصول عليها واعدة للغاية وتشكل خطوة أولى في وصف lncRNA التي قد يكون لها دور مهم في تمايز وتفعيل الخلايا للمفاوية الثانية. يستحق العمل الحالي المتابعة بتحقيق دراسات تكميلية أخرى، من أجل تأكيد المساهمة الخاصة ل *Robnr* في تطوير الخلايا الثانية من خلال تنظيم *Bcl2*.

الكلمات المفتاحية: lncRNA؛ RNA-seq؛ الخلايا للمفاوية الثانية؛ CRISPR-Cas9

Remerciements

Ce travail de thèse a bénéficié d'un soutien financier dans le cadre du projet CMEP-PHC-Tassili issu d'un partenariat entre le Ministère Algérien de l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique et l'Egide Français. Que ces organismes soient remerciés ici. Cette thèse s'est déroulée en collaboration, dans le cadre d'un accord programme, entre le laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIOMOLIM) de l'Université de Tlemcen et le laboratoire de Théories et Approches de la Complexité Génomique (TAGC) de Marseille.

Je tiens tout d'abord à remercier mes différents encadrants au cours de ces années :

Mr le Pr. Mourad ARIBI, merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire. Merci pour votre investissement et encadrement. J'ai pu grâce à vous entreprendre un travail de recherche très passionnant. Soyez assuré de ma reconnaissance !

Mr le Dr. Salvatore SPICUGLIA, merci de m'avoir accueilli dans ton équipe. Je t'adresse ici mes remerciements les plus sincères pour la confiance que tu m'as accordée, pour ton enthousiasme, ta disponibilité, ton encouragement et ton soutien à chaque fois que j'en ai eu besoin. J'ai beaucoup appris à tes côtés mais surtout, j'ai pris beaucoup de plaisir à le faire. Je suis très honorée de t'avoir eu comme encadrant. *Gracias Salva!*

Je tiens à remercier Mr le Pr. LAHFA Farid pour me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux membres du jury, Dr. PUTHIER Denis, Maître de conférences à l'université d'Aix-Marseille, Mr MAHDJOUR Tewfik, Professeur à l'université de Tlemcen, Mme TOUIL-BOUKOFFA Chafia, Professeur à l'USTHB (Alger), qui ont l'amabilité d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier Nour & Mohamed, merci pour votre aide, accueil généreux et votre gentillesse depuis mon arrivée à Marseille. Trouvez ici toute ma reconnaissance.

Un grand merci également à Eve-lyne qui m'a soutenu dans ce travail. Merci pour l'aide que tu as apporté au projet, tes encouragements, tes conseils professionnels et personnels ont été très précieux pour moi. Mille Merci !

Je voudrais également exprimer ma profonde gratitude à Denis pour ses conseils et son investissement durant nos réunions d'équipe. Merci beaucoup !

Je tiens à adresser des remerciements à tous ceux qui m'ont aidée dans l'accomplissement de ce travail. A ce titre, je remercie particulièrement Denis Puthier, Kermezli Yasmina et Belhoucine Mohamed pour les analyses bio-informatiques. Lan Dao, Eve-lyne Mathieu, Magalie Torres, Santiago Algarra David et Manosalva Iris pour leurs contributions dans la partie expérimentales.

J'exprime ma profonde gratitude à tous les membres du TAGC que j'ai pu côtoyer durant ma thèse pour nos échanges au quotidien. En particulier je remercie « *Salva's team* » pour les bons moments que nous avons passés ensemble. Comme je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire BIOMOLIM.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de la présente thèse. Je ne vous remercierai pas tous nommément mais je suis certaine que vous vous reconnaîtrez. Je vous souhaite à tous beaucoup de bonheur.

Finalement, je voudrais remercier mes très chers parents, qui ont toujours été là pour moi, vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. C'est grâce à vous si j'en suis arrivée jusque-là, merci de m'avoir aussi bien entourée, encouragée, soutenue, et d'être autant fiers de moi. Je vous aime à ∞

Je remercie ma petite sœur Aicha et mes frères soulaimane & zakaria qui ont stressé plus souvent que moi pendant ces années. Je vous aime très très fort.

À la mémoire de mes grand-mères, MIMA & MAAZIZA, j'aurais tant aimé que vous soyez présentes. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.

Au reste de ma famille et à tous ceux qui comptent pour moi !

WIAM 😊

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	IV
Résumé en Arabe.....	V
Remerciements.....	VI
Table des matières.....	VIII
Liste des figures.....	XI
Liste des tableaux.....	XIV
Liste des abréviations	XV
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature.....	4
1.1. Système immunitaire et ses composantes.....	4
1.1.1. L'immunité innée.....	5
1.1.2. L'immunité adaptative.....	5
1.2. Les lymphocytes T.....	6
1.2.1. Développement des lymphocytes T $\alpha\beta$	7
1.2.2. Le signal du pré-TCR.....	10
1.2.3. Le récepteur des lymphocytes T (TCR).....	12
1.2.4. L'activation des cellules T.....	16
1.2.5. La régulation du développement lymphocytaire T.....	18
1.2.5.1. Le rôle de Notch.....	18
1.2.5.2. Le rôle des facteurs de transcription.....	19
1.2.5.2.1. Lef1 et Tcf-1.....	20
1.2.5.2.2. Runx1/Aml1 (Acute Myeloid Leukemia 1)	21
1.2.5.2.3. Bcl11b.....	21
1.2.5.2.4. Les protéines E et Id.....	22
1.2.5.2.5. Ikaros1.....	22
1.2.5.3. Survie et mort au cours de la différenciation du lymphocyte T.....	23
1.2.5.3.1. La famille de protéines Bcl-2	23
1.2.5.3.2. Les membres anti-apoptotiques de la familles Bcl-2.....	25
1.2.5.3.3. Le cancer et les membre anti-apoptotiques Bcl-2.....	27
1.3. Les ARN non codants et le concept du gène.....	28
1.3.1. Les petits ARN non codants.....	30

1.1.1.1.	Les MiARN.....	31
1.1.1.2.	Les siARN.....	33
1.1.1.3.	Les PiARN.....	33
1.1.2.	Les lncARN.....	34
1.1.2.1.	Description générale des lncARN.....	34
1.1.2.2.	Classification des lncARN.....	36
1.1.2.3.	Fonctions et mécanisme d'action des lncARN	38
1.1.2.3.1.	Signal.....	39
1.1.2.3.2.	Leurre.....	39
1.1.2.3.3.	Echafaudage.....	39
1.1.2.3.4.	Guide.....	40
1.1.2.4.	Les lncARN dans le système immunitaire.....	41
1.1.2.4.1.	Rôles des lncRNA dans le système immunitaire inné.....	41
1.1.2.4.1.1.	<i>LincRNA-Cox2</i>	42
1.1.2.4.1.2.	<i>Lethe / Rps15a-ps4</i>	42
1.1.2.4.1.3.	<i>NEAT1</i> (nuclear enriched abundant transcript 1).....	43
1.1.2.4.1.4.	<i>THRIL</i> (TNF α and hnRNPL related immunoregulatory LincRNA).....	43
1.1.2.4.1.5.	<i>Lnc-DC</i>	43
1.1.2.4.2.	Les lncARN dans les lymphocytes T.....	45
1.1.2.4.2.1.	<i>NRON</i> (non coding repressor of NFAT)	46
1.1.2.4.2.2.	<i>TMEVPG1/NeST</i> (nettoie Salmonella pas Theiler's)	46
1.1.2.4.2.3.	<i>LincR-Ccr2-5'AS</i>	47
1.1.2.4.2.4.	<i>Linc-MAF-4</i>	47
1.1.2.4.2.5.	<i>Th2LCRR</i>	47
1.1.2.4.2.6.	<i>GATA3-AS1</i>	48
1.1.2.4.2.7.	<i>LincRNA-p21</i>	48
1.1.2.4.2.8.	<i>GAS5</i> (growtharrestspecific 5)	48
1.2.	L'édition du génome par le système CRISPR-Cas9.....	50
1.2.1.	La découverte de CRISPR.....	50
1.2.2.	CRISPR-Cas9: principes généraux.....	52
1.2.3.	Crispr-Cas9: outil de modification des gènes.....	54
1.2.4.	Principe de la modification génique par le système CRISPR-Cas9.....	55
1.2.5.	Applications du CRISPR-Cas9.....	56

1.5. Problématique et objectifs.....	59
1.5.1. L'hypothèses.....	60
1.5.2. L'objectifs.....	60
Chapitre 2. Un régulateur critique de <i>Bcl2</i> révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T.....	61
2.1. Matériels et méthodes	62
2.1.1. Culture cellulaire et la stimulation par PMA/ionomycin.....	62
2.1.2. Tests de prolifération cellulaire et d'apôptose.....	62
2.1.3. L'extraction de l'ARN.....	62
2.1.4. La transcription inverse.....	62
2.1.5. L'ARN-seq.....	63
2.1.6. L'enrichissements fonctionnels.....	63
2.1.7. L'analyse GSEA.....	63
2.1.8. Analyses qualitatives de l'expression des gènes.....	64
2.1.9. Analyses quantitatives de l'expression des gènes.....	64
2.1.10. L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	65
2.1.11. ChIP-seq.....	65
2.1.12. L'édition génomique avec CRISPR-Cas9.....	66
2.2. Résultats	66
2.2.1. Effet du traitement par le PMA/ionomycin sur l'expression des gènes dans les cellules P5424.....	66
2.2.2. Annotation fonctionnelle des lncARN régulés par PMA/ionomycin.....	72
2.2.3. Validation des paires lncARN/ARNm corrélées.....	75
2.2.4. Le locus XLOC_000895 régule l'expression de <i>Bcl2</i> dans les cellules P5424.....	84
2.3. Discussion et conclusion.....	86
Chapitre 3. Conclusions et perspectives.....	91
Chapitre 4. Bibliographie.....	94
Annexe1.....	113
L'article.....	116

Liste des figures

Figure 1.1. Représentation schématique de la différenciation thymique des lymphocytes T $\alpha\beta$	9
Figure 1.2. Représentation schématique du complexe pré-TCR.....	10
Figure 1.3. Schéma représentant les principales voies de signalisation en aval du pré-TCR.....	12
Figure 1.4. Le complexe TCR-CD3.	13
Figure 1.5. Schéma simplifié de l'organisation des locus codants les chaînes α et β des récepteurs $\alpha\beta$	15
Figure 1.6. Voie d'activation de NOTCH1.	19
Figure 1.7. Structure des protéines de la famille Bcl-2.	24
Figure 1.8. Régulation de la survie par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 au cours du développement des thymocytes.	25
Figure 1.9. Le dogme central de la biologie moléculaire.	28
Figure 1.10. L'abondance relative des transcrits codants et non codants dans le transcriptome humain.	30
Figure 1.11. Les étapes clés de la biogenèse et l'activité des MiARN.....	32
Figure 1.12. Le nombre de publications, liées au lncARN au cours de la dernière décennie sur pubmed.	35
Figure 1.13. Schéma illustrant les différentes positions génomiques des lncARN (en bleu) par rapport aux gènes codants (en noir).	37
Figure 1.14. Représentation schématique des régulations transcriptionnelles en cis et trans.	38
Figure 1.15. Mécanismes d'action des lncARN.	40
Figure 1.16. Les lncARN dans le système immunitaire innée.	44

Figure 1.17. Rôles des lncARN dans le fonctionnement des cellules T.....	49
Figure 1.18. Le nombre de publications liées au CRISPR au cours des dernières années sur pubmed; mot-clé " CRISPR "	52
Figure 1.19. Les 3 étapes du système immunitaire adaptatif CRISPR-Cas.....	53
Figure 1.20. Le système CRISPR-Cas9 adapté à l'édition du génome.....	54
Figure 1.21. Schéma représentant les mécanismes de réparation de l'ADN impliqués dans l'édition du génome par le système CRISPR-Cas9.....	55
Figure 1.22. Utilisations de la technique CRISPR-Cas9.....	57
Figure 1.23. L'activation des cellules T via le PMA/ionomycin	59
Figure 2.1. Effet du traitement au PMA/ionomycin sur les cellules P5424.....	68
Figure 2.2. Effet du traitement par PMA/ionomycin sur l'expression des gènes dans la lignée P5424.	70
Figure 2.3. L'analyse d'enrichissement des jeux de gènes (GSEA).....	72
Figure 2.4. Corrélation entre la régulation des lncARN et l'ARNm dans les cellules P5424.....	74
Figure 2.5. Les paires lncARN/ARNm co-induits sélectionnées.....	76
Figure 2.6. Les paires lncARN/ARNm co-réprimés sélectionnées.....	77
Figure 2.7. L'analyse RT-qPCR de l'expression des paires lncARN/ARNm sélectionnées après la stimulation au PMA/ionomycin dans les cellules P5424.....	78
Figure 2.8. L'étude cinétique de la régulation des paires lncARN/ARNm sélectionnées par la stimulation au PMA/ionomycin.....	79
Figure 2.9. L'expression des gènes XLOC_000895 et <i>Bcl2</i> au cours de la différenciation des lymphocytes T.....	81

Figure 2.10. L'expression des gènes XLOC_000895 et <i>Bcl2</i> dans les thymocytes leucémiques et normaux.....	83
Figure 2.11. Le locus XLOC_000895/ <i>Robnr</i> régule l'expression de <i>Bcl2</i> dans les cellules P5424.....	85

Liste des tableaux

Table 1.1. Nombre de segments fonctionnels variable des chaînes α et β du TCR.....	15
Tableau 1.2. Bases de données publique disponibles en ligne de lncARN.....	35
Tableau 1.3. Rôles des lncRNA dans le système immunitaire inné.....	41
Tableau 1.4. La liste des lncARN impliqués dans le fonctionnement des cellules T.....	45
Tableau 2.1. Liste des pairs lncRNA/gènes codants voisin co-régulés.....	75

Liste des abréviations

A

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADNc: ADN complémentaire

AP-1: activator protein-1

ARN: Acide RiboNucléique

ARNnc: ARN non codants

B

BCR: B cell receptor

Bcl2: B-cell lymphoma 2

C

Ca 2+ : calcium

CPA: Cellule présentatrice d'antigène

ChIP: ImmunoPrécipitation de la Chromatine

CSH: Cellules souches hématopoïétiques

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CMH I: CMH de classe I

CMH II: CMH de classe II

CLP: Progéniteur lymphoïde commun

CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats

D

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DN: Double -Négatif

DP: Double-positif

DC: Cellule dendritique

G

Gads: GRB2-related adapter downstream of Shc

H

H3K27Ac: Acétylation de la lysine (K) 27 de l'histone H3

H3K4Me3: Tri-Méthylation de la lysine (K) 4 de l'histone H3

I

Ig: Immunoglobuline

Iono: Ionomycin

IFN: Interféron

IL: Interleukin

ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

IP3: inositol-1,4,5-triphosphate

k

Kb: Kilobase

L

LAT: Linker for Activation of T-cells

LncARN: ARN longs non codants

LincARN: lncARN intergéniques

LB: Lymphocyte B

LT: Lymphocyte T

LTCD4+: Lymphocyte T CD4+

LTCD8+: Lymphocyte T CD8+

Lck: lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

M

MiARN: microARN

N

NK: Natural Killer

NFAT: Nuclear Factor of Activated T-Cells

NF- κ B: Nuclear Factor- Kappa B

P

PCR: Réaction en chaîne par polymérase

PKC: Protéine kinase C

PLC- γ 1: Phospholipase C- γ 1

PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

Pb: Paire de bases

PRR: Patterns recognition receptors

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

Q

qPCR: PCR quantitative en temps réel

R

RPL32: Ribosomal protein L32

RAG: Recombination Activating Gene

Ras-GRP: Ras guanyl nucleotide- releasing protein

S

SH2: Src homology 2

SiARN: Short interfering ARN

SLP-76: SH2- leucocytar phosphoprotein

SOS: son of sevenless

Syk: Spleen tyrosine kinase

T

TCR: T cell receptor

Treg: T régulateur

V

V: Segment génique de variabilité

Z

ZAP-70: Zeta-associated-protein

Introduction

Introduction

Afin de maintenir l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et la production régulière d'une grande diversité et d'un répertoire riche de cellules immunitaires matures, des interactions complexes de facteurs de croissance, des cytokines, des molécules de signalisation et de facteurs de transcription contrôlent l'équilibre entre l'auto-renouvellement, la prolifération, la quiescence et la différenciation cellulaires, ainsi que les changements rapides dans l'expression génique qui accompagnent les transitions développementales. Aussi, des dérégulations de cet équilibre critique peuvent entraîner des pathologies telle que des myélodysplasies, des myéloproliférations ou des leucémies (Bhatia, 2013; Leone et al., 2007). Pour caractériser une telle anomalie de régulation la plupart des études se sont exclusivement axés sur les régions codantes du génome. Cependant, la découverte des micro-ARN et les descriptions récentes des lncARN ont donné un élan énorme à un tout nouveau domaine de la biologie moléculaire et cellulaires : les ARN non codants régulateurs.

Les ARNnc sont largement exprimés dans les cellules immunitaires. Cependant, leur importance fonctionnelle en rapport avec le système immunitaire commence tout juste à être caractérisée (Atianand and Fitzgerald, 2014; Casero et al., 2015).

Récemment, de nombreuses études ont montré le rôle des lncARN dans le développement, la différenciation et l'activation des lymphocytes T dans les réponses immunitaires adaptatives (Casero et al., 2015; Isoda et al., 2017; Pagani et al., 2013; Xia et al., 2014; Zhu and Xu, 2013). Pang et *al.* ont fourni une première vue des profils d'expression des lncARN dans les lymphocytes TCD8⁺ de mammifères et découvert des centaines de lncARN qui sont exprimés et changés dynamiquement d'une manière spécifique au cours de la différenciation ou l'activation des lymphocytes (Pang et al., 2009). Certains travaux ont permis de mettre en évidence des profils d'expression hautement spécifiques et dynamiques des lncARN intergéniques (lincARN) au cours de la différenciation des lymphocytes T (Hu et al., 2013). Plus récemment, Ransani et *al.* ont pu identifier la signature de plus de 500 nouveaux lincARN dans les lymphocytes humains (Ranzani et al., 2015). L'accumulation de l'ensemble des données à l'échelle du génome a suggéré que les lncARN apparaissent comme un groupe de molécules importantes impliquées dans la régulation dynamique du système immunitaire et dans le contrôle de l'immunité.

Introduction

L'objectif de ce travail de doctorat était d'essayer de mieux comprendre et de caractériser les lncARN impliqués dans la différenciation et l'activation des cellules T.

CHAPITRE 1

Revue de la littérature

1.1.	Système immunitaire et ses composantes.....	4
1.2.	Les lymphocytes T.....	6
1.3.	Les ARN non codants et le concept du gène	28
1.4.	L'édition du génome par le système CRISPR-Cas9.....	50
1.5.	Problématique et objectifs.....	59

CHAPITRE 1

Revue de la littérature

1.1. Système immunitaire et ses composantes

Depuis les organismes unicellulaires jusqu'à l'homme, tous les organismes vivants établissent un réseau complexe de relations dont beaucoup d'entre eux sont potentiellement délétères. C'est pourquoi il est important d'avoir des moyens pour se protéger, se défendre et pouvoir identifier et neutraliser les différentes menaces.

Le terme immunité provient du latin *immunis* : « protégé de » ou « exempt de », qui désigne l'ensemble des mécanismes biologiques mise en œuvre par un organisme et qui permettent d'identifier et tolérer ce qui lui appartient (le soi) et de rejeter ce qui lui est étranger (le non soi). Le concept de système immunitaire est employé aussi bien pour désigner un réseau complexe constitué de nombreux types cellulaires, tissulaires et moléculaires, en interaction entre eux et avec l'environnement, en vue d'assurer une ou plusieurs fonctions. Le système immunitaire est sous la pression constante des agents pathogènes, il a pour rôle de défendre et de permettre à un organisme d'assurer son intégrité en éliminant les substances étrangères et ses propres constituants altérés et/ou monter une réponse suffisamment forte contre les agents infectieux auxquels il est exposé. Il participe également à la réparation des tissus après les dommages induits soit par l'invasion des pathogènes soit par la réponse de l'organisme contre ces pathogènes. En faisant ce travail vital, l'intégrité de l'organisme considéré est conservé.

En général, plus un organisme est complexe, plus son système immunitaire l'est (Rimer et al., 2014). Le système immunitaire humain est aussi complexe que notre système nerveux, il peut répondre aux maladies spécifiques et se rappeler de ces réponses des années plus tard (Kioussis and Pachnis, 2009). Il est composé de différentes types cellulaires qui maintiennent et protègent la fonction et l'homéostasie des tissus en cas de changements dans les exigences fonctionnelle. Ces cellules résident dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires, dans les tissus de tout le corps et transitent à travers le sang périphérique et les systèmes lymphatiques. En outre, en raison de la nature distribuée du

Chapitre 1. Revue de la littérature

système immunitaire, les mêmes types de cellules sont présents dans tout le corps, mais ils sont modifiés par des adaptations qui reflètent la niche et la demande fonctionnelle unique de leur tissu de résidence.

Pour assurer sa protection globale, le corps humain possède 2 types de mécanismes de défense qui fonctionnent en complémentarité, il s'agit : du système immunitaire innée et adaptatif.

1.1.1. L'immunité innée

Le système immunitaire inné constitue notre première ligne de défense contre les maladies infectieuses et les pathogènes envahissants (Aderem and Ulevitch, 2000), sa mise en place est précoce et non spécifique de l'antigène et ne développera pas de mémoire à l'égard des agents pathogènes, Par conséquent, ce type d'immunité est incapable de produire une réponse plus forte à l'encontre d'un pathogène déjà rencontré. Il est composé de barrières physiques (peau-muqueuse), de barrières physiologiques (température, pH bas et des médiateurs chimiques), d'un tableau diversifié de cellules hématopoïétiques, y compris les cellules dendritiques (DC), les monocytes, les macrophages, les granulocytes, et les cellules lymphoïdes innées (Jay, 2001). Ces populations cellulaires collaborent entre elles, avec le système immunitaire adaptatif et avec des cellules non hématopoïétiques pour favoriser l'immunité, l'inflammation et la réparation tissulaire.

1.1.2. L'immunité adaptative

Le système immunitaire adaptatif implique des composants généralement silencieux qui s'activent en réponse à des agents infectieux. Ce processus suit la réponse innée et peut prendre des jours ou des semaines, il est important de noter que l'immunité adaptative permet le développement d'une mémoire immunologique qui est cruciale à la fois pour prévenir une infection récurrente par la même souche de pathogène et pour les effets prophylactiques de la vaccination. Les réponses humorales et à médiation cellulaire sont les deux types de réponses du système immunitaire adaptatif, ils assurent leurs fonctions en maintenant une population de cellules spécialisées, les lymphocytes B et T respectivement.

Chapitre 1. Revue de la littérature

La différenciation et le développement des lymphocytes B (LB) débute dans la moelle osseuse puis se poursuit dans les organes lymphoïdes secondaires. Ils sont la source des cellules productrices d'anticorps (les plasmocytes) ; ils possèdent à leur surface des récepteurs antigéniques (BCR), qui leur permettent de fixer l'antigène provoquant ainsi la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps sous la stimulation des lymphocytes T helper. Les anticorps spécifiques à l'antigène générés vont se fixer sur les antigènes, les neutraliser et favoriser leur capture par les cellules phagocytaires. Les cytokines produites vont aussi participer à l'activation du complément et au recrutement des cellules de l'immunité innée qui vont participer à la phagocytose de l'antigène, ainsi qu'à l'activation des lymphocytes T qui remplissent plusieurs fonctions, notamment tuer les cellules infectées et activer ou recruter d'autres cellules immunitaires (Jacquot and Boyer, 2006).

1.2. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) ou cellules T, sont des acteurs majeurs du système immunitaire adaptatif. Ils sont divisés en deux grandes catégories : les lymphocytes T CD4⁺ (LTCD4⁺) également nommé auxiliaires ou T helper exprimant le corécepteur CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺ (LTCD8⁺) ou cytotoxiques exprimant le corécepteur CD8⁺. La réponse immunitaire T est initiée par la présentation d'un antigène aux LT, cette présentation se fait par l'intermédiaire de cellules présentatrices d'antigène (CPA). Il peut s'agir de monocytes, des macrophages, des DC ou des LB. Ces cellules vont donc internaliser les antigènes, les dégrader puis présenter ses fragments sur des molécules CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) au LT. Les LTCD4⁺ reconnaissent le complexe peptide/CMH de classe II et les LTCD8⁺ reconnaissent un peptide présenté par les molécules CMH de classe I.

À ce jour il existe quatre sous populations de LTCD4⁺ effecteurs répertoriées et caractérisées par des profils distincts de production de cytokines, qui sont les lymphocytes T helper (Th): Th1, Th2, Th17 et les lymphocytes T régulateurs (Treg)(Zhu and Paul, 2008). Les cellules Th1 sont essentiels pour coordonner les réponses immunitaires à médiation cellulaire contre les microbes intracellulaires, en particulier les bactéries. Ils produisent et sécrètent des molécules qui alertent et activent d'autres cellules immunitaires comme l'interleukine 2 (IL -2) et l'interféron γ (IFN γ). Les cellules Th2 sont importantes pour coordonner les réponses immunitaires à médiation humorale

Chapitre 1. Revue de la littérature

contre les pathogènes extracellulaires, comme les helminthes (vers parasites), en alertant les cellules B et les granulocytes. Ils produisent l'IL-4, IL-5 et IL-13. Les cellules Th17 sont ainsi nommées pour leurs capacités à produire l'interleukine 17 (IL-17), une cytokine pro-inflammatoire qui active les cellules immunitaires et non immunitaires. Par le biais de l'IL-17, les Th17 favorisent le recrutement des neutrophiles pour l'élimination des bactéries et des moisissures (Saito et al., 2010). Les lymphocytes Treg comme leur nom l'indique, surveillent, inhibent, et modulent l'activité d'une grande diversité de cellules dans le système immunitaire inné et adaptatif. Ils empêchent l'activation immunitaire défavorable et ils sont impliqués dans le maintien de la tolérance périphérique et la prévention des maladies auto-immunes, et de même jouent également un rôle central dans le phénomène d'allergie, les infections chroniques, la croissance tumorale et la transplantation d'organe (Siri et al., 2012).

Les LTCD8⁺ sont essentiels pour reconnaître et éliminer les cellules infectées ou du soi modifié. Lorsqu'un LTCD8⁺ reconnaît son antigène et devient activé, il dispose de trois mécanismes majeurs pour tuer les cellules infectées ou malignes. Le premier est assuré par la sécrétion de cytokines, principalement le TNF- α et l'IFN- γ , qui ont des effets anti-tumoraux et anti-viraux microbiens. Le deuxième est assuré par la production et la libération de granules cytotoxiques. Ces granules, contiennent deux familles de protéines, la perforine et les granzymes, qui vont agir de manière coordonnée pour déclencher le programme de mort apoptotique de la cible. La perforine comme son nom l'indique forme des pores dans la membrane de la cellule cible, permettant aux granzymes, qui sont des sérine-protéases, d'entrer à l'intérieur de la cellule et clivent des molécules régulatrices de l'apoptose une fois dans le cytoplasme, aboutissant finalement à la mort cellulaire (Curtsinger et al., 2005; Curtsinger et al., 2003). Le dernier mécanisme est basé sur les interactions Fas/FasL pour la destruction des cellules infectées. Les LTCD8⁺ expriment FasL à leur surface, qui se lie à son récepteur, Fas, sur la surface de la cellule cible. Cette liaison provoque l'apoptose de la cellule cible (John and Timothy, 2002).

1.2.1. Développement des lymphocytes T $\alpha\beta$

Contrairement à toutes les cellules hématopoïétiques, les cellules T se développent à distance de la moelle osseuse. C'est dans le thymus, un organe lymphoïde primaire spécialisé que leur développement s'achève à travers de multiples cycles de prolifération et de différenciation, menant à un engagement de la lignée T, à des

Chapitre 1. Revue de la littérature

réarrangements du récepteur des cellules T (TCR) et à la génération de cellules T exprimant le TCR $\alpha\beta$, et qui fonctionnent comme des cellules tueuses, régulatrices, ou productrices de cytokines spécifiques (Cavazzana-Calvo et al., 2006).

À partir du moment où les progéniteurs thymiques précoces (ETP ; early thymic progenitor) provenant de la moelle osseuse migrent et colonisent le thymus à la jonction cortico-médullaire jusqu'à la première expression d'un TCR $\alpha\beta$, ils franchissent plusieurs stades phénotypiquement distincts, définis par l'expression de CD4, CD8 ainsi que d'autres marqueurs (Figure 1.1). Les précurseurs intra-thymiques les plus précoces représentent environ 2-5% du nombre total des thymocytes, ils n'expriment pas les marqueurs CD4 et CD8, et sont donc nommés doubles négatifs (DN) (Lind et al., 2001). Classiquement, le processus de différenciation des thymocytes au sein de la population DN est divisé en quatre étapes chez la souris, en fonction de l'expression des marqueurs CD44 et CD25 (Bhandoola and Sambandam, 2006). Les cellules DN1 (CD44+ CD25-), représentent une population hétérogène, divisée en cinq sous-ensembles, DN1a à DN1e, en fonction de l'expression de CD24 et de c-kit (CD117), et peuvent donner naissance à des cellules T $\alpha\beta$, T $\gamma\delta$, Natural Killer (NK), DC, des macrophages et des cellules B (Ciofani and Zúñiga-Pflücker, 2007). Suite à la reconnaissance des récepteurs Notch1 aux ligands thymiques Delta-1, les cellules DN1 se différencient en DN2 (CD44+ CD25+). Une fois que ces derniers s'engagent dans la lignée T, elles migrent à travers le cortex et commencent les réarrangements des segments du gène TCR β , TCR γ et TCR δ du TCR, médiés par les enzymes de recombinaisons RAG-1 et RAG-2 (RAG ; recombination activating gene). L'engagement total dans la lignée T se produit après la transition du stade DN2 au stade DN3 (CD44- CD25+). À ce stade, les cellules réarrangent et expriment la chaîne β du TCR qui s'associe aux molécules de signalisation CD3 ainsi qu'à la chaîne pré-T α (pT α) (Voir paragraphe 1.2.2.), pour former le complexe pré-TCR à la surface (Figure 1.2). L'initiation de la transduction du signal par ce complexe permet de diminuer l'activité des enzymes RAG conduisant à l'exclusion allélique du second locus β et empêche la formation d'autres chaînes β . Ce complexe fournit également un signal de survie et de prolifération aux thymocytes, et conduit à une régulation négative de CD25, produisant ainsi une population DN4 (CD44- CD25-). Ce processus est appelé sélection- β . Ces cellules vont ensuite exprimer les corécepteurs CD4 et CD8 pour se différencier en cellules DP (doubles positifs) qui représentent environ 80% du nombre total de thymocytes (Ciofani and Zuniga-Pflucker, 2010; Ciofani and Zúñiga-Pflücker, 2007; MacDonald et al., 1988). À ce

Chapitre 1. Revue de la littérature

stade, vont commencer les réarrangements du locus de la chaîne TCR α . Si ce réarrangement est fonctionnel, les cellules se mettent à exprimer un TCR $\alpha\beta$ de surface, et les processus de sélection peuvent s'engager (Starr et al., 2003). Les cellules qui ont un réarrangement non productif du locus du TCR α meurent par apoptose.

Les thymocytes vont par la suite subir une double sélection positive et négative dans le but de sélectionner les thymocytes DP pouvant reconnaître les CMH/peptides endogènes avec une affinité appropriée. La sélection positive s'effectue à la jonction cortico-médullaire pour sélectionner les thymocytes qui présentent un TCR $\alpha\beta$ de surface capable, en périphérie, de reconnaître un antigène dans le contexte de molécules CMH-I ou CMH-II. Les thymocytes DP finissent par mourir en absence de signaux de survie transmis lors d'une interaction de bonne affinité (Germain, 2002; Starr et al., 2003). Les thymocytes sélectionnés vont subir une sélection négative en interagissant avec les cellules dendritiques et les macrophages de la jonction cortico-médullaire. Les thymocytes DP exprimant un TCR ayant une affinité trop élevée pour les antigènes du soi (autoréactifs) vont être éliminés, tandis que les autres vont générer les lymphocytes T naïfs SP (simples positifs) CD4+ ou CD8+ qui quittent le thymus par les vaisseaux de la jonction cortico-médullaire et circulent à la périphérie (Singer et al., 2008).

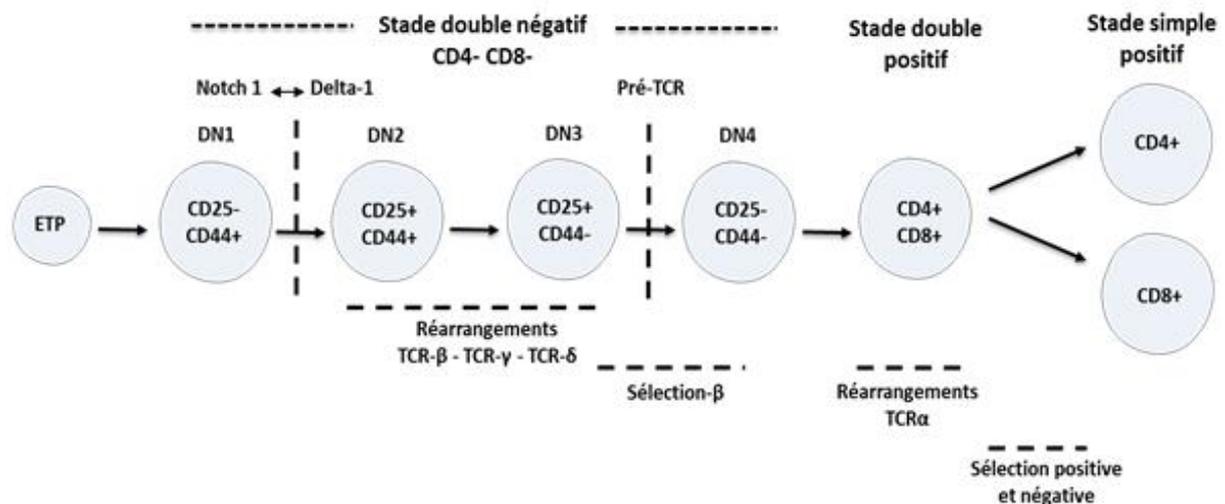


Figure 1.1. Représentation schématique de la différenciation thymique des lymphocytes T $\alpha\beta$. Les progéniteurs thymiques précoces migrent dans le thymus et commencent leurs différenciations. Suite à la reconnaissance des récepteurs Notch1 aux ligands thymiques Delta-1, les cellules s'engagent vers le lignage lymphocytaire T et poursuivent leurs différenciations en quatre stades majeurs (stade DN1-4 ; CD4-CD8-), pendant lesquels la chaîne β se réarrange. Seules les cellules dont le réarrangement β est productif sont

Chapitre 1. Revue de la littérature

sélectionnées et passent au stade DP (CD4+CD8+), au cours de cette étape les cellules procèdent au réarrangement de leur chaîne α pour exprimer le TCR $\alpha\beta$. In fine, les processus de sélection positive et négative permettent d'éliminer les lymphocytes qui ne reconnaissent pas le CMH du soi et les lymphocytes autoréactifs respectivement pour passer au stade SP (CD4+CD8- ou CD4-CD8+). Inspirée de (Eric Sebzda et al., 1999; Fayard et al., 2010).

1.2.2. Le signal du pré-TCR

Le premier point de contrôle majeur dans le développement thymique précoce est la sélection- β , où la signalisation par le biais du pré-TCR joue un rôle déterminant dans la destinée des thymocytes en permettant leur survie, prolifération et maturation. Le pré-TCR est un hétérodimère constitué d'une chaîne β fonctionnelle et d'un substitut invariant de la chaîne α appelé pT α (reliées entre eux par un pont disulfure), et des sous unités ϵ , γ et δ du CD3 (Figure 1.2). La pT α est une glycoprotéine membranaire de 33 kDa dont le gène est localisée sur le chromosome 17 chez la souris (sur le bras court du chromosome 6 chez l'homme). La partie extracellulaire est constituée d'un domaine globulaire de type Ig et d'un peptide de connexion contenant une cystéine qui permet son association à la chaîne TCR β . La région transmembranaire est constituée d'acides aminés hydrophobes et la région cytosolique est longue et riche en proline (P). Elle constitue un site de transduction de signaux qui, en synergie avec CD3, recrute les intermédiaires des voies de signalisation (Hayes et al., 2003).

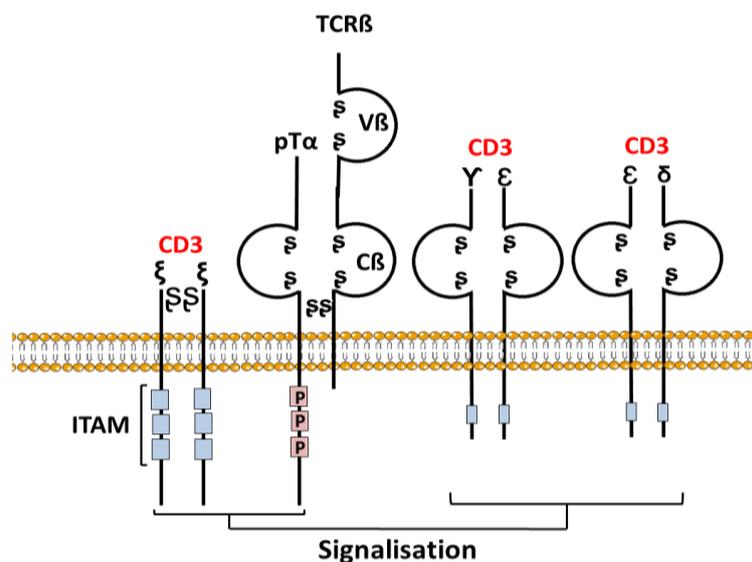


Figure 1.2. Représentation schématique du complexe pré-TCR. Le complexe pré-TCR est constitué d'une chaîne β et d'un substitut invariant de la chaîne α appelé pT α , reliées entre eux par un pont disulfure.

Chapitre 1. Revue de la littérature

Les molécules de signalisation associées sont assemblées en dimères CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$, et CD3 $\xi\xi$. Inspirée de (Smelty et al., 2011).

Deux modèles ont été proposés pour expliquer le déclenchement de la signalisation via le pré-TCR. Selon le premier modèle, ce processus se produit par un mécanisme indépendant du ligand, qui est fortement soutenu par des expériences montrant clairement que les CMH de classe I ou II ne sont pas nécessaires pour que les thymocytes passent du stade DN au stade DP (Irving et al., 1998; Koller et al., 1990). Ainsi, la délétion de l'ensemble des régions extracellulaires du pré-TCR n'empêche pas la progression des cellules vers un stade tardif du développement des LT. Cependant, un deuxième modèle, plus récent, propose que le pré-TCR reconnaisse des peptides liés à des molécules majeures d'histocompatibilité (pMHC) présentés sur les cellules épithéliales thymiques, ce qui déclenche le flux de calcium et module le développement des cellules DP (Mallis et al., 2015).

Les signaux pré-TCR sont transduits par les motifs d'activation tyrosine-dépendantes de l'immunorécepteurs (ITAMs) situés dans les domaines cytoplasmiques des chaînes CD3 (Figure 1.2), qui deviennent phosphorylés par différentes tyrosine-kinases de la famille Src : LcK (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) et Fyn. ZAP-70 (70 kDa zeta-associated protein) et Syk (les seuls membres de la famille Syk kinase) sont ensuite recrutés au niveau de la queue CD3 du complexe pré-TCR et activent les protéines adaptatrices comme l'adaptateur transmembranaire LAT (activateur de liaison pour les lymphocytes T) (Lawrence, 2002), et l'adaptateur cytoplasmique SLP-76 (SH2 domain containing Leucocytes Phosphoprotein) et Vav qui initient trois voies de signalisation via l'activation de PI3Kinase (PI3K), PLC γ et Ras (Figure 1.3). L'activation de la voie PI3K est impliquée dans l'inhibition de l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose ; l'activation de la voie Ras est impliquée dans l'induction des facteurs de transcriptions ETS1 et Id3, impliquée dans le contrôle de la prolifération, la différenciation et l'exclusion allélique ; et la voie PLC γ est impliquée dans l'activation de la PKC (protéine kinase C) et l'augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire conduisant à l'activation des facteurs de transcription NFATc et NF- κ B qui favorise la survie, la prolifération et la différenciation des thymocytes.

Chapitre 1. Revue de la littérature

Par ailleurs, la signalisation par le pré-TCR inhibe également le facteur de transcription p53, qui active l'expression des gènes bloquant le cycle cellulaire et induit l'apoptose des cellules n'ayant pas réussi un réarrangement productif de la chaîne β (Figure 1.3).

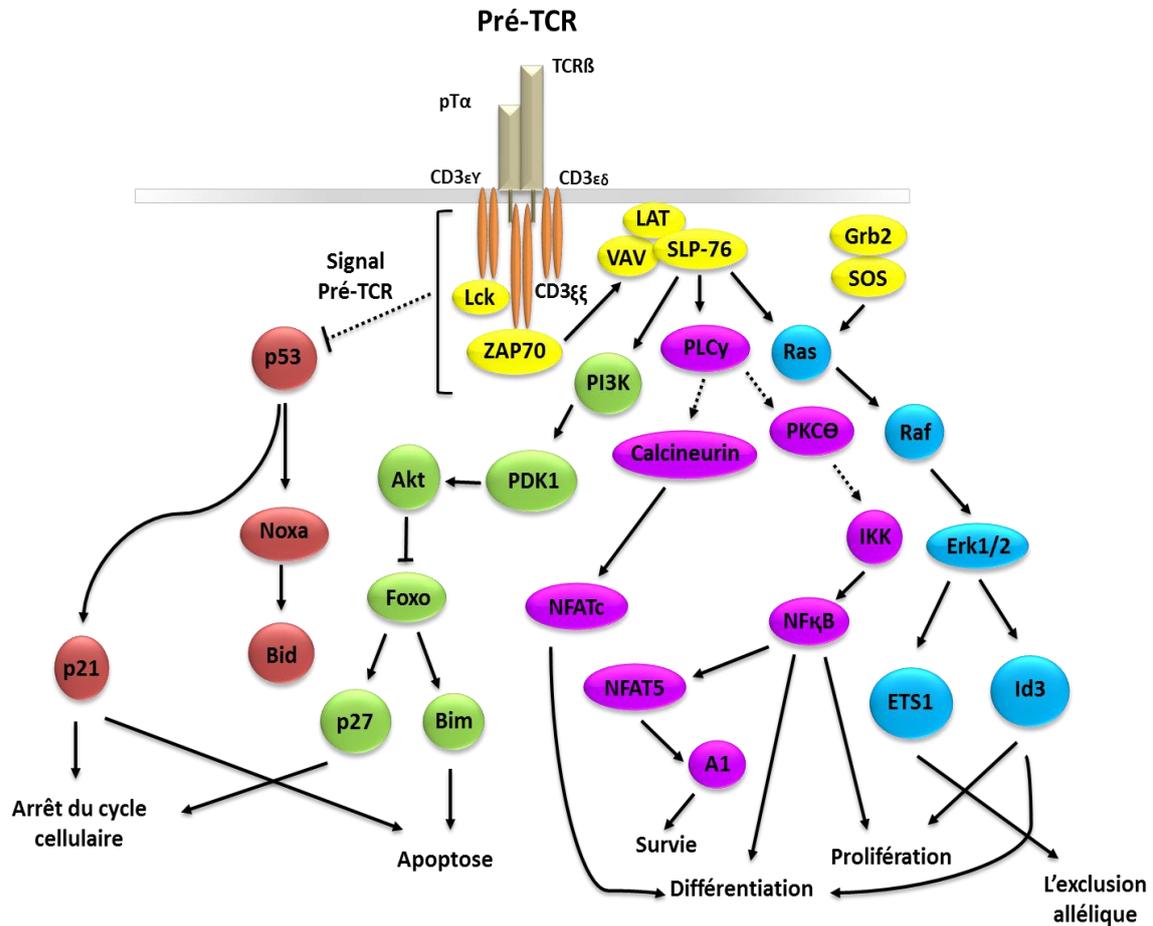


Figure 1.3. Schéma représentant les principales voies de signalisation en aval du pré-TCR. La signalisation proximale implique l'activation de Lck et Fyn, ZAP-70, LAT, Vav et SLP-76, qui initient les voies de signalisation distales. La voie PI3K, représentée en vert, inhibe l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. La voie PLC γ , représentée en violet, favorise la prolifération, différenciation et survie. La voie Ras/Raf, en bleue, favorise la prolifération et la différenciation des cellules DN3. La signalisation par le pré-TCR prévient également l'induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle par l'inhibition de la p53. D'après (Lopez-Rodriguez et al., 2015).

1.2.3. Le récepteur des lymphocytes T (TCR)

Pour reconnaître les pathogènes, le système immunitaire s'appuie sur des protéines réceptrices exprimées à la surface de ses cellules. Ces protéines sont capables de

Chapitre 1. Revue de la littérature

reconnaître les peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH de classe I ou II et initie la réponse immunitaire. Les lymphocytes T reconnaissent des antigènes non soi liés à des molécules du CMH du soi, via un récepteur spécifique, le récepteur des cellules T (TCR ; pour T Cell Receptor).

Il existe deux types différents de ce récepteur définissant deux types de lymphocytes T. Comme ce récepteur est un hétérodimère formé de deux chaînes protéiques, une chaîne α et une chaîne β ou bien d'une chaîne γ et une chaîne δ (Hayday and Pennington, 2007; Spicuglia et al., 2007). Les deux types de TCR sont désignés : TCR $\alpha\beta$, exprimé sur la majorité des cellules T périphériques (95% des cas) (Figure 1.4), et le TCR $\gamma\delta$, exprimé par un type de lymphocytes T minoritaires dans le sang circulant (de 1 à 10% des lymphocytes T totaux) (Rudolph et al., 2006). Chaque chaîne est formée d'une partie variable responsable de la spécificité antigénique et liant les complexes CMH/peptides et d'une partie constante qui permet l'ancrage membranaire. Ces deux chaînes sont liées de façon covalente par un pont disulfure et associées de façon non covalente à un complexe de polypeptides invariants appelé CD3 (Malissen et al., 1984). Le complexe CD3 n'est pas directement impliqué dans la reconnaissance de l'antigène, mais possède des motifs ITAM dans sa partie intracellulaire, permettant la transduction du signal (Figure 1.4).

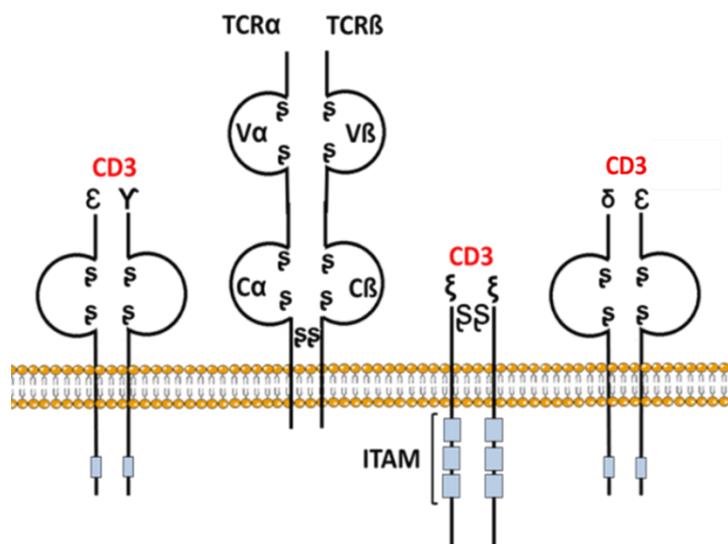


Figure 1.4. Le complexe TCR $\alpha\beta$ -CD3. Le complexe TCR $\alpha\beta$ est constitué d'une chaîne β et α , reliées entre elles par un pont disulfure. Les molécules de signalisation associées sont assemblées en dimères CD3 $\epsilon\gamma$, CD3 $\epsilon\delta$, et CD3 $\xi\xi$. D'après (Malissen and Malissen, 1996).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Comme les immunoglobulines, les TCR doivent reconnaître un grand nombre d'antigènes. Le répertoire T est extrêmement étendu et les complexes TCR sont capables de reconnaître une très grande diversité de structures étrangères. Les gènes TCR sont situés sur différents chromosomes, 14 pour le locus α , et 7 pour le locus β chez l'homme, 14 pour le locus α et 6 pour le locus β chez la souris. Ils sont générés par le réarrangement des segments génétiques V (segments variable), D (segments de diversité, pour les locus des chaînes β uniquement), J (segments de jonction) et C (segments constant). L'ADN codant la région variable de la chaîne α est généré à partir de la recombinaison VJ ; l'ADN codant la région variable de la chaîne β est impliqué dans la recombinaison VDJ, le processus d'assemblage des gènes des récepteurs des lymphocytes est appelé recombinaison V(D)J. En général, les gènes V sont situés en amont des gènes J (et D) qui précèdent les gènes C (Figure 1.5). Les différents types de segment géniques sont présent en plusieurs exemplaires comme résumé dans le Tableau 1.1 (Chatenoud, 2012). Ainsi, la variabilité combinatoire qui en découle s'accompagne fréquemment de délétions et/ou additions de nucléotides au niveau des extrémités codantes libres des segments V, D et J produisant par conséquent des répertoires T très variés. la diversité potentielle des TCR $\alpha\beta$ est estimée à 10^{15} chez la souris (Davis and Bjorkman, 1988) et 10^{18} chez l'homme (Murphy et al., 2012). Ces événements de recombinaison V, D et J sont réalisés grâce à de courtes séquences cibles, appelées séquences signal de recombinaison (SSR), situées en 3' des segments V, en 5' et 3' des segments D, et en 5' des segments J. Les SSR sont composées de deux séquences très conservées, un heptamère et un nonamère, séparés par un espaceur de 12 ou 23 nucléotides. Les réarrangements V(D)J sont provoqués par l'activité des protéines RAG-1 et RAG-2, qui sont capables de reconnaître les SSR et d'engendrer des coupures d'ADN double brin entre les SSR et les segments de gène V, D et J (Bassing et al., 2000).

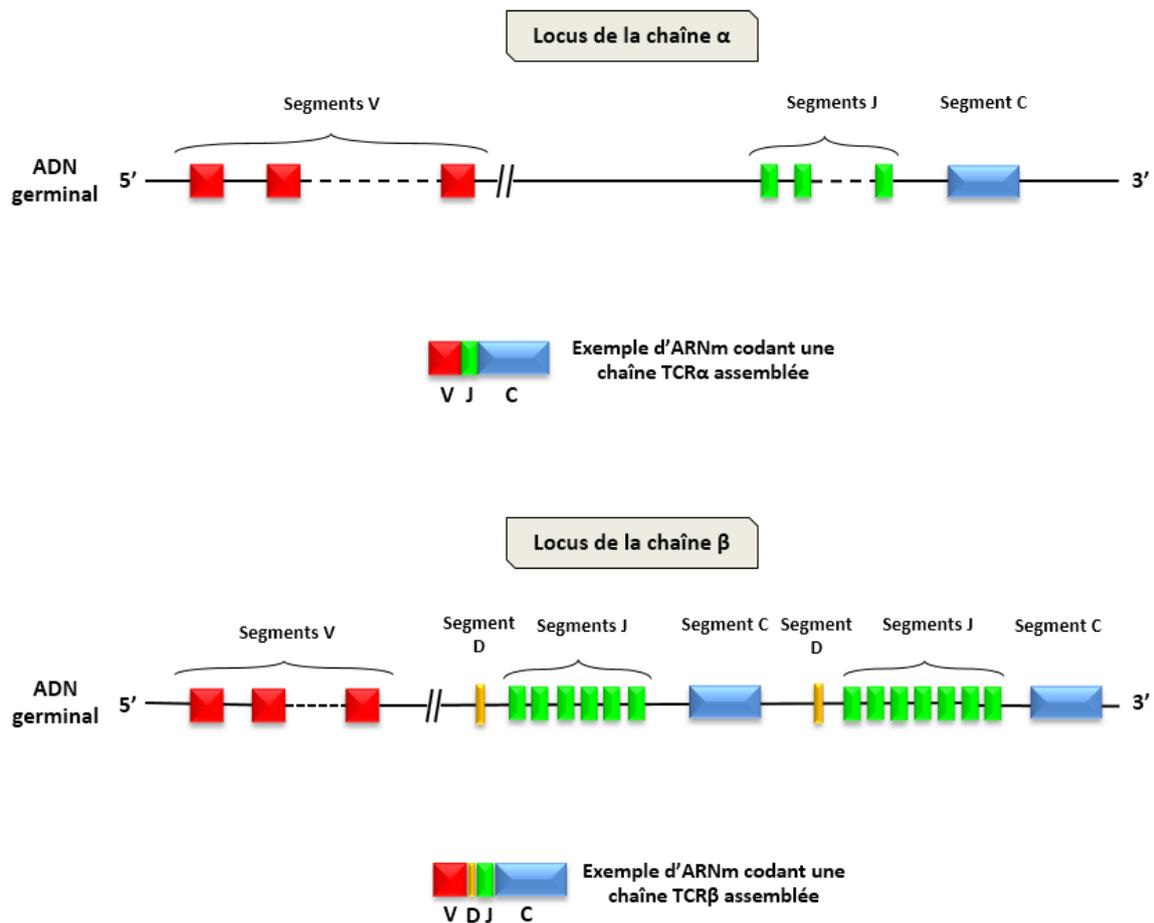


Figure 1.5. Schéma simplifié de l'organisation des locus codants les chaînes α et β des récepteurs $\alpha\beta$. Les gènes des chaînes α et β du TCR sont composés de segments joints par recombinaison somatique durant le développement des cellules T. D'après (Chatenoud, 2012).

Tableau 1.1. Nombre de segments fonctionnels variable des chaînes α et β du TCR (Chatenoud, 2012).

Récepteur des cellules T $\alpha\beta$		
Nombre de segments		
	Chaîne α	Chaîne β
V	50	50
D	0	2
J	50	13

1.2.4. L'activation des cellules T

Les cellules T naïves quittent le thymus et recirculent entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires jusqu'à ce qu'elles reconnaissent, via le TCR, un peptide antigénique spécifique présenté, en association avec les molécules du CMH, à la surface de CPA. Cette reconnaissance induit l'activation du TCR et déclenche un certain nombre de cascades de signalisation qui déterminent le destin de la cellule en régulant la production de cytokines, la survie cellulaire, la prolifération et la différenciation.

La présence d'un ligand induit des changements conformationnels dans les chaînes CD3 associées, ce qui facilite la phosphorylation des résidus tyrosine des ITAMs par Lck et Fyn (Letourneur and Klausner, 1992). Les CD3/ITAM phosphorylés recrutent ZAP-70 via ses deux domaines SH2 (Src homology domain 2). La kinase Zap-70 est capable de s'autophosphoryler augmentant ainsi son activité catalytique, ou d'induire la phosphorylation de LAT (Lawrence, 2002) et SLP-76 (Juliane et al., 1996; Zhang et al., 1998). Ensemble LAT et Slp-76 forment un complexe de signalisation proximal qui agit comme une plate-forme pour le recrutement et l'initiation des voies de signalisation contrôlant l'activation de la transcription en réponse à l'interaction TCR/CMH/peptide (Hivroz, 2005; Macián et al., 2001). Les LAT phosphorylés recrutent des protéines portant le domaine SH2, y compris PLC γ 1, la sous-unité régulatrice p85 de PI3K, et les protéines adaptatrices Grb2 et Gads. SLP-76 rejoint le complexe en se liant à Gads et PLC γ 1 via une région riche en proline. Grb2 est dépourvue de toute activité enzymatique intrinsèque mais recrute, par le biais de son domaine SH3, Sos, qui est un facteur d'échange GTP (GEF) à la fois pour les GTPases Ras et Rho. Le complexe Grb-Sos se lie à des tyrosines phosphorylées sur LAT, conduisant à l'activation de Ras. Ce dernier promeut à son tour un signal intracellulaire transitant par les MAP Kinase conduisant à l'activation de multiples gènes (Schlessinger, 1993).

La PLC γ 1 activée hydrolyse le PIP2 (Phosphatidyl Inositol biPhosphate) lié à la membrane en deux seconds messagers essentiels : l'IP3 (Inositol Triphosphate) et DAG (diacylglycérol), qui initient une variété de voies de signalisation distales. IP3 augmente les niveaux de Ca²⁺ intracellulaires dans le cytoplasme en stimulant l'efflux de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique pour activer les protéines phosphatases calcineurines et les protéines kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendantes (caMK). La calcineurine activée déphosphoryle NFAT (facteur nucléaire des cellules T activées), entraînant sa

Chapitre 1. Revue de la littérature

translocation vers le noyau où il se joint à d'autres facteurs de transcription pour promouvoir la prolifération des lymphocytes T activés (Savignac et al., 2007). Par ailleurs, DAG active au moins deux voies de signalisation majeures comprenant les voies médiées par RasGRP (Ras guanyl-nucleotide-releasing protein)(Huse, 2009) et la PKC de la voie NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) (Doreen, 2002; Gorentla and Zhong, 2012; Smith-Garvin et al., 2009). L'activation de NF- κ B régule l'expression d'un large ensemble de gènes impliqués dans presque tous les aspects de l'activation des lymphocytes T, parmi lesquels ceux bien caractérisés comme responsables de la prolifération (*IL-2*, *Cycline-D1*, *Cycline-D2*, *c-Myb* et *c-Myc*), la survie (*IL-2*, *Bcl2*, *Bcl-XL* et *c-FLIP*), le phénotype effecteur (CD25 et CD69) et la production de cytokines effectrices (*IL-2*, *IFN- γ* et *IL-17A*).

Cependant, il a été démontré que la signalisation par le biais du TCR uniquement n'est pas suffisante pour l'activation optimale des cellules T, et peut entraîner l'induction d'un état anergique dans lequel les cellules T ne répondent pas à la stimulation de l'antigène et sont ensuite réfractaires à la re-stimulation (DeSilva et al., 1991). Par conséquent, l'activation productive des cellules T requiert en plus des voies de signalisation du TCR un second signal indépendant de l'antigène délivré par l'engagement de récepteurs de costimulation qui permettent d'augmenter l'intensité et la durée du premier signal. Plusieurs molécules co-stimulatrices ont été identifiées notamment LFA-1, CD2, CD5, CD30, 4-1BB, OX40, et les co-stimulateurs inductibles (ICOS) qui agissent sur les fonctions effectrices des cellules T. Cependant le signal de co-stimulation principal pour l'activation des cellules T est fourni par l'interaction de la molécule co-stimulatrice CD28 présente à la surface des cellules T avec ses ligands CD80/CD86 (B7-1/B7-2) présents à la surface des CPA. Cette interaction favorise la survie et prolifération des lymphocytes T, la production d'IL-2 (Acuto and Michel, 2003; Shahinian et al., 1993). La nature du signal de co-stimulation CD28 est relativement mal définie. Cependant l'analyse des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels régulés par CD28 a permis de démontrer que cette molécule contrôle l'expression et l'activité des facteurs de transcription NFAT, NF- κ B et AP-1 sur le promoteur du gène de l'IL-2.

1.2.5. La régulation du développement lymphocytaire T

1.2.5.1. Le rôle de Notch

Il existe chez les mammifères quatre récepteurs transmembranaires Notch, codés par 4 gènes différents. Les ligands spécifiques de Notch appartiennent à deux familles : la famille Delta (chez les mammifères, Delta like-1, 3 et 4) et la famille Serrate (chez les mammifères, Jagged ; Jag1 et Jag2). Seul la signalisation par le récepteur Notch1 et l'un de ses ligands possèdent un rôle primordial dans l'étape initiale de l'engagement T ainsi que dans les phases précoces du développement (stades DN) (Hasserjian et al., 1996). Il n'est pas encore clair si ce signal est reçu dans l'environnement thymique ou en amont, cependant il a été démontré que la surexpression du domaine intracellulaire de Notch1 dans la moelle osseuse ou la culture de progéniteurs lymphoïdes avec des cellules stromales de la moelle osseuse exprimant les ligands de Notch, conduit au développement de cellules T indépendamment du thymus (Pui et al., 1999). Inversement, l'inactivation de Notch1 dans le thymus provoque un blocage complet du développement de la lignée T et permet l'apparition de lymphocytes B immatures, indiquant que les autres membres de la famille Notch ne peuvent pas compenser la perte de Notch1 *in vivo* (Radtke et al., 1999). Par ailleurs, d'autres travaux ont montré que la signalisation par Notch1 renforce les signaux générés par le pré-TCR au cours de la sélection- β , pour soutenir la prolifération et la différenciation (Ciofani et al., 2004; Huang et al., 2003), et éliminer les cellules DN3 ayant un signal pré-TCR déficient (Wolfer et al., 2001).

Lors de l'interactions du domaine extracellulaire de Notch1 avec son ligand, le récepteur Notch1 subit deux événements de clivage protéolytique, le premier est médié par les métalloprotéases de la famille ADAM et le second via le complexe γ -sécrétase ; cela libère la partie intracellulaire de Notch1 dans le cytoplasme (ICN1), qui migre dans le noyau, s'associe à la protéine RBPJ (également appelé CSL), et recrute certains coactivateurs comme Mastermind (MAML) et des complexes histone acétyl-transférase (HAT) stimulant la transcription de gènes cibles de Notch, y compris le marqueur canonique des cellules DN2 CD2, l'adaptateur d'ubiquitination Deltex1 (Dtx1), le pré-TCR α (*Ptcra*), la protéine de répétition ankyrine (Nrarp), Notch3, Notch1 lui-même, ainsi que plusieurs facteurs de transcription, y compris Gata3, Tcf7 et Hes1, qui ont tous des profils d'expression différents au cours des différents stades DN (Figure 1.6). Il a été suggéré que la régulation de la voie Notch1 est assurée par l'ubiquitine ligase FBXW7 (F-Box and WD

Chapitre 1. Revue de la littérature

repeat domain containing 7), recrutée suite à la phosphorylation de ICN1 par le complexe CYCLINE C/CDK8. Elle se fixe sur un domaine spécifique de Notch1 et entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome qui met fin à la transcription Notch dépendante.

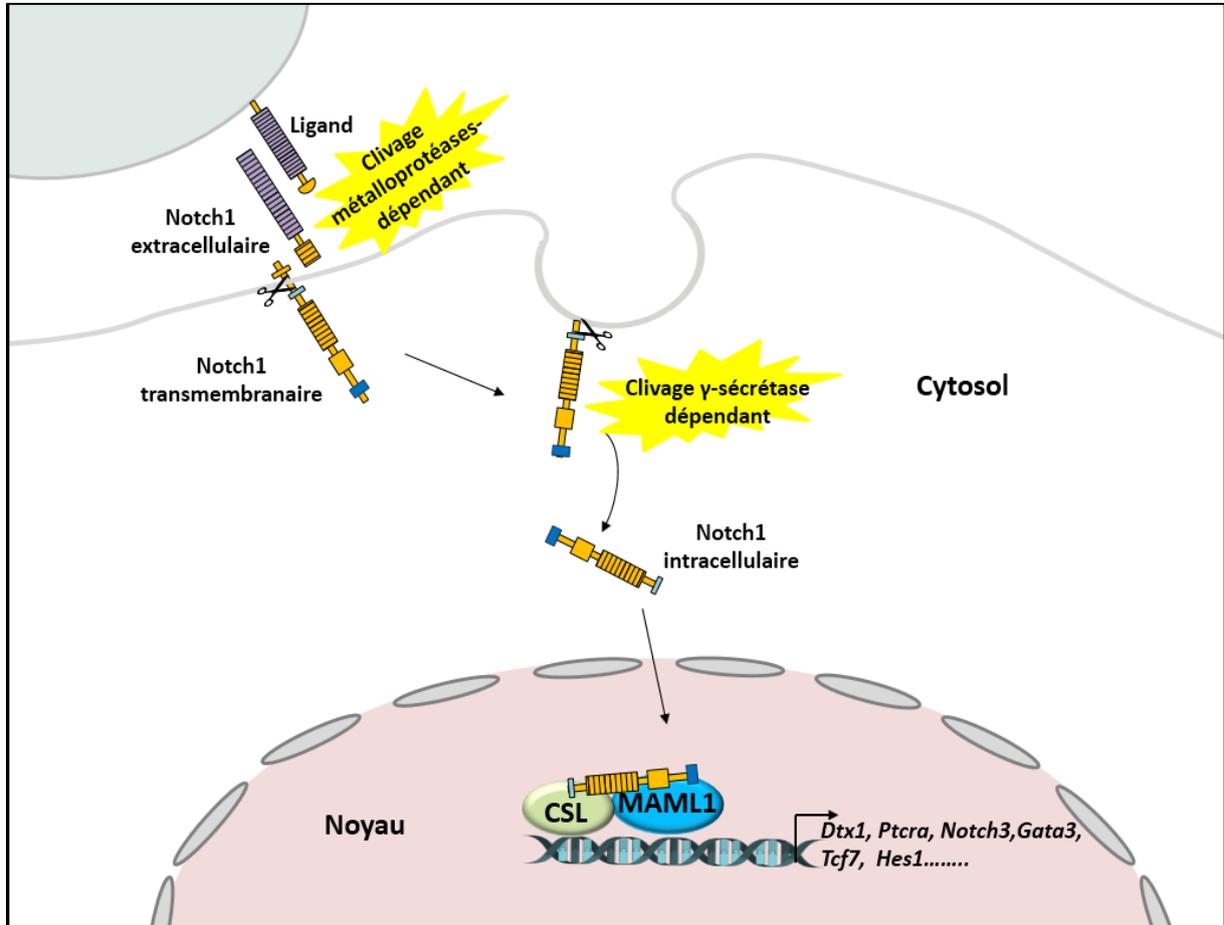


Figure 1.6. Voie d'activation de Notch1. La liaison de Notch1 avec son ligand induit la protéolyse, en deux étapes, du récepteur. Ceci conduit à la libération et la translocation du domaine intracellulaire de Notch1 (ICN1) dans le noyau. L'interaction entre ICN1 et CSL permet le recrutement de coactivateurs (comme MAML1) et entraîne l'activation des gènes cibles de Notch. D'après (Aifantis et al., 2008).

1.2.5.2. Le rôle des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines qui régulent la transcription des gènes, en activant ou inhibant leur expression. Pour maintenir leur identité, les cellules T possèdent un ensemble particulier de facteurs de transcription, dont l'expression est finement régulée et coordonnée dans le temps. Une simple perturbation de cette

Chapitre 1. Revue de la littérature

restriction transcriptionnelle perturbe cette identité, et est associée au développement de tumeurs.

Contrairement aux cellules B, dans lesquelles les facteurs de transcription PAX5 et EBF1 ont été identifiés comme étant spécifiques à la lignée B, aucun candidat équivalent n'a été mis en évidence jusqu'à ce jour pour la lignée T. Les facteurs de transcription critiques dans l'expression des gènes de différenciation des cellules T sont notamment: Tcf-1 (T cell Factor-1 ; produit du gène *Tcf7*), Lef-1 (Lymphoid Enhancing Factor 1), GATA-3, Bcl11b, les protéines E (E2A, produit du gène *Tcf3* et Heb produit du gène *Tcf12*) (Barndt et al., 2000), Ikaros (Ikzf1, ou d'autres membres de la famille) (Georgopoulos, 2002), Id2/Id3 (Isaac and Cornelis, 2001; Miyazaki et al., 2014), Myb, Gfi1, Ets1, et les complexes de Runx1, nommé aussi Aml1 (ou d'autres membres de la famille) avec CBF β (Taniuchi and Littman, 2004; Taniuchi et al., 2002). Cependant, il ne s'agit que d'une partie d'un ensemble beaucoup plus vaste de facteurs de transcription soumis à une régulation différenciée au cours du processus de spécialisation des lymphocytes T. Cependant, je ne développerai ici que les facteurs importants à la compréhension des résultats présentés dans ce travail.

1.2.5.2.1. Lef1 et Tcf-1

Ils représentent les facteurs de transcription effecteurs de la voie de signalisation Wnt, qui favorise la survie, l'expansion et la différenciation des thymocytes au cours du développement des cellules T. Ils sont connus par leur rôles essentiels dans la phase de transition DN1/DN2 et la sélection- β (Martin et al., 2012; Staal and Sen, 2008). Tcf-1 agit principalement comme un régulateur positif crucial pour la spécification des cellules T, en collaborant avec Notch pour activer les gènes des cellules T (Weber et al., 2011). Bien que Tcf-1 ne puisse pas reproduire tous les effets de la signalisation Notch, il a été démontré que sa surexpression pourrait activer de nombreux gènes de cellules T, notamment *Gata3*, *Bcl11b*, *Il2ra* (CD25), *Cd3g*, *Lat*, et *Lck*, même sans le signal Notch. De plus, il a été démontré que le nombre de cellules DN1 est considérablement réduit dans le thymus des souris dépourvues de *Tcf-1*, ainsi qu'un blocage partiel du développement des lymphocytes T aux stades DN1 et DN3, indiquant que l'expression de *Tcf-1* est essentielle à la différenciation précoce de la lignée T. D'autre part, les souris *Lef-1*^{-/-}, ne présente aucune anomalie apparente dans le développement des lymphocytes T. Cependant, les défauts chez les souris mutantes de *Tcf-1* sont aggravés par la perte de *Lef-1*, ce qui

Chapitre 1. Revue de la littérature

indique une redondance fonctionnelle entre ces facteurs au cours de la lymphopoïèse T (Okamura et al., 1998; Yu et al., 2012).

1.2.5.2.2. Runx1/Aml1 (Acute Myeloid Leukemia 1)

Le facteur de transcription Runx1 fait partie de la famille Runx, qui partagent un domaine très conservé de liaison à l'ADN « le domaine runt ». Les protéines Runx sont associées au cofacteur CBF β , qui ne se lie pas à l'ADN mais qui augmente l'affinité du domaine runt de Runx1 pour l'ADN et le protège de la protéolyse, ce qui permet une liaison stable des protéines Runx aux séquences d'ADN cibles (Lopez-Rodriguez et al., 2015; Naito et al., 2011). Runx1 fonctionne au cours de nombreuses étapes du développement des cellules T, telles que le développement du sous-ensemble DN3, la répression des CD4 dans les cellules DN, la sélection positive des cellules DP et l'expression de CD8 au stade DP. La déficience en Runx1 conduit à de graves défauts de différenciation des thymocytes DN, alors que sa surexpression a un effet inhibiteur qui se traduit par un thymus plus petit et la réduction du nombre de cellules DP en raison de la prolifération réduite de la population DN4 (Seo and Taniuchi, 2016; Shah and Zúñiga-Pflücker, 2014; Yui and Rothenberg, 2014).

1.2.5.2.3. Bcl11b

Bcl11b, est également appelé « gardien de l'identité T » pour son rôle essentiel dans l'engagement vers la lignée T. Lors de la différenciation des thymocytes, l'expression de *Bcl11b* est rapidement induite dans la population DN2, et joue un rôle important dans la spécification des cellules T en régulant positivement certains composants essentiels du pré-TCR tels que Zap70 et Pt α , et négativement les facteurs de transcription liés à la plasticité des précurseurs tels que Bcl11a et PU. 1 pendant les processus d'engagement (Seo and Taniuchi, 2016). En plus de ces rôles, Bcl11b est nécessaire pendant les étapes suivantes, en l'occurrence la recombinaison et l'expression de la chaîne TCR β au stade DN3, la survie des cellules DP et la sélection positive de thymocytes matures simples positifs CD4 ou CD8. La délétion de *Bcl11b* dans la lignée germinale altère les phases précoces du développement T induisant un blocage au stade DN3, augmente l'apoptose et diminue de 90% la cellularité thymique. Sa délétion dans les progéniteurs thymiques entraîne la génération de cellules NK dans le thymus et l'expression des gènes T spécifiques (*Notch1*, *Gata3*, *Tcf-1*) est très réduite. Les mécanismes qui régulent

Chapitre 1. Revue de la littérature

l'expression du gène *Bcl11b* sont mal compris, comme il n'est pas clair si la signalisation de Notch soit impliquée dans la régulation de l'expression de *Bcl11b* dans les thymocytes. Cependant, il est intéressant de noter que la région du promoteur *Bcl11b* contient des séquences de liaison de Notch (Lopez-Rodriguez et al., 2015; Naito et al., 2011).

1.2.5.2.4. Les protéines E et Id

Les deux protéines E, E2A (isoformes E12 et E47) et HEB, appartiennent à la famille des protéines à domaine « basique hélice boucle hélice » (bHLH). Leurs rôles dans l'hématopoïèse ont été largement étudiés dans la lymphopoïèse de type B, mais ils jouent également de multiples rôles lors de la transition du stade DN au stade DP dans le développement des cellules T. Les carences en E2A et HEB (ou les deux) sont traduites par des blocages à plusieurs niveaux au cours du développement des cellules T. Il a été démontré que les homodimères E2A et HEB ou les hétérodimères E2A-HEB sont impliqués dans plusieurs étapes de la différenciation des thymocytes: la sélection- β , le réarrangement des gènes codants pour la chaîne TCR β et TCR α et l'expression de Cd4 (Lopez-Rodriguez et al., 2015; Seo and Taniuchi, 2016).

Les protéines Id (inhibiteur de la liaison à l'ADN), principalement produites par *Id2* et *Id3* au cours du développement des cellules T, sont des inhibiteurs des facteurs E2A et HEB. En réponse aux signaux du pré-TCR et TCR, les protéines Id inhibent l'activité des protéines E, pour jouer un rôle critique dans la différenciation et la sélection positive des cellules T $\alpha\beta$. L'inhibition médiée par Id est à la fois nécessaire et suffisante pour activer les programmes d'expression génique essentiels à la maturation des cellules T (Isaac and Cornelis, 2001; Miyazaki et al., 2014).

1.2.5.2.5. Ikaros1

Ikaros ou *Ikzf1*, est le membre fondateur de la famille des facteurs de transcription à doigts de zinc, nécessaires au développement normal des lymphocytes au cours de la vie fœtale ainsi que d'autres lignées de cellules sanguines. Ses gènes cibles incluent plusieurs composants du pré-TCR (*Cd3d*, *Ptcra*), le locus Rag, Cd8a et le facteur de transcription Myc. Au cours de la différenciation des lymphocyte T, Ikaros agit fortement pour réprimer les gènes ciblés par la signalisation de Notch une fois que les signaux pré-TCR sont reçus, bloquant ainsi le processus de leucémogénèse (Amine et al., 2011; Lopez-Rodriguez et al., 2015).

1.2.5.3. Survie et mort au cours de la différenciation du lymphocyte T

Comme indiqué précédemment, le développement du lymphocyte T est marqué par l'expansion de ces cellules à certaines étapes de leur maturation mais également par la mort d'une fraction d'entre elles à différents moments de ce processus. Afin d'éviter la mort cellulaire, les thymocytes doivent pouvoir répondre aux cytokines libérées par les cellules stromales thymiques, tout en exprimant un pré-TCR ou un TCR fonctionnel pour survivre et être correctement sélectionnés. Il est évident que pendant ces processus, les signaux anti-apoptotiques et pro-apoptotiques sont d'une grande importance. Par exemple, les thymocytes DP subissent une sélection positive et négative après avoir réarrangé leur chaîne α du TCR, afin d'éliminer (i) les cellules ayant un TCR non fonctionnel, incapable d'interagir avec le CMH, (ii) et les clones auto-réactifs pour générer un répertoire de lymphocytes T répondant à des antigènes étrangers, mais pas au soi, étape primordiale pour la régulation de l'homéostasie. Le mécanisme d'apoptose est gouverné par deux voies majeurs d'activation: la voie extrinsèque, contrôlée par des récepteurs à domaines de mort (Fas, TNF), et la voie intrinsèque mitochondriale, principalement contrôlée par des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl2 (Strasser, 2005).

1.2.5.3.1. La famille de protéines Bcl2

La famille de protéines Bcl2, sont des régulateurs clés de la mort cellulaire programmée ou de l'apoptose. Bcl2, est le membre fondateur de cette famille, il a été découvert pour la première fois par l'étude de la translocation chromosomique t (14 ;18) qui caractérise les lymphomes folliculaires. Cette étude a montré que le réarrangement d'une région du chromosome 18 vers le chromosome 14 met le gène *Bcl2* sous le contrôle de l'enhancer $E\mu$ (qui contrôle le gène codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines), entraînant ainsi la surexpression de *Bcl2* (Tsujiimoto et al., 1984; Weiss et al., 1987). Cela a conduit à la découverte d'une grande famille de protéines à la fois pro-apoptotiques et anti-apoptotiques qui contrôlent l'engagement de la mort cellulaire par la voie de l'apoptose mitochondriale (intrinsèque).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Structurellement, cette famille est caractérisée par des régions spécifiques d'homologie appelées Bcl2 Homology domain (BH) : BH1, BH2, BH3, et BH4, conservées au cours de l'évolution. En fonction de leurs motifs structurels, la famille Bcl2 est divisée en trois groupes. Le groupe de protéines anti-apoptotiques possédant tous les 4 domaines BH, telles que *Bcl2*, *Bcl-XL*, *Mcl-1* et *Bcl2-A1 (A1)*, qui inhibent tous les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl2 par le biais d'interactions de domaines BH. Tandis que les 2 autres groupes sont pro-apoptotiques: les protéines similaires à BAX (BAX-like), telles que BAX et BAK, et les protéines possédant seulement un domaine BH3 (les protéines BH3-only), comme BIM, BAD, BIK, NOXA ou PUMA (Strasser, 2005) (Figure 1.7). Le destin d'une cellule dépend de l'équilibre des niveaux de protéines de la famille Bcl2 par le biais d'un processus dynamique par lequel la signalisation cellulaire peut moduler l'expression de protéines pro- ou anti-apoptotiques afin de faire basculer l'équilibre vers la survie ou la mort.

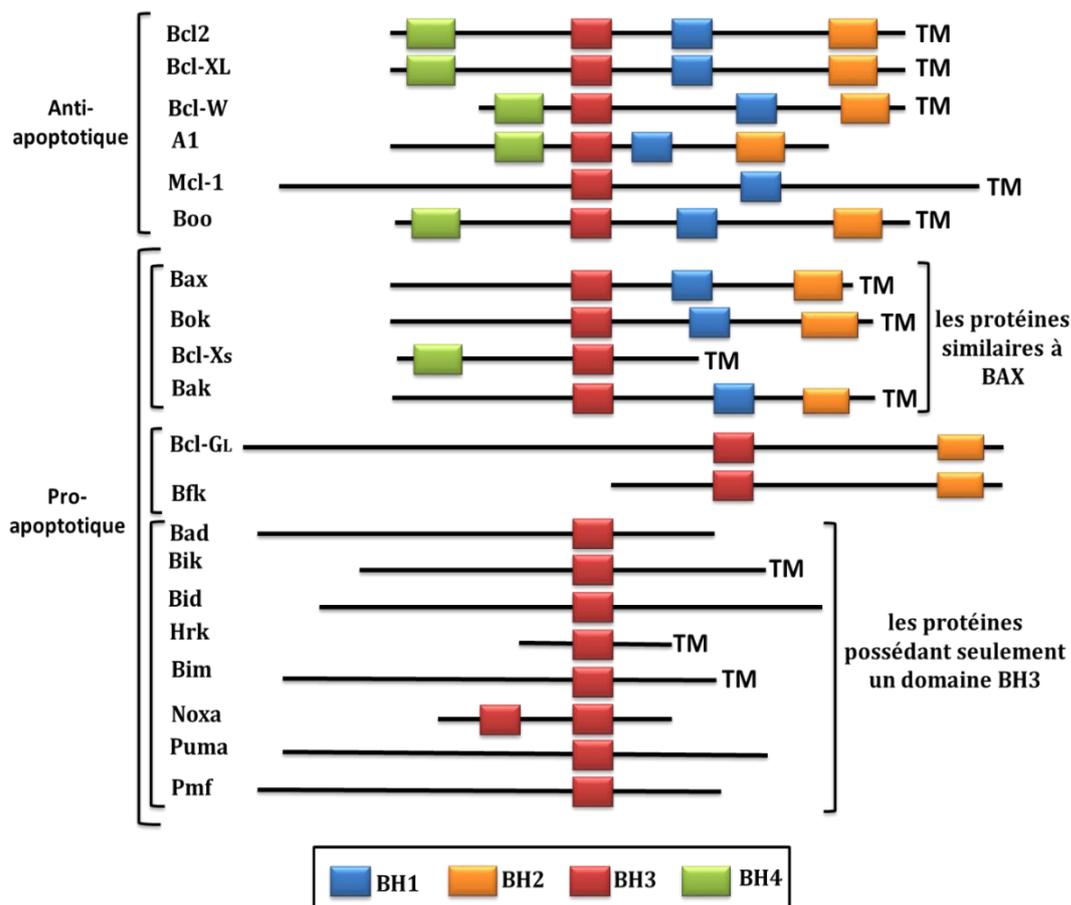


Figure 1.7. Structure des protéines de la famille Bcl2. BH : Bcl2 homology domain ; TM : domaine transmembranaire. D'après (Strasser, 2005).

1.2.5.3.2. Les membres anti-apoptotiques de la familles Bcl2

Ils se localisent principalement à la membrane externe de la mitochondrie (rarement dans le cytosol ou dans la membrane du réticulum endoplasmique) où ils inhibent la fonction des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl2, en prévenant la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. L'expression des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl2 est régulée par divers mécanismes. Ils sont activés suite à l'engagement de signaux de survie impliquant des récepteurs extracellulaires pour des cytokines ou des molécules d'activation, et par les voies de signalisation intracellulaire, en aval, comme les voies NF- κ B et NFAT.

Les protéines anti-apoptotiques Bcl2, Bcl-xL, Mcl-1 et Bcl2-A1 sont tous activement impliqués à différents stades du développement des thymocytes (Figure 1.8).

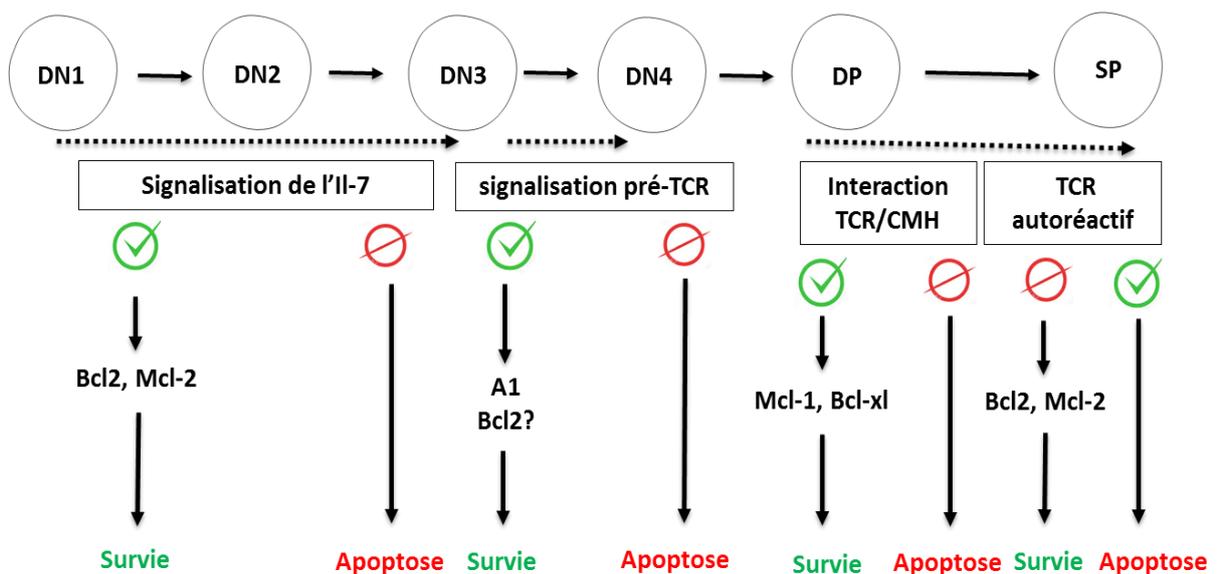


Figure 1.8. Régulation de la survie par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl2 au cours du développement des thymocytes. Les principaux signaux/molécules anti-apoptotiques sont indiquées.

Bcl2 et *Mcl-1*, jouent un rôle majeur de pro-survie au début du développement des thymocytes, en aval de la signalisation de l'IL-7 (Akashi et al., 1997; Opferman et al., 2003). L'expression de *Bcl2* est fortement induite au stade DN et sa surexpression sauve le développement des lymphocytes T en absence du signal d'IL-7. Bien que les souris déficientes en *Bcl2* démontrent une différenciation normale des lignées B et T, elles sont incapables de maintenir l'homéostasie lymphoïde et présentent un taux élevé d'apoptose

Chapitre 1. Revue de la littérature

en réponse à des stimuli d'activation. Il a été également démontré que la délétion de *Mcl-1* entraîne un blocage du développement au niveau du stade DN en raison du taux élevé d'apoptose (Opferman et al., 2003). Sur la base de ces données, il a été suggéré que les membres anti-apoptotiques, *Bcl2* et *Mcl-1* favorisent la survie des thymocytes DN, en aval du signal de l'IL-7.

La sélection- β est un point de contrôle critique au stade DN3, médiée par la signalisation pré-TCR. Un signal pré-TCR approprié, entraîne l'activation de la voie NF- κ B (Voir paragraphe 1.2.2) et l'expression du membre anti-apoptotique *A1* qui favorise la survie des cellules en inhibant la caspase 3, et la transition des thymocytes DN3 vers le stade DP (Mandal et al., 2005). En absence d'un signal pré-TCR approprié, les cellules DN3 meurent par apoptose. Plusieurs études antérieures ont suggéré que *Bcl2* n'est pas induit lors de la sélection- β . Cependant, il a été rapporté récemment que la surexpression de *Bcl2* réduisait la proportion d'apoptose dans les thymocytes déficients en NFAT5, suggérant que NFAT5 favorise la survie des cellules, en induisant à la fois l'expression de *A1* et *Bcl2* (Berga-Bolanos et al., 2013).

La signalisation induite par l'interaction entre le complexe CMH/peptide (pCMH) et le TCR des thymocytes doubles positifs conduit à l'activation de nombreuses voies de signalisation. Ces voies de signalisation régulent et déterminent la sélection positive et négative des LT en contrôlant sélectivement l'expression de facteurs de survie ou pro-apoptotiques. La protéine anti-apoptotique *Bcl-xl* est fortement exprimé dans les thymocytes DP avant qu'ils soient engagés dans les processus de sélection et favorise leur longévité (Zhang et al., 2000; Zhang and He, 2005). La délétion du gène *Bcl-xl* rend les thymocytes DP plus susceptibles à l'apoptose *in vitro* (Zhang and He, 2005) et sa surexpression conduit à l'augmentation du nombre de thymocytes. La délétion de *Mcl-1* affecte également la survie des thymocytes DP *in vitro* (Dzhagalov et al., 2008), mais entraîne une perte moins importante de thymocytes DP par rapport à celle induite par la délétion du gène *Bcl-xl*. La suppression combinée de *Mcl-1* et de *Bcl-xl* entraîne une réduction sévère du nombre de cellules DP, suggérant que les deux facteurs jouent un rôle important dans la prévention de la mort par négligence.

La sélection des thymocytes DP dépend de l'affinité du TCR pour l'auto-pCMH dans le thymus. Les interactions TCR-pCMH de faible affinité entraînent une sélection positive et des interactions de haute affinité entraînent une sélection négative afin de minimiser le

risque d'auto-immunité à la périphérie. Lors de la sélection positive, l'un des événements les plus importants est la survie. Cet événement est assuré par les molécules anti-apoptotiques Bcl2 et Mcl-1 (Akashi et al., 1997; Marino et al., 2010; Moore et al., 1994).

1.2.5.3.3. Le cancer et les membres anti-apoptotiques Bcl2

L'équilibre entre les protéines Bcl2 pro- et anti-apoptotiques assure une régulation appropriée de la mort cellulaire programmée pendant le développement et maintient l'homéostasie de l'organisme. La dérégulation des membres de la famille de Bcl2 par la diminution de l'activité des membres pro-apoptotiques ou l'augmentation de l'activité des membres anti-apoptotiques, peut constituer une barrière à l'apoptose, facilitant ainsi le développement de tumeurs et contribue à la résistance contre les traitements thérapeutiques.

Comme mentionné ci-dessus, *Bcl2* a été initialement isolé et caractérisé dans un sous-ensemble de lymphome à cellules B (Weiss et al., 1987). Ainsi, il est apparu que ce gène a joué un rôle dans le cancer avant même que sa fonction dans la régulation de l'apoptose soit clairement définie. Depuis ces débuts, plusieurs travaux ont prouvé le rôle de l'altération de *Bcl2* dans le développement du cancer, y compris un certain nombre de modèles animaux. En fait, les souris transgéniques portant la surexpression de *bcl2* sont susceptibles de développer différentes formes de troubles lymphoprolifératifs (Egle et al., 2004). La surexpression de *Bcl2* ne se limite pas seulement aux hémopathies malignes, mais également à divers autres cancers, tels que le lymphome de Hodgkin (Gascoyne et al., 1997), le cancer du sein (Tawfik et al., 2012), du poumon (Han et al., 2002), du cerveau et à la réduction de la survie et à la résistance au traitement endocrinien (Tawfik et al., 2012). L'augmentation de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl2, Bcl-XL et Mcl-1 est généralement associée à une agressivité plus importante des cancers et/ou à une chimio- et une radiorésistance.

Par conséquent, les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl2 ainsi que les voies de signalisation en amont de ces protéines sont des candidats cibles attrayants et les inhibiteurs de *Bcl2* ont été proposés comme nouvelle stratégie thérapeutique dans les cancers.

1.3. Les ARN non codants et le concept du gène

Malgré leur diversité, tous les organismes vivants (à l'exception des virus, qui représentent des petites entités biologiques acellulaire), des plus simples, une éponge par exemple, aux plus complexes comme l'organisme humain, sont constitués d'une ou de plusieurs unités fondamentales appelées cellules qui présentent des caractéristiques communes en termes de structure mais également de fonctionnement et organisation. La cellule a besoin en permanence des informations génétiques que l'ADN contient sous forme de gènes, pour fonctionner, se développer et se reproduire. Selon le dogme central de la biologie moléculaire (Figure 1.9), l'ARN est l'intermédiaire du flux d'informations entre le matériel génétique (ADN) et le produit final (protéine). L'expression d'un gène en protéine comporte deux étapes, la transcription en ARN messager (ARNm) dans le noyau, qui sera ensuite traduit sous forme d'acides aminés, éléments moléculaires dont l'assemblage constitue la protéine (Robinson, 2009).



Figure 1.9. Le dogme central de la biologie moléculaire selon James Watson (1965).

D'après La figure a été créé à l'aide d'images adaptées de Servier Medical Art by Servier (disponible à l'adresse <http://smart.Servier.com/>). D'après (Taubeneck, 1967).

Suite à la découverte des mécanismes du dogme central, en 1961 Watson et Crick ont mis en évidence les deux premiers types d'ARNnc fonctionnels par eux-mêmes, sans coder pour des protéines : les ARN ribosomiques (ARNr) et les ARN de transfert (ARNt). Ils sont connus pour leurs rôles au niveau de la traduction et sont présent dans tous les organismes vivants. Plus récemment, il a été découvert que le flux de l'information biologique est bien entendu plus complexe qu'on ne le pensait auparavant, plusieurs étapes intermédiaires telles que les mécanismes de réparation de l'ADN et l'épissage alternatif du pré-ARNm ont été introduit. Ces étapes supplémentaires interfèrent avec les étapes clés du dogme et modifient probablement la dynamique de l'information. En outre,

Chapitre 1. Revue de la littérature

l'épigénétique, ou le rôle joué par la structure de la chromatine, la méthylation de l'ADN et les modifications des histones, semblent également aller à l'encontre des voies simples du dogme. Prises ensemble, ces données jettent un doute sur la validité du dogme central dans le contexte de la science actuelle et par conséquent, remettent en question la simplicité du flux d'information linéaire (ADN à ARN, et ARN à protéine).

La découverte du premier micro-ARN (miARN) en 1993 (Rosalind et al., 1993), était le début de la recherche qui a conduit à la compréhension que la régulation des gènes n'est pas seulement contrôlée par les protéines (facteurs de transcription) mais aussi par les molécules d'ARN non codants dans lequel le flux d'informations est bloqué soit en dégradant l'ARNm transcrit ou en facilitant l'inhibition génique au niveau de l'ADN. Simultanément, les avancées technologiques telles que les analyses génomiques à grande échelle (Cabili et al., 2011), l'achèvement du Projet Génome Humain (Lander et al., 2001) et les données du consortium ENCODE (l'encyclopédie des éléments d'ADN)(The et al., 2007) ont profondément modifié notre compréhension de l'organisation fonctionnelle du génome. Il est clair maintenant qu'une partie importante du génome est transcrite, mais seule une petite fraction de l'ADN code pour les protéines (environ 25.000 des gènes codant pour des protéines existent dans notre espèce, avec moins de 2% du génome humain utilisé pour coder des protéines) (Kataoka and Wang, 2014). D'après les travaux des scientifiques du projet ENCODE, 87,3% du génome humain est activement transcrit (Yue et al., 2014), et seule la moitié du transcriptome comprend des transcrits codant (Djebali et al., 2012) (Figure 1.10). Pour avoir une idée nette des proportions, le génome des nématodes contient environ 20.000 gènes codant pour des protéines (même nombre que l'espèce humaine, alors qu'ils n'ont que 1.000 cellules comparativement aux 10^{14} cellules humaines. En revanche, la proportion d'ARN non codant augmente avec la complexité de l'organisme (Aune et al., 2016; Taft et al., 2007).

Cette découverte est surprenante à double titre. D'abord en raison du très grand nombre de ces ARN dits non codants (plusieurs familles d'ARN non-codants sont connues et répertoriées dans des bases de données publiques telles que RFAM (Griffiths-Jones, 2003) et NONCODE (Liu et al., 2005), et le fait qu'ils ne sont pas traduits en protéines. Ces résultats ont fait un grand changement dans la conception du génome (Amaral et al., 2008). Peu de temps après, ces ARN sont devenus un objet d'étude à part entière dans la

Chapitre 1. Revue de la littérature

génétique et la biologie de l'évolution, en passant par l'immunologie, la biologie du développement ou encore la physiopathologie.

Dans cet univers de séquences non codantes il existe plusieurs familles d'ARN, classifiées en fonction de leur taille, fonction, structure et conservation. Les deux classes les plus étudiés sont les miARN et les lncARN dont plusieurs évidences suggèrent que certains ont une fonction régulatrice nécessaire au bon fonctionnement de la machinerie cellulaire.

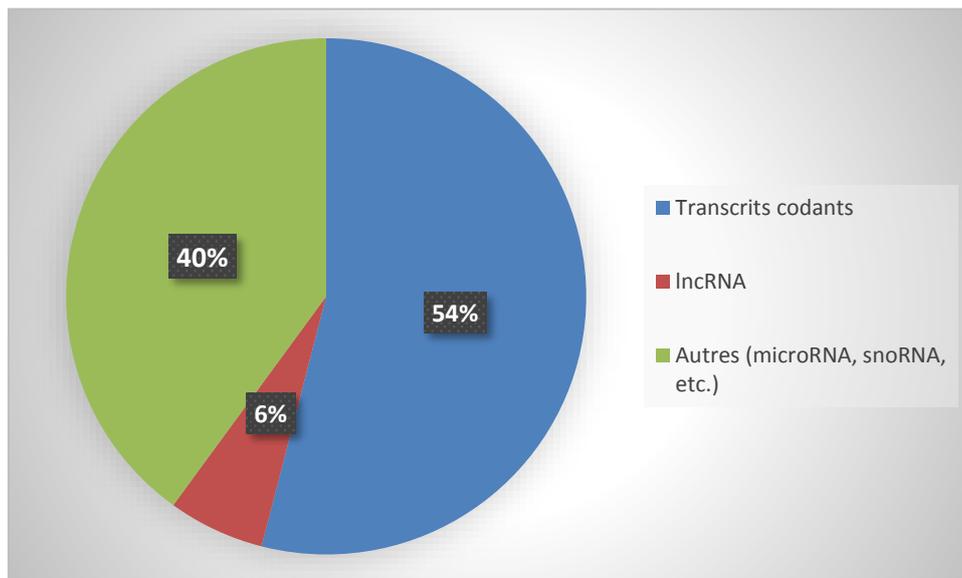


Figure 1.10. L'abondance relative des transcrits codants et non codants dans le transcriptome humain. Adapté de (Kwok and Tay, 2017).

1.3.1. Les petits ARN non codants

Ces dernières années, la découverte des petits ARNnc a dévoilé une série de puissants régulateurs de l'expression des gènes aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel. Ces petits ARN régulateurs représentent un mécanisme de régulation conservé et très ancien, reflété par leur présence dans des organismes allant du plus simple au plus complexe. Bien que la liste de petits ARNnc ne cesse de croître avec l'identification progressive de nouvelles classes d'ARN non codants, divers aspects de leurs origines, structures, protéines effectrices associées et rôles biologiques ont conduit à la reconnaissance générale de trois catégories principales: les miARN (micro-ARN), les piARN (PIWI-interacting ARN) et siARN (small interfering ARN) (Supratim, 2010). Les siARN et les miARN représentent les classes les plus largement réparties en termes

Chapitre 1. Revue de la littérature

phylogénétiques et physiologiques, ils se caractérisent par la nature bicaténaire de leurs précurseurs. En revanche, les piARN sont principalement présents chez les animaux et se caractérisent par la nature simple brin de leurs précurseurs (Mandal and Kazazian, 2008).

1.3.1.1. Les MiARN

Les microARN représentent les premiers petits ARN endogènes identifiés, jusqu'à présent, c'est la classe d'ARNnc la mieux caractérisée en termes d'expression et de fonction. Ils sont caractérisés par une petite taille (environ 20-25 nucléotides), ils sont exprimés de façon tissu-spécifique et sont hautement conservés au cours de l'évolution. Le nombre total de miARN humain est actuellement estimé à plusieurs milliers et leurs fonctions régulatrices se diversifient, suggérant qu'un grand nombre de processus physiologiques (par exemples le développement, la différenciation et la prolifération cellulaires, l'apoptose ou la réponse au stress) est contrôlé au moins en partie par les miARN. Ainsi une dérégulation de l'expression des miARN est souvent la source de multiples pathologies telles que les cancers (Lamoril et al., 2010b).

Ces petits ARN simple-brin sont générés à partir de précurseurs spécifiques codés par le génome, appelés microARN primaire (pri-miARN), qui sont transcrits essentiellement par l'ARN Polymérase II (exceptionnellement par l'ARN polymérase III). Ces pri-miARN, caractérisé par une structure en épingle à cheveux, sont coiffés, polyadénylés, et leur taille peut varier d'une centaine à plusieurs milliers de nucléotides. La première étape dans la biogénèse du miARN est le clivage du pri-miARN par Drosha (une endonucléase spécifique de l'ARN double brin de type RNaseIII) et le cofacteur DGCR8 (chez l'homme pour DiGeorge syndrome critical region 8). L'action conjointe des deux est nécessaire et ils agissent, dans le noyau, sous la forme d'un complexe appelé micro-processor qui permet la production de précurseurs intermédiaires (pré-miARN) d'environ 60 à 70 nucléotides (Cavaillé, 2004; Dunoyer, 2009). L'absence de l'un des deux entraîne une réduction de pré-miARN et des miARN. Les pré-miARN produits sont ensuite exportés au cytoplasme par le biais du facteur d'export exportine 5 (une protéine de la membrane nucléaire) via l'utilisation de l'énergie fournie par RanGTP. Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN se joint à un autre complexe protéique contenant en particulier une RNase III dénommée Dicer (Hutvagner et al., 2001), qui va alors cliver le miARN pour donner naissance à un duplex de type siARN appelé duplex miR:miR*, d'une vingtaine de nucléotides. L'étape finale est l'association du microARN monocaténaire à un complexe

Chapitre 1. Revue de la littérature

protéique nommé complexe RISC (pour RNA induced silencing complex), constitué principalement de protéines de la famille Argonaute qui transporte le miARN jusqu'à sa cible, l'ARNm auquel il s'apparie. Suivant le degré de complémentarité avec la cible, il s'ensuit finalement un clivage ou une répression transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle (Figure 1.11).

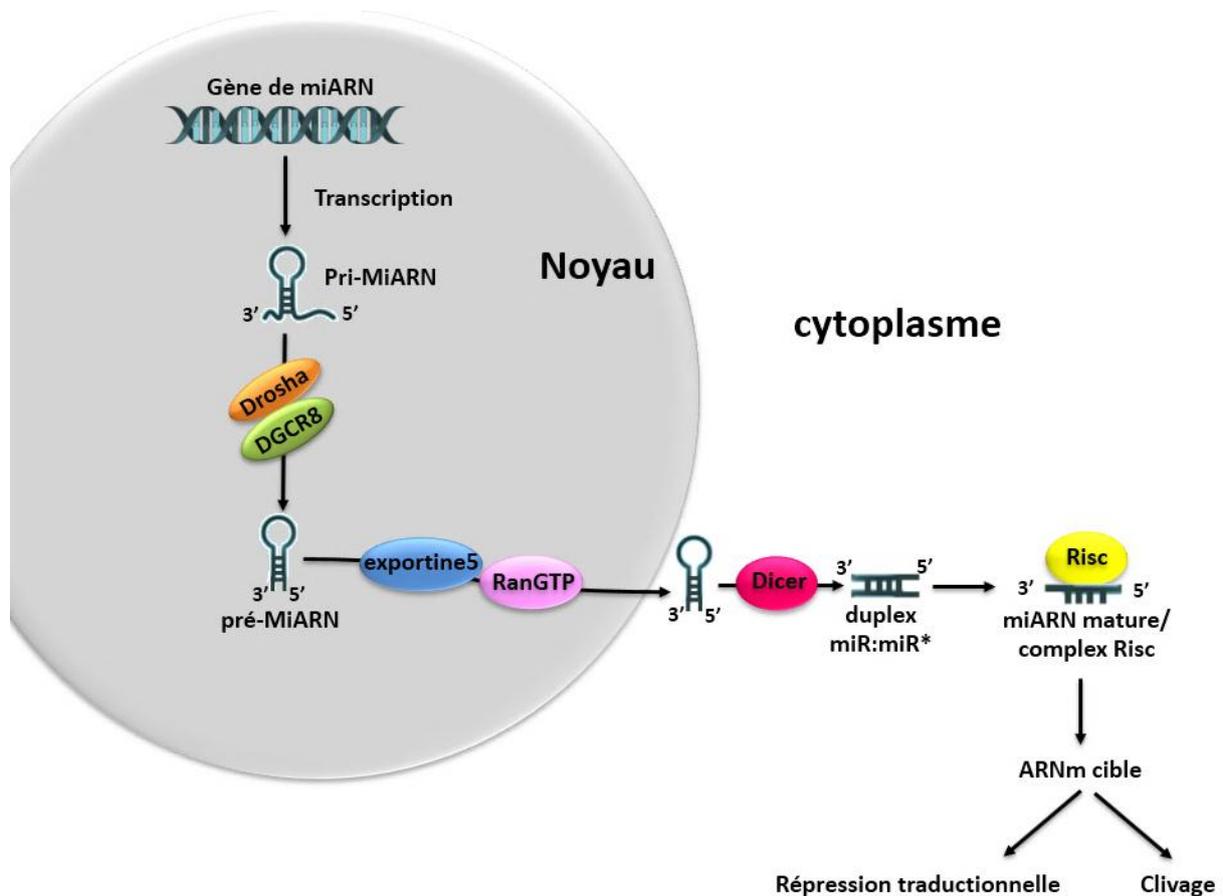


Figure 1.11. Les étapes clés de la biogenèse et l'activité des MiARN. Le gène miARN est transcrit pour générer un pri-miARN qui subit un clivage pour former un pré-miARN. Le pré-miARN est ensuite exporté au cytoplasme et clivé pour créer un duplex de micro-ARN (miARN : miARN *) contenant le miARN mature. le miARN mature s'assemble dans le complexe RISC puis s'hybride avec l'ARNm cible pour diriger la répression des gènes via le clivage de l'ARNm ou la répression de la traduction en fonction du niveau de complémentarité entre l'ARNm et la cible d'ARNm.

1.3.1.2. Les siARN

Les siARN sont des petits ARN non codants de 22 nucléotides, pouvant provenir de précurseurs endogènes « endosiARN » ou exogènes (ex : les ARN viraux) (Lamoril et al., 2010a). Ces précurseurs se présentent sous la forme d'un long ARN double brin parfaitement complémentaires dans le cytoplasme. Plusieurs caractéristiques sont communes dans la biogenèse de miARN et de siARN dans le cytoplasme, tel que le clivage des précurseurs par l'enzyme Dicer pour produire des courts fragment d'ARN double brin, et le déroulement du duplex d'ARN en utilisant l'activité hélicase de Dicer afin de ne conserver que le brin guide au sien du complexe RISC, et le clivage de l'ARNm cible (Carthew and Sontheimer, 2009; Supratim, 2010). C'est à l'étape effectrice où le miARN et le siARN divergent en termes de leurs mécanismes d'action. Contrairement au miARN, la complémentarité de séquences entre le siARN et son ARNm cible est parfaite. Suite à cette reconnaissance l'ARNm cible est clivé par l'activité ribonucléase de la protéine Ago2 et ensuite dégradé par des exo et des endonucléase cytoplasmique ce qui empêche la traduction de l'ARNm cible et bloque donc son expression (Supratim, 2010).

1.3.1.3. Les PiARN

Les ARN interférents PIWI (piARN) sont une classe de petits ARN endogènes non codants qui agissent comme des gardiens du génome, en contrôlant l'expression des ETs (Eléments Transposables) (Mandal and Kazazian, 2008). Ils se distinguent des miARN et des siARN par leur taille (25 à 30 pb) et leur biogenèse. Ils sont issus de précurseurs transcrits à partir de régions génomiques particulières nommés clusters de piARN, composés en grande partie d'éléments transposables. Ils se présentent sous la forme d'un long ARN simple brin (pré-piARN), ils subissent plusieurs étapes de maturation pour former un piARN mature indépendamment des enzymes de la famille des RNases III de type Dicer et DGCR8 (nécessaire pour la biogenèse d'endo-siARN et de miARN), mais plutôt des protéines Piwi qui sont principalement exprimées dans la lignée germinale et qui possèdent des activités enzymatiques nucléasiques (Houwing et al., 2007; Ishizu et al., 2012; Vagin et al., 2006).

Pour réprimer les ETs, les piARN matures s'associent aux protéines PIWI, qui appartiennent à une sous-classe de la famille Argonaute, pour former des complexes effecteurs ribonucléoprotéiques connus sous le nom «silencing complex» impliqués

Chapitre 1. Revue de la littérature

notamment dans la répression des ETs via des mécanismes transcriptionnels ou post-transcriptionnels et maintiennent l'intégrité du génome germlinal (Ishizu et al., 2012; Romero et al., 2012). Des mutations de type perte de fonction dans les piARN et leurs cofacteurs induisent des défauts de gamétogenèse et une stérilité chez la drosophile (Khurana and Theurkauf, 2010).

1.3.2. Les lncARN

Les lncARN représentent la classe la plus répandue et la plus fonctionnelle dans le monde des ARN non codants. La définition de ces transcrits est relativement imprécise et continue d'évoluer de façon constante. Cependant, la définition la plus couramment utilisée est basée sur les caractéristiques représentées dans le nom lncARN: ils sont relativement long (une taille supérieure à environ 200 nucléotides ; pouvant s'étendre sur plusieurs dizaines de kilobases (kb)), et l'analyse bioinformatique indique qu'ils ne semblent pas posséder, de capacité à coder pour des protéines (Pang et al., 2018).

1.3.2.1. Description générale des lncARN

Jusqu'à présent, les connaissances sur le nombre, la localisation et les rôles des lncARN restent partielles. Ils sont observés dans une grande diversité d'organismes à travers le règne animal, végétal, fongique ou encore chez les procaryotes et même les virus. Le premier lncARN, H19, impliqué dans l'embryogenèse a été rapporté par Brannan et ses collègues en 1990 (Brannan et al., 1990), suivi par la découverte du gène Xist (X-inactive specific transcript) qui intervient au cours du développement embryonnaire, pour inactiver l'un des deux chromosomes X de femelle chez les mammifères (Brown et al., 1992a, b). Depuis, ces découvertes initiales ont révolutionné notre vision des fonctions et de la pertinence biologique des lncARN en général. Au cours des dernières années, l'étude des lncARN est devenu un domaine de recherche en pleine expansion (Figure 1.12), cette augmentation est une conséquence directe de la découverte, via les nouvelles méthodes de séquençage d'ARN, d'un grand nombre de nouveaux gènes non codants. Plusieurs catalogues publics regroupent tous les lncARN connus avec une description détaillée de leurs structures génomiques (Tableau 1.2). Par exemple, la version V28 de GENCODE compte actuellement 15779 lncARN détectés chez l'humain (le nombre des lncARN annotés est variable selon les études et les bases de données utilisées).

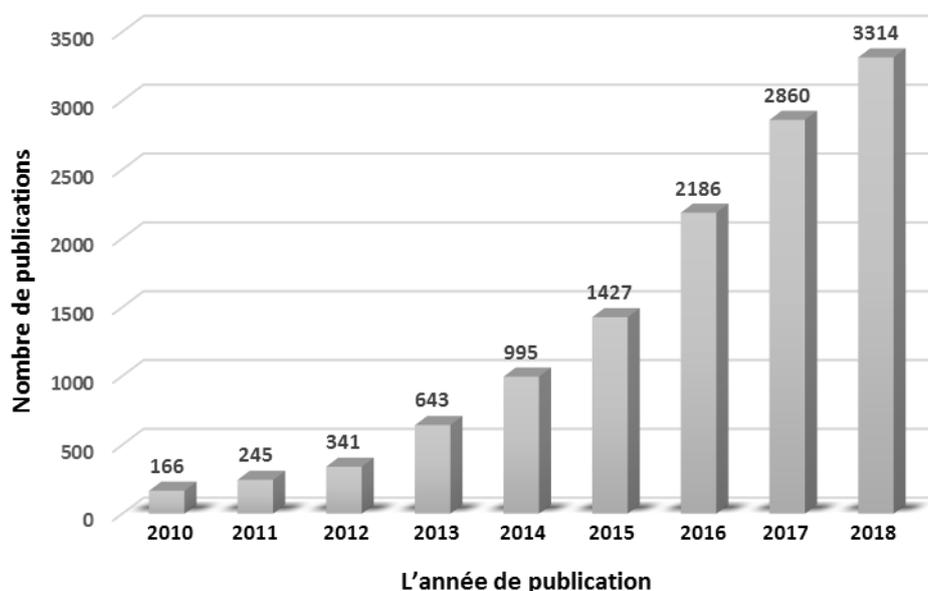


Figure 1.12. Le nombre de publications, liées au lncARN au cours de la dernière décennie sur PubMed ; mot-clé "lncRNA". On note une très forte augmentation du nombre de publications depuis 2010, mettant en relief l'engouement de la communauté scientifique pour cette nouvelle problématique.

Tableau 1.2. Bases de données publiques disponibles en ligne de lncARN. Au même titre que la figure 1.12, l'augmentation du nombre de base de données et de leurs enregistrements est le reflet d'un intérêt très fort de la communauté scientifique pour ces nouvelles espèces d'ARN et la nécessité d'organiser nos connaissances les concernant.

Les bases de données	Websites	Références
NPInter	http://www.biointo.org.cn/NPInter/	(Wu et al., 2006)
ncRNAdb	http://biobases.ibch.poznan.pl/ncRNA/	(Szymanski et al., 2007)
fRNAdb	http://www.ncrna.org/	(Kin et al., 2007)
NRED	http://jsm-research.imb.uq.edu.au/NRED	(Dinger et al., 2009)
lncRNAdb	http://www.lncrnadb.org/	(Amaral et al., 2011)
GENCODE	http://www.genencodegenes.org	(Derrien et al., 2012)
NONCODE	http://www.noncode.org/	(Bu et al., 2012)
LNCipedia	http://www.lncipedia.org	(Volders et al., 2013)
lncRNome	http://genome.igib.res.in/lncRNome	(Bhartiya et al., 2013)
LncRBase	http://bicresources.jcbose.ac.in/zhumur/lncrbase	(Sohini et al., 2014)
Co-LncRNA	http://www.bio-bigdata.com/Co-LncRNA/	(Zhao et al., 2015)
C-It-Loci	http://c-it-loci.uni-frankfurt.de/	(Weirick et al., 2015)

Chapitre 1. Revue de la littérature

Les lncARN partagent certaines des caractéristiques des ARNm: ils sont transcrits essentiellement par l'ARN polymérase II et dans de rares cas par l'ARN polymérase III (Fatica and Bozzoni, 2013), ils subissent l'épissage, l'ajout d'une coiffe à leur extrémité 5' et une polyadénylation à l'extrémité 3', ils ont des profils épigénétiques proches et sont soumis également aux mêmes régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles (Li et al., 2013). En revanche, les lncARN sont généralement faiblement exprimés (niveau d'expression 10 à 20 fois plus faible que les transcrits produits à partir des gènes codants), rendant la distinction avec « un bruit transcriptionnel » par fois délicate. Ils possèdent moins d'exons qu'un ARNm et leurs tailles, au même titre que pour les introns, est en moyenne plus importante (Ulitsky and Bartel, 2013). La conservation des lncARN apparaît relativement faible chez différentes espèces comparativement aux autres types d'ARN (tels que les ARNm, miARN, snoARN etc...). Cependant, une étude récente à montrer que de courtes séquences conservées pourraient être trouvées à leurs extrémité 5' (Hezroni et al., 2015). De plus, de nombreux lncARN ont une fonction conservée au cours de l'évolution, et leur expression est remarquablement spécifique tant au niveau tissulaire que développemental.

Comme pour les protéines, la fonction des lncARN dépend de leur localisation subcellulaire. Certains lncARN (~15%) sont exportés du noyau et remplissent des fonctions dans le cytoplasme (Kapranov et al., 2007), mais la majorité se trouvent dans le noyau, en particulier en association avec la chromatine (Derrien et al., 2012), et plusieurs sont reconnus comme des modulateurs importants dans les fonctions nucléaires (Batista and Chang, 2013; Chen and Carmichael, 2010).

1.3.2.2. Classification des lncARN

Les lncARN semblent être très hétérogène du point de vue de leur fonction, avec une grande variabilité dans leurs effets cellulaires, ainsi que leurs influences moléculaires. Par conséquent, les tentatives de classification des lncARN reposent généralement sur leurs localisations par rapport aux gènes codants. Comme illustré dans la figure 1.13, ils sont catégorisés en sens, antisens, bidirectionnels, intronique, ou intergénique (Huang et al., 2012; Ponting et al., 2009).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Les lncARN sens et antisens (NATs, natural antisense transcripts) sont transcrits à partir du brin sens ou antisens des gènes codants, chevauchant un ou plusieurs exons d'un autre transcrit codant sur le même brin, ou sur le brin opposé respectivement (Novikova et al., 2013). Les lncARN bidirectionnels ou divergents ont des sites d'initiation de transcription très proches d'un gène codant, mais ils sont transcrits dans le sens opposé. La transcription des lncARN bidirectionnels est souvent concordante avec l'expression du gène codant voisin avec une distance maximale de 1kb entre les deux sites d'initiation de la transcription, ce qui suggère que le lncARN joue un rôle dans le maintien d'une structure chromatinienne localement «ouverte» probablement par une régulation en cis (Rinn and Chang, 2012), ou par le biais de promoteurs partagés (Ho et al., 2012). Les lncARN introniques sont contenus dans l'intron d'un gène et peuvent aller dans les deux directions et se terminent sans chevaucher un exon (Clark and Blackshaw, 2014). Les lncARN intergéniques (lincARN) représentent la classe la plus abondante de lncARN comprenant plus de 10000 espèces à ce jour. Ils sont compris dans une région génomique dénuée de gènes codants (Marques and Ponting, 2014).

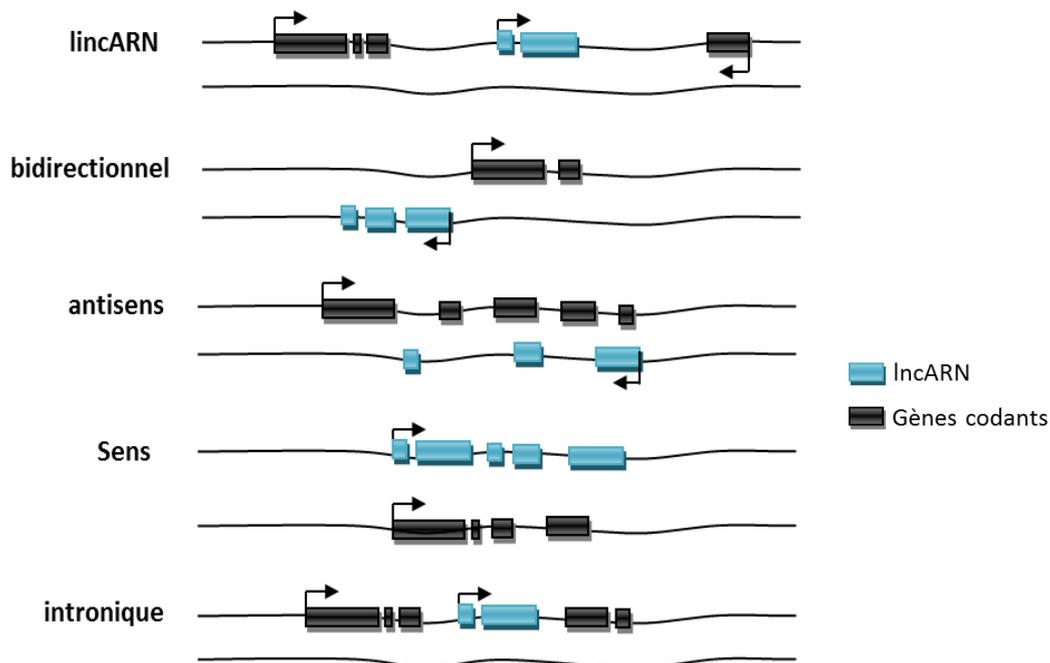


Figure 1.13. Schéma illustrant les différentes positions génomiques des lncARN par rapport aux gènes codants. La classification des lncARN se fait en fonction de leur emplacement par rapport à un gène codant. Il existe actuellement 5 classes de lncARN : sens, antisens, intronique, bidirectionnel et intergénique. D'après (Li et al., 2015a).

1.3.2.3. Fonctions et mécanisme d'action des lncARN

De nombreux travaux au cours des dernières années ont démontré que les lncARN interagissent avec l'ADN, les molécules d'ARN et les facteurs de transcription et jouent un rôle important dans une grande variété de processus biologiques incluant le maintien de la pluripotence des cellules souches, la différenciation et développement cellulaire, la régulation du cycle cellulaire et la réponse immunitaire (Lamoril et al., 2010b). Ils sont aussi largement impliqués dans la régulation épigénétique et de l'expression des gènes, autant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel (Krystal et al., 1990; Tripathi et al., 2010). Cette fonction de régulation pourrait fonctionner en cis ou en trans (Figure 1.14). Les lncARN fonctionnent en cis lorsque leurs effets sont limités au chromosome à partir duquel ils sont transcrits (ex: *Xist* et *HOTTIP*), et en trans lorsqu'ils affectent des gènes sur d'autres chromosomes (ex: *HOTAIR*, *7SK* et *B2*) (Blackshaw et al., 2004; Rinn et al., 2007). Il n'est donc pas surprenant qu'un simple dérèglement dans la régulation de l'expression des lncARN soit impliqué dans le développement de nombreuses maladies humaines et puisse intervenir dans la survenue ou la progression du cancer (Kwok and Tay, 2017; Wapinski and Chang, 2011). Par conséquent, les caractéristiques biologiques et les fonctions des lncARN en font un sujet de recherche important et intéressant.

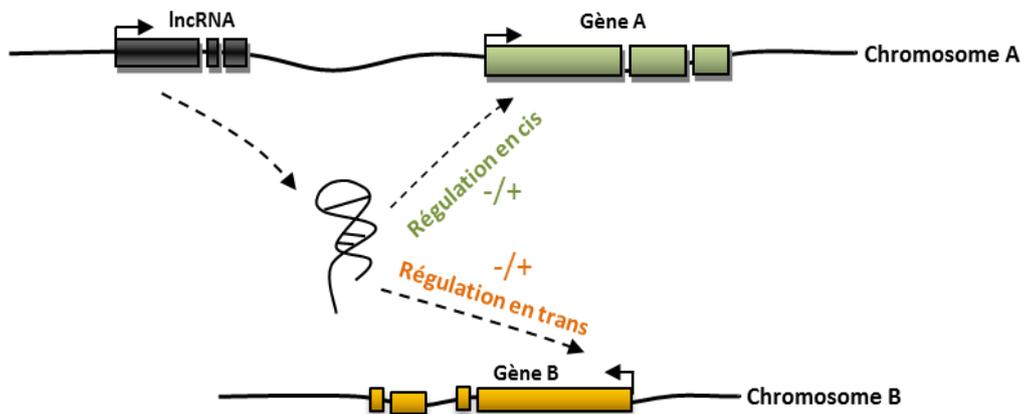


Figure 1.14. Représentation schématique des régulations transcriptionnelles en cis et en trans. La régulation transcriptionnelle par les lncRNA pourrait fonctionner localement (en cis) sur les gènes voisins ou à distance (en trans) sur les gènes lointains. Les lncARN peuvent contrôler négativement ou positivement l'expression des gènes (+/-). D'après (Mathieu et al., 2014).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Comme discuté ci-dessus, les lncARN sont impliqués dans une variété de fonctions biologiques. Leurs modes d'action sont divers et en distingue au moins quatre. Ils peuvent agir sous la forme d'un signal, représenter un leurre moléculaire, participer à des échafaudages moléculaires ou constituer des guides moléculaires (Figure 1.15).

1.3.2.3.1. Signal

Les lncARN montrent une expression très spécifique et répondent à divers stimuli pour réguler la transcription. Ainsi, ils peuvent servir de signaux moléculaires car ils intègrent des informations cellulaires spatio-temporelles. Par exemple, *linc-P21* et *Tug1* sont transcriptionnellement activés en réponse aux dommages de l'ADN par la liaison directe de la protéine suppressive de tumeur p53 à leurs promoteurs (Guttman et al., 2009; Huarte et al., 2010; Khalil et al., 2009).

1.3.2.3.2. Leurre

L'un des principaux moyens par lequel les lncARN régulent la transcription, c'est d'agir comme un leurre moléculaire, en se liant à et en séquestrant d'autres ARN ou protéines (ex : facteurs de transcription, modulateurs de la chromatine), sans exercer aucune fonction supplémentaire (Hu et al., 2012). Par exemple le lncARN *GAS5* (growth arrest-specific 5) se lie au récepteur des glucocorticoïdes (GR) et réprime les gènes activés par ces derniers (Kino et al., 2010; Schonrock et al., 2012), et le lncARN *PANDA* (P21 associated ncARN DNA damage activated), activé par *p53*, s'associe au facteur de transcription NF- κ B pour supprimer sa fonction pro-apoptotique lors d'une réponse aux dommages de l'ADN (Hung et al., 2011; Moran et al., 2012; Puvvula et al., 2014; Rinn and Chang, 2012).

1.3.2.3.3. Echafaudage

Les lncARN peuvent servir de plateforme pour rassembler plusieurs protéines et former des complexes ribonucléoprotéiques (lncARN-RNP), souvent de courte durée de vie, et qui peuvent cibler des sites génomiques spécifiques pour réguler l'expression des gènes. Dans d'autres cas, ce type de lncARN joue un rôle structurel en stabilisant la structure nucléaire ou les complexes de signalisation (Baker, 2011; Li et al., 2015b). Par exemple, *KCNQ1OT1* se lie à la fois avec PRC2 et la G9A méthyltransférase (également connu sous le nom EHMT2) entraînant un enrichissement des modifications d'histones répressives

Chapitre 1. Revue de la littérature

H3K27me3 et H3K9me3, ce qui conduit à la désactivation épigénétique des gènes (Pandey et al., 2008). Tandis que *ANRIL* interagit avec les composants de PRC1 et PRC2 pour réprimer l'expression des gènes voisins *CDKN2A* et *CDKN2B* (Geisler and Coller, 2013; Yap et al., 2010).

1.3.2.3.4. Guide

Les lncARN peuvent jouer le rôle d'un guide moléculaire en localisant en particulier des complexes ribonucléoprotéiques à des cibles spécifiques pour réguler l'expression des gènes, soit en cis ou en trans (Hrdlickova et al., 2014). L'archétype de cette classe est le lncARN *XIST*, qui guide PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) à l'un des deux chromosomes X en cis, conduisant à son inactivation (Brockdorff, 2013; Jing et al., 2008). Deux autres exemples de lncARN fonctionnant comme des guides en cis sont *AIR* et *HOTTIP* (Maruyama and Suzuki, 2012).

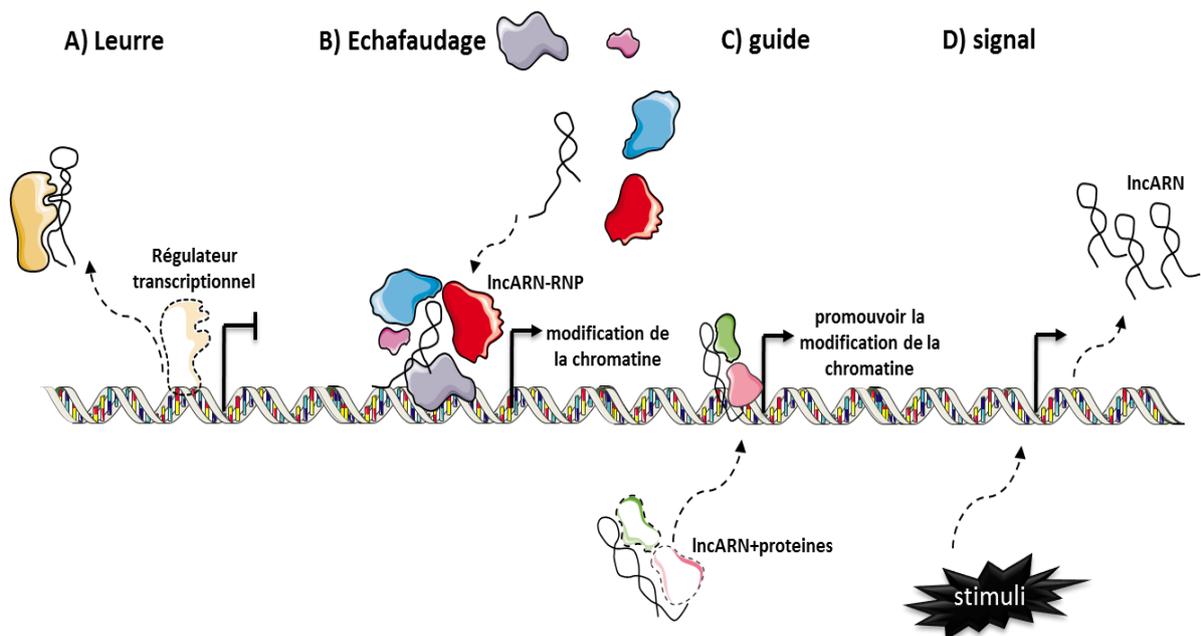


Figure 1.15. Mécanismes d'action des lncARN. A) Leurres : ils se lient aux protéines en les détournant de la chromatine, agissant comme une « éponge moléculaire ». B) Échafaudages : ils fournissent une plateforme pour assembler différentes molécules effectrices afin qu'elles fonctionnent ensemble. C) Guide : ils guident des protéiques vers leurs gènes cibles afin de réguler leur expression. D) Signal : ils fonctionnent comme des signaux moléculaires pour indiquer la régulation des gènes dans l'espace et dans le temps. La figure a été créée à l'aide d'images adaptées de Servier Medical Art by Servier (disponible à l'adresse <http://smart.servier.com/>).

1.3.2.4. Les lncARN dans le système immunitaire

La régulation précise et dynamique de l'expression des gènes est une caractéristique clé de l'immunité. Au cours des dernières années, les progrès rapides de l'analyse du profil du transcriptome ont conduit à reconnaître les lncARN comme des régulateurs clés dans le système immunitaire, ils sont largement exprimés dans les cellules immunitaires, notamment les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles, les cellules T et les cellules B au cours de leur développement, différenciation et activation.

1.3.2.4.1. Rôles des lncARN dans le système immunitaire inné

La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense contre les maladies infectieuses, en induisant les réponses inflammatoires, les voies antimicrobiennes et l'immunité adaptative. Des études récentes indiquent que les lncARN jouent des rôles fonctionnels importants dans les cellules immunitaires innées (Elling et al., 2016). Elles rapportent, entre autres, la découverte de *lincRNA-Cox2*, *Lethe*, *NEAT1*, *THRIL* et *Lnc-DC* qui représentent des exemples de lncARN impliqués dans le contrôle de l'expression génique dans les cellules immunitaires innées (Tableau 1.3).

Tableau 1.3. Rôles des lncARN dans le système immunitaire inné.

Gène	Fonction	Mécanisme d'action	Références
<i>LincRNA-Cox2</i>	Régule la signalisation inflammatoire	Interaction lincRNA-Cox2 et hnRNP (A/B et A2/B1)	(Atianand and Fitzgerald, 2014; Carpenter et al., 2013; Fitzgerald and Caffrey, 2014; Guttman et al., 2009; Heward and Lindsay, 2014)
<i>Lethe/Rps1 5a-ps4</i>	Contrôle le programme transcriptionnel inflammatoire	Interaction lethe et NF-kB	(Akman and Bensen, 2014; Elling et al., 2016; Gupta et al., 2014; Heward and Lindsay, 2014; Milligan and Lipovich, 2014; Rapicavoli et al., 2013; Satpathy and Chang, 2015; Sun and Kraus, 2014)
<i>NEAT1</i>	Facilite l'expression des cytokines antivirales	Relocalisation de SFPQ au niveau du promoteur IL8	(Imamura et al., 2014; Sun and Kraus, 2014)
<i>THRIL</i>	Contrôle l'expression de TNF α dans la lignée monocyttaire humaine THP-1	Formation d'un complexe RNA-protéine avec hnRNPL	(Heward and Lindsay, 2014; Li et al., 2014; Satpathy and Chang, 2015)
<i>Lnc-DC</i>	Responsable de la différenciation et le bon fonctionnement des cDC	Cible de façon directe le facteur de transcription STAT3	(Heward and Lindsay, 2014; Huang, 2014; Laouar et al., 2003; Onai et al., 2006; Wang et al., 2014)

1.3.2.4.1.1. *LincRNA-Cox2*

Il est situé en aval du gène de la synthase prostaglandine-endoperoxyde 2 (PTGS2 / Cox2), et est activé via la signalisation TLR (Toll-like receptors) dans les macrophages. Plusieurs études ont montré que *LincRNA-cox2* active et réprime de façon spécifique la transcription de classes distinctes des gènes de l'immunité (Atianand and Fitzgerald, 2014; Carpenter et al., 2013; Fitzgerald and Caffrey, 2014). Dans les BMDM (macrophages dérivés de moelle osseuse) non stimulée, *LincRNA-Cox2* réprime l'expression de plusieurs gènes, y compris ceux des chimiokines (CCL5 et CX3CL1), des récepteurs de chimiokines (LCDH) et les ISG (Interferon Stimulated Genes) comme l'Irf7, Oas1a, Oas11, Oas2, Ifi204 et Isg15. Cependant, dans les mêmes cellules stimulées par PAM3CSK4, *LincRNA-Cox2* induit l'expression de plusieurs gènes, y compris Tlr1, l'interleukine 6 (IL-6), et Il23a.

Bien que son mécanisme d'action précis soit inconnu, il semblerait que l'action répressive de *LincRNA-Cox2* soit médiée par son interaction avec les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP) A/B et A2/B1 (Figure 1.16). Ces hnRNP sont des membres d'une famille de protéines liant l'ARN qui sont connus pour jouer un rôle dans la maturation de l'ARNm, ainsi que dans la régulation de l'expression génique, mais ils ne sont pas impliqués dans la médiation de la fonction activatrice de ce lncARN, suggérant que des protéines interagissant avec *lincRNA-Cox2* restent à être identifiés (Carpenter et al., 2013).

1.3.2.4.1.2. *Lethe / Rps15a-ps4*

C'est un lncARN pseudogène qui a été identifié dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) traitées avec le TNF α . Il est induit uniquement par les cytokines inflammatoires TNF α et l'interleukine-1 beta (IL-1 β). *Lethe* fonctionne comme un régulateur négatif de la voie de signalisation NF- κ B, il se fixe sur la sous unité RelA (P65), du facteur nucléaire NF- κ B et l'empêche de se lier à l'ADN, inhibant ainsi l'expression de protéines inflammatoires y compris l'interleukine 6 et 8 (IL-6, IL-8), et la superoxyde dismutase 2 (SOD2) (Akman and Bensen, 2014; Elling et al., 2016; Gupta et al., 2014; Milligan and Lipovich, 2014; Rapicavoli et al., 2013; Satpathy and Chang, 2015; Sun and Kraus, 2014) (Figure 1.16). Il joue donc un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée par le contrôle du programme transcriptionnel inflammatoire.

1.3.2.4.1.3. *NEAT1* (nuclear enriched abundant transcript 1)

Il a été démontré que *NEAT1* est surexprimé au cours des infections virales dont il facilite l'expression des cytokines antivirales, telles que l'IL-8. Mécaniquement *NEAT1* se lie au facteur d'épissage proline/glutamine riche (SFPQ), un répresseur de l'expression du gène IL-8, pour promouvoir sa relocalisation depuis le promoteur de l'IL-8 vers les paraspeckles, des corps nucléaires impliqués dans la régulation des gènes, conduisant ainsi à l'activation de la transcription d'IL-8 (Figure 1.16) (Elling et al., 2016; Imamura et al., 2014).

1.3.2.4.1.4. *THRIL* (TNF α and hnRNPL related immunoregulatory LincRNA)

Il est situé en aval du gène codant pour la protéine de liaison BRI3 (BRI3bp) et transcrit à partir du brin opposé. *THRIL* contrôle l'expression de TNF α dans la lignée monocyttaire humaine THP-1. Basé sur les résultats de Li et al., il a été démontré que *THRIL* fonctionne grâce à la formation d'un complexe ARN-protéine avec hnRNPL (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L), une protéine impliquée dans la réponse au stress, le complexe résultant se fixe sur le promoteur TNF α et stimule la transcription (Figure 1.16) (Heward and Lindsay, 2014; Li et al., 2014; Satpathy and Chang, 2015).

1.3.2.4.1.5. *Lnc-DC*

Il est exprimé exclusivement dans les cellules dendritiques conventionnelles humaines (cDC) et serait responsable de leur différenciation et leur bon fonctionnement. *Lnc-DC* est situé dans le cytoplasme, où il cible de façon directe le facteur de transcription STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), nécessaire durant la différenciation des cellules dendritiques par la voie de signalisation Flt3L (fms-like tyrosine kinase-3 ligand)(Laouar et al., 2003; Wang et al., 2014). En se liant à l'extrémité C terminale de STAT3, *Lnc-DC* empêche la liaison de STAT3 à son inhibiteur SHP1, et il le maintient dans sa forme phosphorylé active (Figure 1.16) (Heward and Lindsay, 2014; Wang et al., 2014).

Chapitre 1. Revue de la littérature

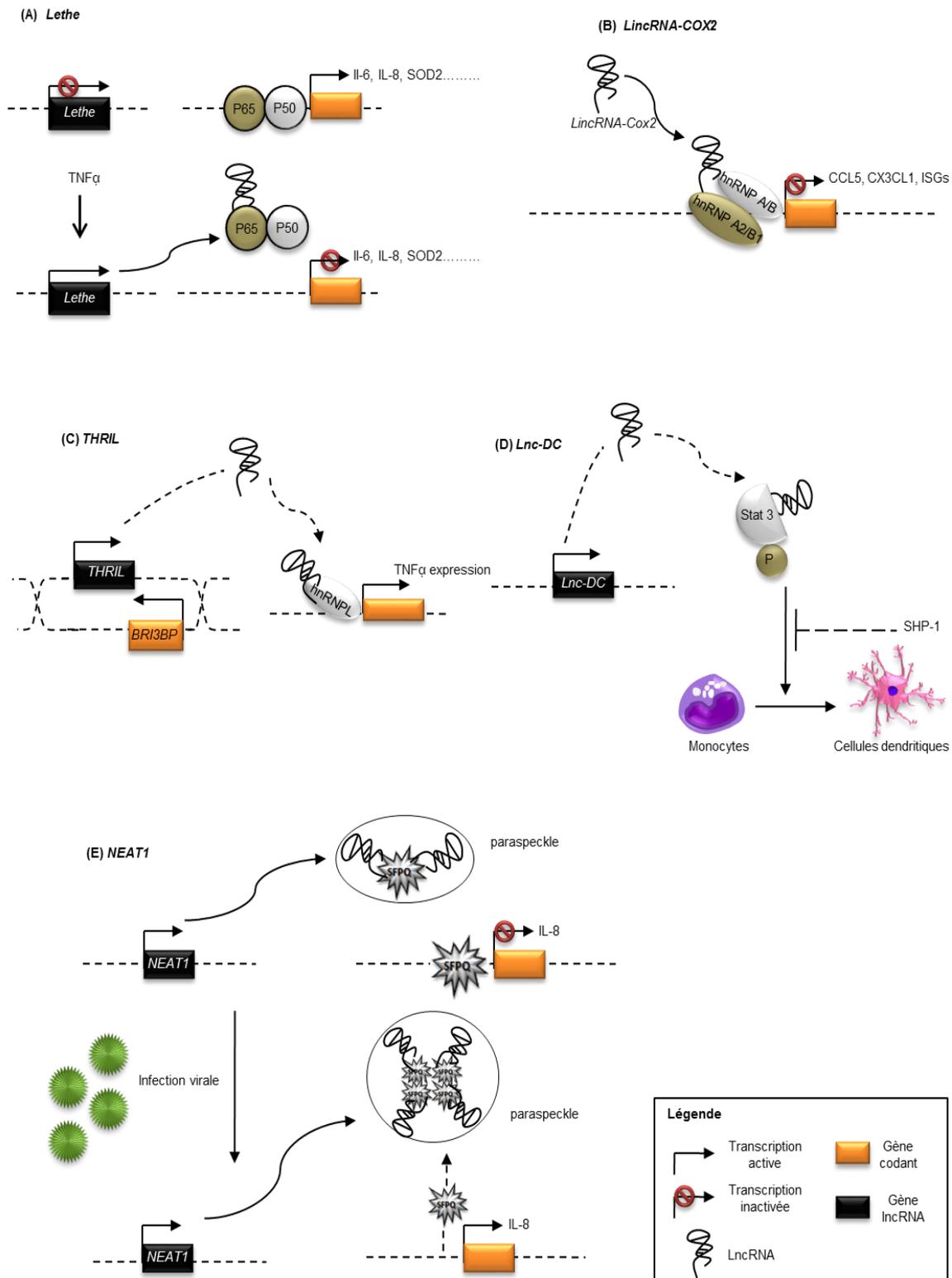


Figure 1.16. Les lincARN dans le système immunitaire inné. (A) *Lethe* se fixe sur la sous unité RelA (P65), du facteur nucléaire NF- κ B et l'empêche de se lier aux éléments de réponse au NF- κ B. (B) *LincRNA-COX2* active et réprime de façon spécifique la transcription de classes distinctes des gènes inflammatoires par son interaction avec les hnRNP A / B et hnRNP A2 / B1. (C) *THRIL* contrôle l'expression de TNF α dans

Chapitre 1. Revue de la littérature

la lignée monocytaire humaine THP-1, par la formation d'un complexe ARN-protéine avec hnRNPL sur le promoteur TNF α . **D)** *Lnc-DC* il est exprimé exclusivement dans les cellules dendritiques humaines et responsable de leur différenciation et leur bon fonctionnement. Il se fixe sur STAT3 et empêche sa liaison avec son inhibiteur SHP-1. **(E)** *NEAT1* est surexprimé au cours des infections virales dont il facilite l'expression des cytokines antivirales, telles que l'IL-8. Il se fixe sur le facteur d'épissage SFPQ, un répresseur de l'expression du gène IL-8 pour promouvoir sa relocalisation depuis le promoteur de l'IL-8 vers les paraspeckles, conduisant ainsi à l'activation de la transcription d'IL-8. D'après (Heward and Lindsay, 2014).

1.3.2.4.2. Les lncARN dans les lymphocytes T

Les lymphocyte T jouent un rôle central dans la régulation du système immunitaire, une partie de cette fonction est remplie par les lncARN. Dans le thymus, chaque étape de différenciation des cellules T est caractérisée par un modèle unique d'expression de lncARN spécifiques qui n'est pas exprimés aux autres stades, ainsi, ils ne sont pas exprimés, ou sont très faiblement exprimés dans les tissus non lymphoïdes. Remarquablement, il a été démontré que les lncARN récemment découvert, régulent l'expression de gènes codants voisins. De plus, plusieurs des lncARN identifiés sont associées à des gènes codants qui exercent des rôles fonctionnels clés dans les cellules T.

l'identification et la caractérisation des lncARN et de leurs gènes cibles qui sont impliqués dans la régulation des lymphocytes T est importante pour le développement de nouveaux traitements pour les maladies auto-immunes, les greffes d'organes, les allergies, et le cancer (Aune et al., 2016; Pagani et al., 2013). Le Tableau 1.4 résume quelques exemples des lncARN impliqués dans le fonctionnement des cellules T.

Tableau 1.4. La liste des lncARN impliqués dans le fonctionnement des cellules T.

lncARN	Cible	Fonction	Références
<i>NRON</i>	NFAT	Régule négativement l'activité du facteur de transcription NFAT	(Elling et al., 2016; Willingham et al., 2005)
<i>TMEVPG1/N</i> <i>eST</i>	IFN- γ	Régule la différenciation Th1	(Collier et al., 2012; Gomez et al., 2013; Vigneau et al., 2003)
<i>LincR-Ccr2-</i> <i>5'AS</i>	Les chimiokines Th2	Contrôle l'expression des gènes liés à la réponse Th2	(Hu et al., 2013)

Chapitre 1. Revue de la littérature

<i>MAF-4 (linc-MAF-4)</i>	MAF	Impliqué dans la différenciation du lymphocyte T en Th1	(Aune et al., 2016; Ranzani et al., 2015)
<i>Th2LCRR</i>	Les chimiokines Th2	Régule la polarisation des cellules Th2	(Aune et al., 2016; Spurlock et al., 2015)
<i>GATA3-AS1</i>	?	?	(Aune et al., 2016; Walsh et al., 2013)
<i>LincRNA-p21</i>	NF-κB	Régulateur négatif de l'activité de NF-κB	(Aune et al., 2016; Spurlock et al., 2014)
<i>GAS5</i>	Récepteur de glucocorticoïde	Impliqué dans l'arrêt de croissance	(Mourtada-Maarabouni et al., 2008; Williams et al., 2011)

1.3.2.4.2.1. *NRON* (non coding repressor of NFAT)

Il régule négativement le facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cells), qui contrôle la production d'IL-2 dans les cellules T activées. *NRON* inhibe NFAT soit par l'interaction avec la karyophérineimportin-b1 (KPNB1), un facteur de transport nucléaire, et bloque le transport nucléo-cytoplasmique et donc l'activité transcriptionnelle de NFAT, soit par la séquestration de la forme inactive de NFAT dans le cytosol (Figure 1.17) (Elling et al., 2016; Willingham et al., 2005).

1.3.2.4.2.2. *TMEVPG1/NeST* (nettoie *Salmonella* pas Theiler's)

Initialement décrit comme étant impliqués dans la régulation d'expression de l'IFN-γ et le contrôle de la charge virale pendant l'infection persistante par le virus de Theiler (Vigneau et al., 2003). Il est transcrit à partir d'un gène positionné chez l'homme à côté du locus *IFNG* situé sur le chromosome 12, et sa transcription dépend des facteurs de transcription Stat4 et T-bet, qui influencent également la transcription de IFN-γ dans les cellules CD4 + Th1 (Collier et al., 2012). *NeST* agit en cis comme un activateur de la transcription afin d'augmenter l'expression de IFN-γ dans des cellules Th1 ainsi que les cellules cytotoxiques T CD8 +. Il se lie à WDR5 (WD repeat-containing protein 5), une sous-unité de base de l'ensemble de méthyltransférase MLLH3K4, conduisant à la méthylation des histones au niveau du locus *IFNG* et son expression (Figure 1.17). Par conséquent, *NeST* module les réponses immunitaires adaptatives à des agents pathogènes, y compris le virus de Theiler et *Salmonella enterica* dans les modèles de souris transgéniques (Gomez

Chapitre 1. Revue de la littérature

et al., 2013). Ce qui suggère qu'il pourrait être utilisée en tant que cible pour réduire l'importance relative de la production de *IFN- γ* par le système immunitaire inné ou adaptatif dans des processus pathologiques, y compris l'auto-immunité (Pollard et al., 2013).

1.3.2.4.2.3. *LincR-Ccr2-5'AS*

Dans les cellules Th2, la répression de *LincR-Ccr2-5'AS* régule négativement les gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la division nucléaire et conduit également à une diminution de l'expression des gènes voisins codants pour les chimiokines Th2 (CCR1, CCR2, CCR3 et CCR5). Ces chimiokines facilitent la migration des cellules Th2 dans les tissus pulmonaires, tandis qu'elle régule positivement l'expression des gènes impliqués dans l'immunité et la défense, ce qui suggère que *LincR-Ccr2-5'AS* est capable de moduler l'expression des gènes agissant en cis et en trans. Bien que son mécanisme d'action soit actuellement inconnu (Figure 1.17), Hu, G et al. suggère que *LincR-Ccr2-5'AS* régule l'expression de gènes *Ccr* via un/des mécanisme(s) distinct(s) de la modulation de l'accessibilité de la chromatine ou bien le recrutement de Pol II; il pourrait donc réguler l'expression de ses gènes cibles après l'initiation de la transcription (Hu et al., 2013).

1.3.2.4.2.4. *Linc-MAF-4*

Linc-MAF-4 est un autre lncARN impliqué dans la différenciation des lymphocytes T dans la lignée Th1. *Linc-MAF-4* réprime l'expression du gène MAF qui régule positivement l'expression des gènes codant pour les cytokines Th2, favorisant ainsi le programme de différenciation Th1. Les gènes *Linc-MAF-4* et MAF sont proches l'un de l'autre (~100 kb) dans le chromosome humain 16 et les deux gènes sont transcrits à partir du même brin d'ADN. *Linc-MAF-4* s'associe à des modificateurs de la chromatine, tels que LSD1 et EZH2, pour faciliter la triméthylation des marqueurs de l'histone H3K27 dans le promoteur du gène MAF, en formant une boucle dans la chromatine et, ainsi, en atténuant son expression dans les cellules Th1 (Aune et al., 2016; Ranzani et al., 2015).

1.3.2.4.2.5. *Th2LCRR*

Il a été identifié à partir d'études examinant l'expression des lncARN au cours de la différenciation des lymphocytes Th1, Th2 et Th17. Les lymphocytes Th2 expriment sélectivement ce lncARN, il est co-exprimé avec les cytokines caractérisant la polarisation

Chapitre 1. Revue de la littérature

Th2 : IL-4, IL-5, IL-13 et transcrit comme antisens du gène RAD50. Comme d'autres lncARN activateurs, *Th2LCRR* se lie au composant WDR5 du complexe histone H3K4 méthyltransférase pour maintenir les marqueurs épigénétiques dans les promoteurs des interleukines IL-4, IL-13 et IL-15 et ainsi réguler la polarisation des cellules T (Aune et al., 2016; Spurlock et al., 2015).

1.3.2.4.2.6. *GATA3-AS1*

Le lncARN divergent *GATA3-AS1*, est également exprimé sélectivement par les lymphocytes Th2. La fonction exacte de *GATA3-AS1* est toujours inconnu, mais il a été démontré qu'il est surexprimé par lymphocytes TCD4+ provenant d'individus allergiques en réponse à des allergènes. De plus, l'identification de SNPs (Single nucleotide polymorphisms) autour du gène *GATA3-AS1*, est associée à un mauvais pronostic pour certaines formes de cancers, y compris certaines formes de cancer du sein et de leucémie lymphoblastique aiguë des enfants, ce qui suggère que *GATA3-AS1* pourrait influencer positivement ou négativement diverses maladies humaines (Aune et al., 2016; Walsh et al., 2013).

1.3.2.4.2.7. *LincRNA-p21*

LincRNA-p21 a été d'abord décrit en tant que régulateur critique de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN induits par le gène suppresseur de tumeurs p53. Il est également connu que ce lincARN est très faiblement exprimé dans les maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR) et la coronaropathie, qui dépendent des cellules T (Aune et al., 2016). Récemment, il a été découvert que *LincRNA-p21* régule négativement l'expression de NF-κB chez les patients atteints de PR (Spurlock et al., 2014).

1.3.2.4.2.8. *GAS5 (growth arrest specific 5)*

Il a été isolé la première fois lors de la recherche des nouveaux gènes impliqués dans l'arrêt de croissance (Schneider et al., 1988). Il a été initialement identifié comme un gène de susceptibilité dans le développement de la maladie auto-immune SLE (lupus érythémateux systémique) dans un modèle murin (Haywood et al., 2006). Des études récentes ont montré que *GAS5* est impliqué dans la biologie des lymphocytes T, au sein desquels il joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'arrêt de croissance, l'apoptose et le cycle cellulaire à la fois dans la ligne de cellules T leucémiques humaines et des cellules T

Chapitre 1. Revue de la littérature

du sang périphérique humain (Mourtada-Maarabouni et al., 2008; Turner et al., 2014; Williams et al., 2011). *GAS5* se fixe au domaine de liaison à l'ADN du récepteur des glucocorticoïdes (GR). Par conséquent, l'induction médiée par les glucocorticoïdes de plusieurs gènes de réponse est supprimée, incluant celle de l'inhibiteur de l'apoptose cellulaire 2 (*cIAP2*) (Figure 1.17) (Garitano-Trojaola et al., 2013; Kino et al., 2010).

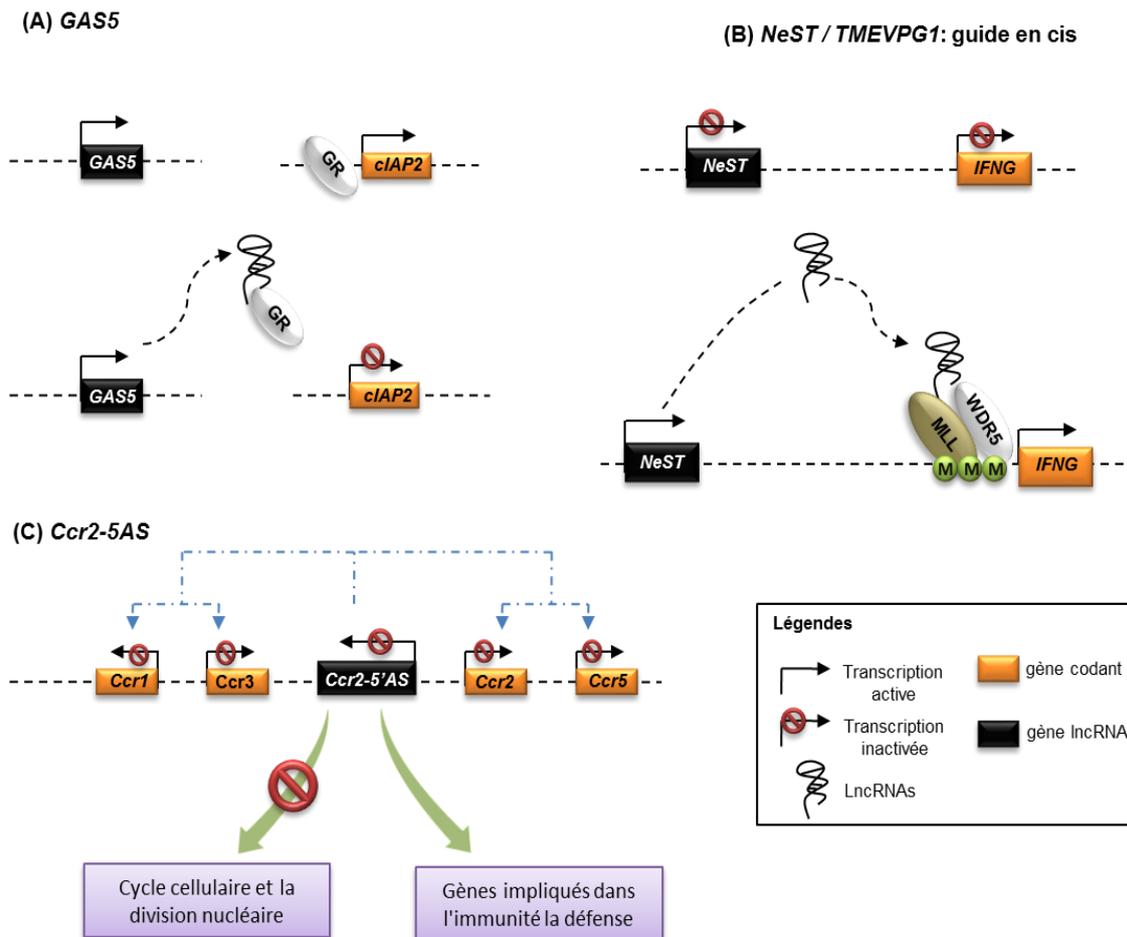


Figure 1.17. Rôles des lncARN dans le fonctionnement des cellules T. **A)** *Gas5* inhibe l'association de glucocorticoïde (GR) avec le gène *cIAP2* et réprime sa transcription. **B)** *NeST* active l'expression de IFNG dans les cellules Th1 ainsi que dans les cellules cytotoxiques T CD8+. Il se fixe sur la méthyltransférase WDR5, conduisant à la méthylation des histones au niveau du locus IFNG et son expression. **C)** *Ccr2-5'AS* est transcrit dans la direction opposée de la chimiokine CCR2. Il régule négativement l'expression des gènes impliqués dans l'immunité et de la défense, tandis qu'il régule positivement l'expression des gènes voisins codants pour les chimiokines TH2 (CCR1, CCR2, CCR3 et CCR5), ces chimiokines facilitent la migration des cellules Th2 dans les tissus pulmonaires, et les gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la division nucléaire, ce qui suggère que LinCR-Ccr2-5'AS est capable de moduler l'expression des gènes agissant en cis et en trans.

1.4. L'édition du génome par le système CRISPR-Cas9

La modification génétique est une approche essentielle pour étudier la fonction des gènes. Dans les années 2010, les technologies d'édition de gènes telles que les ZFNs (nucléases à doigts de zinc), et TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), offrent la possibilité de couper la séquence d'ADN exactement à l'endroit choisi, permettant ainsi l'inactivation des gènes cibles et l'intégration d'un transgène. Malgré l'efficacité de ces outils, ils restaient encore des progrès à faire, concernant la complexité de leur élaboration et de leur coût élevé. En 2012, une avancée décisive a eu lieu avec le développement de l'outil révolutionnaire CRISPR-Cas9. Cet outil est beaucoup moins coûteux, plus simple en termes de conception et d'utilisation. Il a considérablement accéléré le développement de la manipulation du génome humain et constitue une avancée majeure pouvant offrir des avantages considérables dans le domaine de la santé.

1.4.1. La découverte de CRISPR

La structure du génome n'est pas stable au cours de la vie de l'organisme, la résistance et l'adaptation à de nouvelles situations (parfois extrême) nécessite un certain niveau de variation génétique au fil des générations. L'étude et la compréhension des stratégies d'adaptation et ces mécanismes ont conduit à découvrir l'outil moléculaire, CRISPR-Cas9, acronyme de CRISPR (clustered regularly-interspaced, short palindromic repeats) -Cas9 (CRISPR-associated protein 9), qui permet aux scientifiques de couper *in vivo* ou *in vitro* la séquence nucléique que l'on souhaite « ciseaux moléculaires » et donc d'éditer les gènes de toutes les espèces vivantes. L'histoire commence en 1989 à l'Université d'Alicante, où le bactériologiste espagnol Francis MOJICA et ces collègues s'intéressent à l'archaea halophile *Haloferox Mediterranei*, isolée des marais de Santa Pola, situé sur la Costa Bianca espagnole (Rodriguez-Valera et al., 1983). Ils découvrent que la concentration en sel du milieu de croissance semblait influencer sur la manière dont les enzymes de restriction coupaient le génome de microbe. En examinant les fragments découpés, ils ont trouvé une structure curieuse composée de plusieurs copies de séquences répétées de 29 nucléotides (repeats), espacées de 32 nucléotides (spacers) sans comprendre son utilité. Ils ne tardèrent pas à découvrir d'autres structures similaires chez une espèce très proche *H. volcanii*, ainsi que chez des archées halophiles. À travers la littérature scientifique, ils découvrent l'article d'un groupe japonais (Ishino et al., 1987), qui ont cloné accidentellement une partie décrite comme de séquences d'ADN répétées atypiques de

Chapitre 1. Revue de la littérature

fonction inconnue avec le gène « *iap* », la cible réelle de leurs expériences dans le génome de la bactérie *Escherichia coli* (Mojica et al., 2000). En 2002, l'équipe de MOJICA collaborent avec Ruud JANSEN et ces collègues qui faisaient également des recherches sur ces structures répétées pour baptiser CRISPR, acronyme universel pour désigner ces séquences répétées que l'on ne comprenne pas encore son fonctionnement (Jansen et al., 2002).

D'autres travaux de JANSEN et ses collaborateurs révèlent que les séquences CRISPR sont souvent trouvées proche d'un ensemble de gènes homologues hautement conservés retrouvés seulement si les séquences CRISPR sont présentes et qui codent pour des protéines avec une structure similaire à celle des enzymes interagissant avec l'ADN, indiquant une relation fonctionnelle entre les deux. Ces gènes sont appelés les gènes Cas (pour système CRISPR associé) (Makarova et al., 2002). En août 2003, MOJICA tourne son attention vers les séquences spaceurs et remarque qu'une séquence spacer chez une souche d'*Escherichia coli* présente une grande similarité à celle d'un bactériophage (phage P1) qui infecte de nombreuses souches de *E. coli*, et que la souche particulière portant la séquence spacer était résistante à l'infection par le phage P1. Après plusieurs vérifications, il s'est rendu compte que les fragments d'ADN qui séparent ces courtes répétitions ne correspondent pas à de l'ADN bactérien mais plutôt à des séquences de bactériophages, et que ce qu'il étudie est le système immunitaire adaptatif chez les bactéries qui intègrent dans leur génome de l'ADN des bactériophages pour les repérer plus facilement et d'effectuer lors d'un deuxième contact de ces mêmes acides nucléiques étrangers, des attaques préventives en coupant l'ADN des bactériophages (Mojica et al., 2005). En 2012, la française Emmanuelle CHARPENTIER et l'américaine Jennifer DOUDNA publient un article dans la revue Science, qui décrit le mécanisme précis par lequel le virus est éliminé, impliquant la nucléase Cas9 (pour CRISPR-associated protein 9) et des petits ARN guides, synthétisés à partir des séquences CRISPR, pour reconnaître et couper la séquence virale à l'endroit souhaité. Ainsi, elles ont montré que ce système peut être manipulé pour être dirigé sur une séquence génomique cible prédéterminée en laboratoire (Jinek et al., 2012). Quelques mois plus tard plusieurs équipes démontrent que l'outil proposé fonctionne sur des cellules en culture et sur un très grand nombre d'espèces végétales et animales sans jamais montrer la moindre faiblesse (Cho et al., 2013; Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). De plus, il s'avérait que cette technique est plus efficace, plus précise et moins coûteuse en termes de temps et d'argent que les autres

procédés. Depuis les publications sur le sujet ont augmentés de manière exponentielle (Figure 1.18).

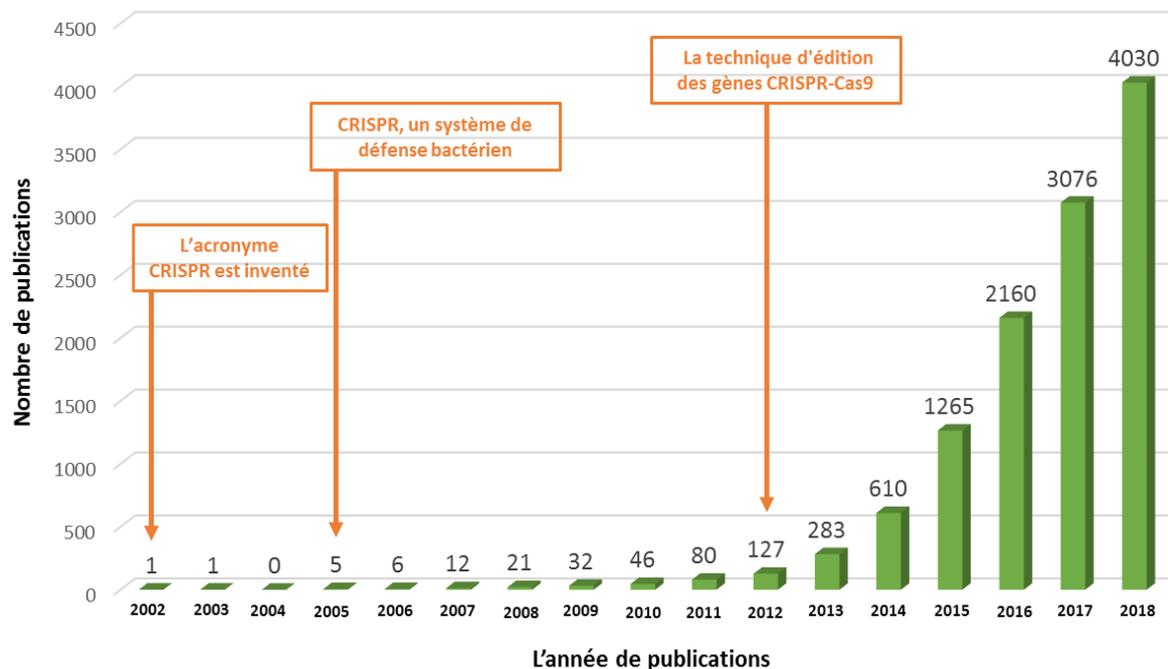


Figure 1.18. Le nombre de publications liées au CRISPR au cours des dernières années sur pubmed; mot-clé " CRISPR ". Depuis 2012, le nombre de publication contenant le mot clef CRISPR décolla, et encore aujourd'hui l'intérêt de cet outil exceptionnel pour les scientifiques ne cesse de croître.

1.4.2. CRISPR-Cas9 : principes généraux

Le processus de défense par le système CRISPR-Cas peut être divisé en trois étapes (Figure 1.19). La première étape, l'adaptation (aussi appelée d'acquisition), conduit à l'insertion de nouvelles séquences espaceurs (spacers) d'ADN envahissant dans le locus CRISPR, qui servent comme éléments de mémoire des génomes des virus et des plasmides rencontrés. La spécificité du ciblage de l'ADN envahisseur (protospacer), repose notamment sur la reconnaissance de courtes séquences de quelques nucléotides qui diffèrent entre les sous types de CRISPR-Cas, appelée protospacer adjacent motif (PAM), et sont insérés dans le locus CRISPR par le complexe Cas1-Cas2, qui représentent les protéines Cas les plus hautement conservées entre les différents types CRISPR (Arslan et al., 2014; Nuñez et al., 2015). Dans la seconde étape, l'expression, les locus sont transcrits, et génèrent en premier lieu un long transcrit (le pre-crARN), qui est ensuite découpé afin

Chapitre 1. Revue de la littérature

d'obtenir des petits ARN CRISPR (crARN) utilisés pour guider les endonucléases effectrices qui ciblent l'ADN envahissant. Dans la troisième et dernière étape, l'interférence, l'acide nucléique cible est reconnu et détruit par l'action combinée des crARN et des protéines Cas. Dans le système CRISPR de type II, le crARN forme un complexe actif avec l'ARN CRISPR trans-activant (tracrARN) et la nucléase Cas9 associée, qui permet de réaliser une coupure ciblée sur l'ADN (Ratner et al., 2016).

Trois types de systèmes CRISPR bactériens distincts ont été identifiés. Dans lequel, le système de type II (chez *Streptococcus pyogenes*) est le plus étudié et constitue la base des technologies d'ingénierie du génome disponibles (Makarova et al., 2011).

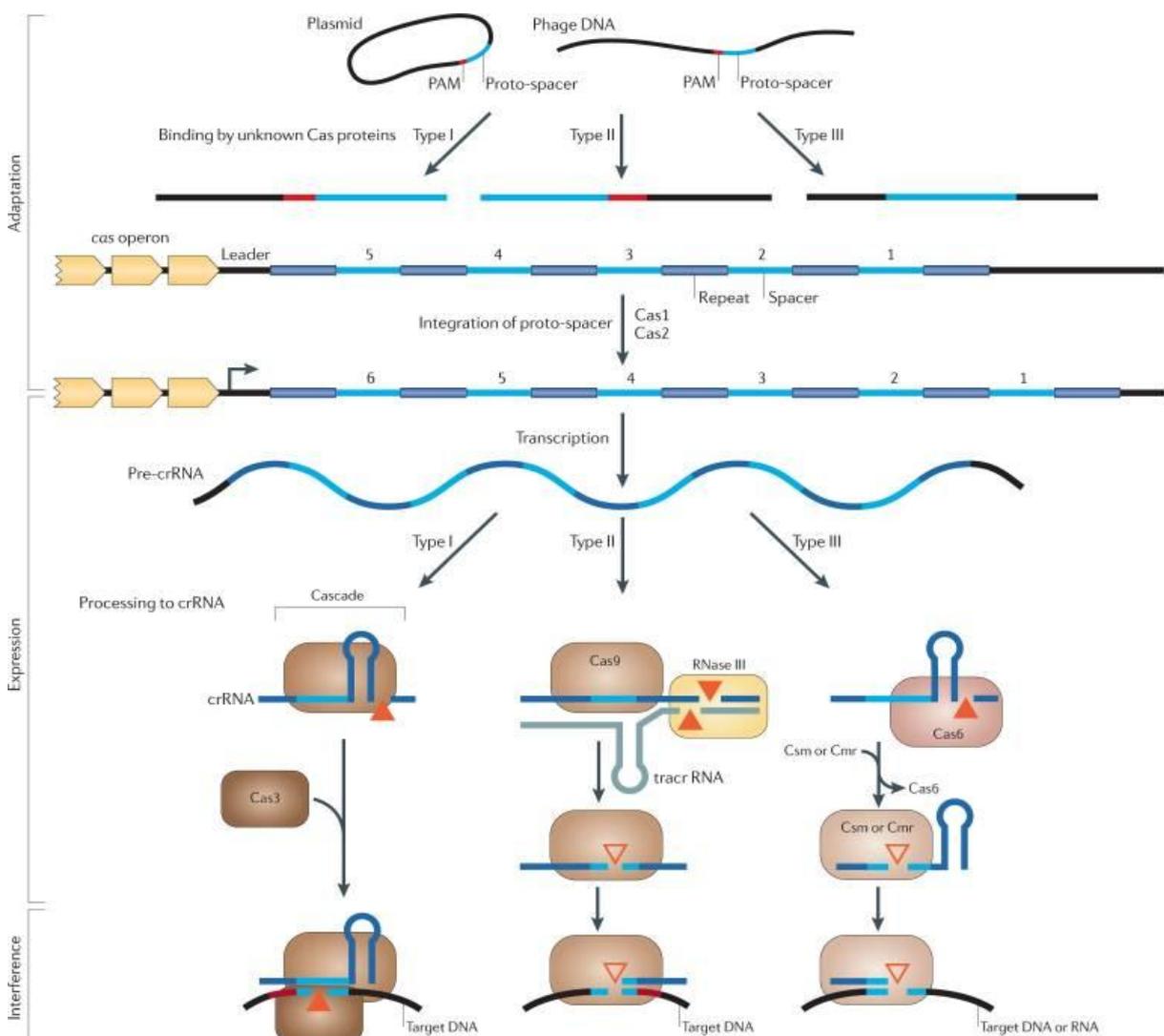


Figure 1.19. Les 3 étapes du système immunitaire adaptatif CRISPR-Cas. Les types I et III partagent plusieurs caractéristiques : les pré-crARNs sont transformés en crARNs par des endonucléases Cas spécialisées. Les crARNs matures s'assemblent en un large complexe comprenant de multiples protéines

Chapitre 1. Revue de la littérature

Cas, capable de reconnaître et de cliver les séquences d'acides nucléiques complémentaires aux crARNs. La transformation des pré-crARNs dans les systèmes de type II fait intervenir des ARNs transactivateurs (tracrARNs) complémentaires des séquences répétées présentes dans les pré-crARNs. L'hybridation des tracrARNs avec les pré-crARNs déclenche la maturation de ces derniers par action de la RNaseIII, en présence de la Cas9. Le complexes crARNs-tracrRNAs mature s'hybride avec la Cas9 pour médier l'interférence. D'après (Makarova et al., 2011).

1.4.3. Crispr-Cas9 : outil de modification des gènes

En 2012, le système CRISPR de type II de *Streptococcus pyogenes* a été adapté par Jinek et ses collègues, pour induire de manière ciblée des cassures double-brin (DSB) dans le génome des organismes eucaryotes (Jinek et al., 2012). Ce système requiert deux composants : la nucléase Cas9 ; et un ARN guide (ARNg), une forme simplifiée du duplex crARN/tracrARN produite *in vitro*, possédant à la fois les caractéristiques de crARN et tracrARN. 20 nucléotides à l'extrémité 5' de l'ARNg (correspondant à la séquence protospacer du crARN; Figure 1.20), dirigent la nucléase Cas9 vers le site d'ADN cible spécifique en utilisant les règles standard d'appariement entre bases complémentaires ARN-ADN. La Cas9 possède deux motifs nucléase, HNH et RuvC, le premier est impliqué dans le clivage du brin complémentaire au crARN tandis que le second clive le brin opposé. Elle se lie en premier à la séquence PAM (correspondant à la forme canonique 5'-NGG), située après la séquence ciblée par l'ARN guide, puis au complexe formé entre l'ARNg et l'ADN. Ainsi, avec ce système, l'activité de la nucléase Cas9 peut être dirigée vers toute séquence d'ADN de la forme « N20-NGG » simplement en modifiant les 20 premiers nucléotides de l'ARNg pour qu'ils correspondent à la séquence d'ADN cible (Sander and Joung, 2014; Tian et al., 2017).

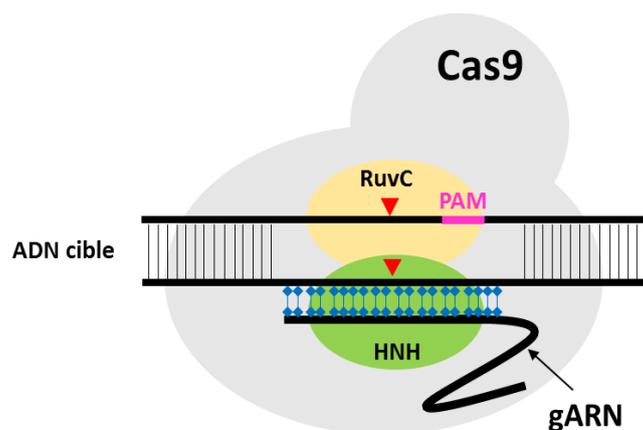


Figure 1.20. Le système CRISPR-Cas9 adapté à l'édition du génome. La protéine Cas9 est représentée en gris. Le guide ARN (gARN), est conçu pour contenir une séquence de 20 nucléotides complémentaires de

Chapitre 1. Revue de la littérature

la séquence ADN cible. L'ADN cible sera coupé au niveau du brin complémentaire au gARN, et du brin opposé par les motifs nucléase de la cas9, HNH (en vert) et RuVC (en orange) respectivement. La présence du motif PAM (en rose) sur le brin d'ADN opposé est indispensable à l'activité enzymatique.

1.4.4. Principe de la modification génique par le système CRISPR-Cas9

L'action de la nucléase Cas9 guidée par l'ARNg aboutit à une coupure double brin de l'ADN génomique (DSB) au niveau d'un site spécifique (Komor et al., 2017). De cette découpe, Deux voies de réparation peuvent se produire: la voie de réparation des extrémités de jonction non homologues (NHEJ), et la voie de réparation homologue dirigée (HDR), en fonction de l'absence ou la présence d'une séquence d'ADN homologue respectivement (Figure 1.21) (Lieber, 2010; McVey and Lee, 2008).

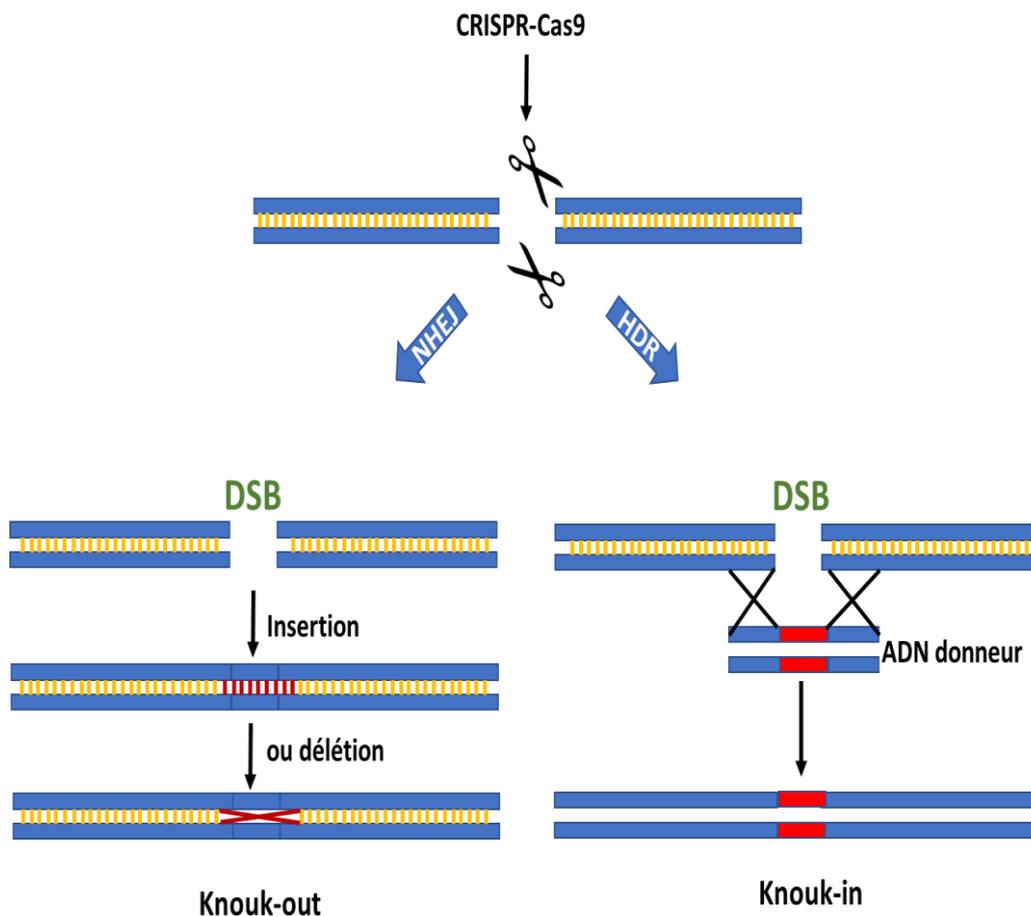


Figure 1.21. Schéma représentant les mécanismes de réparation de l'ADN impliqués dans l'édition du génome par le système CRISPR-Cas9. La réparation de la cassure double-brin par la voie NHEJ peut commettre des erreurs, via la création d'insertions ou de délétions, susceptibles de décaler le cadre de lecture de la séquence cible et l'extinction (knock-out) de l'expression du gène correspondant. La réparation de la cassure double-brin par la voie HDR permet l'insertion, à l'endroit de la cassure double-brin, d'une séquence modèle, par des mécanismes de recombinaison homologue.

Chapitre 1. Revue de la littérature

La voie NHEJ, présente des capacités supérieures et rapide pour la réparation de DSB sujette aux erreurs et conduit souvent à des mutations ponctuelles par des insertions ou des délétions de bases (indels) sur chacun des brins à l'endroit de la coupure. Ces indels sont susceptibles de décaler le cadre de lecture, conduisant ainsi à l'inactivation ou le Knock-Out (KO) du produit du gène cible (Lieber, 2010; McVey and Lee, 2008).

L'ingénierie précise du génome repose toutefois sur la voie de réparation HDR, où un ADN donneur est utilisé pour réparer l'ADN par recombinaison homologue. Ce fragment d'ADN donneur peut être apporté artificiellement sous forme de ssODN (single stranded DNA oligonucléotide), d'oligonucléotide double brin ou d'un plasmide donneur (Hsu et al., 2014). Il doit contenir des séquences de nucléotides homologues (en bleu) à celles qui précèdent et suivent le site de coupure, entre les deux séquences homologues, l'ADN donneur peut contenir toute séquence d'ADN souhaitable qui permet de modifier le site cible (en rouge) (Figure 1.21). Par exemple, introduire un ou plusieurs exons manquants, ou même un gène complet (modification knock-in, ou KI) (Gaj et al., 2013). Il est également important de s'assurer que la d'ADN donneur ne contienne pas une séquence PAM, afin qu'elle ne soit pas à son tour découpée.

1.4.5. Applications du CRISPR-Cas9

L'ingénierie traditionnelle de la technique CRISPR-Cas9, fournit un moyen efficace d'introduire des mutations de perte de fonction sur des sites spécifiques du génome. Au cours des dernières années, le développement des systèmes CRISPR-Cas9 modifiés a permis d'envisager d'autres modes de régulation du génome et d'élargir les applications dans les domaines scientifique et clinique.

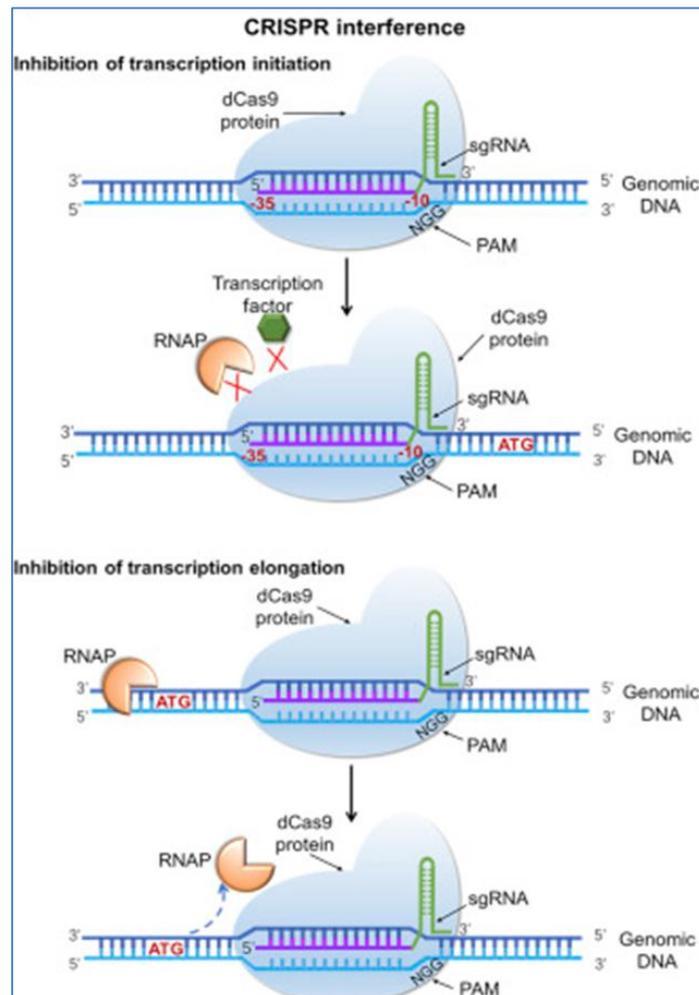
La compréhension des mécanismes d'actions des protéines Cas9 a largement ouvert la voie à d'autres applications potentielles. Par exemple, il a été montré qu'il est possible d'augmenter la probabilité de réparer une coupure par la voie HDR à l'aide de la Cas9 nickase (nCas9), une version modifiée de la protéine Cas9 (Cong et al., 2013). La nCas9 comporte un seul domaine nucléase fonctionnel (HNH ou RUVc), elle pourra donc couper un seul brin au lieu d'une coupure double brin. Ces coupures monobrin sont rapidement réparées par HDR en utilisant le brin complémentaires (Gasiunas et al., 2012).

La Cas9 catalytiquement inactive ou Cas9 désactivée « dCas9 », représente une autre version modifiée de la protéine Cas9, caractérisée par la perte des domaines nucléase

Chapitre 1. Revue de la littérature

(mutations D10A et H840A), et donc qui ne clive pas l'ADN, mais qui peut être recrutée par des ARNg sur des sites d'ADN cibles spécifiques. Cette protéine a été adoptée en tant que plate-forme de liaison à l'ADN pour la modulation de la transcription, l'édition épigénétique, et d'ingénierie en utilisant une variété de domaines effecteurs. Par exemple, le complexe dCas9-gRNA diminue l'expression des gènes en perturbant le processus d'élongation de la transcription, la liaison de l'ARN polymérase ou du facteur de transcription. Les complexes dCas9-VP16 ou dCas9-VP64, favorisent l'activation de l'expression des gènes (Bikard et al., 2013) et le complexe dCas9-KRAB (Krüppel-Associated Box), renforcent la capacité d'inhibition de la transcription (Figure 1.22) (Qi et al., 2013).

-A-



-B-

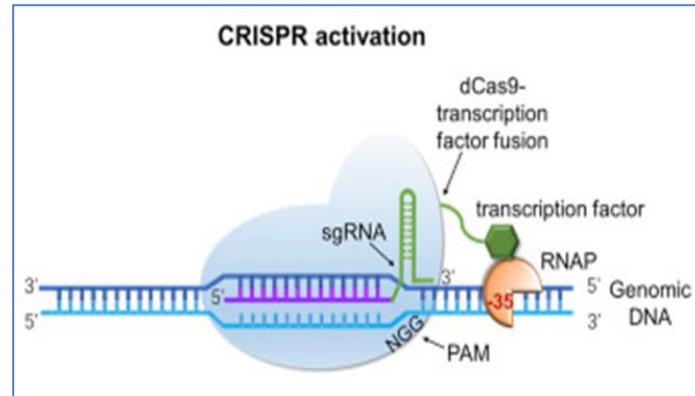


Figure 1.22. Utilisations de la technique CRISPR-Cas9. A) interférence de CRISPR pour l'élimination de gènes. Il existe deux mécanismes pour désactiver les gènes. Dans le premier mécanisme, le complexe dCas9-sgRNA cible le promoteur ou l'enhancer pour bloquer l'ARN polymérase ou les facteurs de transcription, afin d'inhiber l'initiation de la transcription. Dans le deuxième mécanisme, le complexe dCas9-sgRNA cible la séquence du gène ou sa séquence 5'UTR afin d'empêcher l'élongation de la transcription. B) Activation de gène par CRISPR. La dCas9 est fusionnée avec un facteur de transcription, qui agit en amont du site d'initiation de la transcription (TSS) pour réguler positivement l'expression du gène cible. D'après (Tian et al., 2017).

1.5. Problématique et objectifs

Afin de pouvoir analyser les processus de différenciation thymocytaire, il est intéressant de pouvoir disposer de cellules immortalisées (lignées) pouvant être manipulées *in-vitro*. En 1995, Mombaerts et *al.*, ont décrit l'obtention d'une lignée cellulaire après croisement entre souris Knock-Out (KO) pour les gènes *Tp53* et *Rag1* (Mombaerts et al., 1995). Dans ces souris *Tp53*^{-/-}, *Rag1*^{-/-}, la différenciation thymocytaire est bloquée au stade DN3 (effet de l'inactivation du gène *Rag1*) et la délétion de *Tp53* s'accompagne de nombreuses tumeurs. Les auteurs ont obtenu par cette approche une lignée cellulaire immature, bloquée au stade double négatif de différenciation, qu'ils ont nommé P5424.

Par ailleurs, il a été démontré que la stimulation par le Phorbol 12-Myristate 13-Acétate (PMA), un activateur des PKC et la voie de signalisation NFAT et l'ionomycin, un ionophore permettant l'entrée du calcium dans la cellule (Chatila T, 1989; Macia et al., 2002), mime la signalisation par le (pré)-TCR (Figure 1.23) (Del Blanco et al., 2012; Macia et al., 2002). Plus précisément, dans une première étude préliminaire faite dans le laboratoire TAGC à Marseille, ils ont trouvé que le traitement de la lignée P5424 par le PMA/ionomycin induit une activation forte de ces cellules qui s'accompagne de manière remarquable de la régulation positive de marqueur de maturation *TCRα* et la perte de marqueur spécifique de précurseur *Ptcra* (*Pre T-Cell Antigen Receptor Alpha*) (Figure 2.1A).

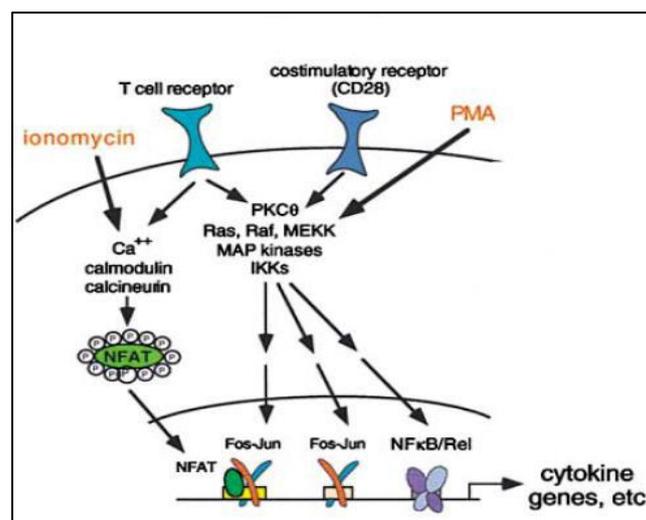


Figure 1.23. L'activation des cellules T via le PMA/ionomycin. La combinaison du PMA/ionomycin induit la signalisation du TCR et active les cellules T via les voies PKC θ et NFAT (Macia et al., 2002).

1.5.1. L'hypothèses

Ce modèle de stimulation cellulaire est un bon système pour l'analyse des mécanismes conduisant au développement des lymphocytes T matures. Nous proposons d'utiliser ce modèle afin d'étudier les lncARN impliqués dans la différenciation et l'activation des lymphocytes T.

1.5.2. Objectifs

Ce projet a pour objectif de comprendre le rôle des lncARN impliqués dans le développement des lymphocytes T par la caractérisation du transcriptome des cellules P5424 stimulées par le PMA/ionomycin.

CHAPITRE 2

Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

2.1.	Matériels et méthodes.....	62
2.2.	Résultats	66
2.3.	Discussion et conclusion.....	86

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Culture cellulaire et la stimulation par PMA/ionomycin

La lignée P5424 est cultivée dans le milieu RPMI-1640 GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, 61870-010), supplémenté par 10% de sérum de veau foetal (Thermo Fisher Scientific, 10270-106). En plaque 6 puits à $3 \cdot 10^5$ cellules/ml, trois (3) réplicats sont stimulés par un traitement au PMA (sigma) : 20 ng/ml et l'ionomycin (sigma) : 0.5 µg/ml pendant 4 heures, et trois (03) réplicats (pour le contrôle) sont traités par le DMSO. Pour l'étude cinétique, nous avons stimulé le même nombre de cellules avec la même concentration de PMA/ionomycin, mais avec des durées différentes (0-30 min-1h-2h-3h-4h) et trois (03) réplicats pour chaque temps.

2.1.2. Tests de prolifération cellulaire et d'apoptose

Les cellules P5424 sont traitées avec du DMSO ou du PMA/ionomycin pendant 4 heures. Par la suite, elles sont lavées et récupérées pendant 24, 48 ou 72 heures. La prolifération cellulaire est analysée avec le compteur de cellules Scepter™ (Millipore). Pour quantifier les cellules apoptotiques, les échantillons sont lavés avec le tampon phosphate salin (PBS), puis colorés avec de l'iodure de propidium (PI) et de l'Annexine-V en utilisant le kit de coloration Annexin-V-FLUOS (11858777001, Roche), suivant les instructions du fabricant. Les cellules colorées à l'annexine-V-FLUOS et au PI sont détectées par cytométrie en flux (FACS) en utilisant un cytomètre LSRII (BD Biosciences). FlowJo 7.6.5 est utilisé pour analyser les données FACS. Le pourcentage de cellules positives pour PI et l'annexine-V est calculé.

2.1.3. L'extraction de l'ARN

L'extraction des ARN totaux est effectuée à l'aide du kit « RNeasy plus mini kit » (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Les ARN extraits sont conservés à -80 °C. La qualité et la quantité de l'ARN total est mesurées à l'aide du Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

2.1.4. La transcription inverse

La rétro-transcription des ARN totaux permet de synthétiser les ADNc correspondants. Elle est réalisée à l'aide du kit « SuperScript VILO cDNA synthesis kit » (Invitrogen) selon

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

les recommandations du fournisseur. Les ADNc sont utilisés immédiatement ou conservés à -20°C.

2.1.5. L'ARN-seq

L'ARN poly (A) est isolé à partir de trois réplicats de cellules P5424 traitées avec du DMSO ou du PMA/ionomycin et utilisé pour la préparation de la bibliothèque d'ARN-seq, en utilisant le kit TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina). Les bibliothèques sont séquencées sur le séquenceur Illumina NextSeq 500 en mode extrémités appariées. Les données publiques d'ARN-seq de Hu *et al.* (Hu et al., 2013) et Vanden Bempt *et al.* (Vanden Bempt et al., 2018) sont téléchargées de la base de données GEO (numéros d'accension GSE48138 et GSE102209 respectivement). Les profils d'ARN-seq sont visualisés à l'aide de l'outil de visualisation génomique IGV (Thorvaldsdottir et al., 2013).

2.1.6. L'enrichissements fonctionnels

Afin d'identifier la fonction des gènes codants, régulés par la stimulation au PMA/ionomycin, nous avons utilisé le serveur web g:Profiler (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>). Il comprend plusieurs outils pour effectuer une analyse d'enrichissement fonctionnel et extraire des informations supplémentaires tout en analysant une liste de gènes (Reimand et al., 2011). Nous nous sommes concentrés sur les annotations Gene Ontology (GO) des processus biologiques. Pour sélectionner les annotations, nous avons choisi les 10 premiers enrichissements en termes GO (les 10 termes avec la *p* valeur la plus faible) (Figure 2.2C). Afin d'identifier la fonction des gènes voisins aux lncARN induits et réprimés après la stimulation au PMA/ionomycin, nous avons utilisé l'outil en ligne GREAT (Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool) (McLean et al., 2010). Cet outil déduit la fonction biologique des régions génomiques en analysant l'annotation de leurs gènes codants voisins. Nous nous sommes concentrés sur les annotations GO des processus biologiques. Pour sélectionner les annotations, nous avons choisi les 15 premiers enrichissements en termes GO (les 15 termes avec la *p* valeur la plus faible) (Figure 2.4A).

2.1.7. L'analyse GSEA

Pour analyser le degré de concordance entre le processus de stimulation par le PMA/ionomycin et la sélection- β , nous avons effectué une analyse dite « Gene Set

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

Enrichment Analysis » (GSEA) (Subramanian et al., 2007; Subramanian et al., 2005). Pour cela, nous avons extrait la signature de la sélection- β avec l'outil du Web 'immgen' (<http://rstats.immgen.org/PopulationComparison>) en comparant l'expression des gènes entre les thymocytes DN4 et DN3a, sur la base des données microarray de Mingueneau et al. (Mingueneau et al., 2013). Le logiciel GSEA est téléchargé depuis <http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>.

2.1.8. Analyses qualitatives de l'expression des gènes

L'ADNc des cellules P5424 stimulées par PMA/ionomycin ou DMSO est analysé par PCR. L'amplification est effectuée avec 1 cycle de 95°C pendant 1 minute, suivi de 30 cycles comprenant une dénaturation à 95°C pendant 20 secondes, une hybridation à des T_m variables (60°-64°) pendant 20 secondes et une extension à 68°C pendant 1 minute. Une dernière étape d'extension de 68°C est réalisée pendant 4 minutes. Les réactions de PCR de 25 μ l sont préparées avec 1 μ l d'ADNc provenant de la réaction de RT-PCR selon le protocole Herculese II Fusion (Agilent, Waldbronn, Allemagne). Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose en ajustant le pourcentage d'agarose en fonction de la taille attendue des amplicons. L'ADN génomique (ADNg) était utilisé comme contrôle positif. La liste des amorces utilisées lors des RT-PCR est en Annexe 1.

2.1.9. Analyses quantitatives de l'expression des gènes

La PCR quantitative est réalisée dans des plaques 96 puits et analysée au QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System. Chaque puits contient : 1 μ L de primer Forward (1 μ M) (Sigma), 1 μ L de primer Reverse (1 μ M) (Sigma), 12.5 μ L de Mix Syber Green (Agent fluorescent intercalant et polymérase) (Thermo Fisher Scientific), 8.5 μ L d'eau RNase/DNase free, ainsi que 1 μ L d'ADNc. Le programme de qPCR suivant est appliqué : pré-incubation (1 cycle : 95°C 10 minutes), amplification (40 cycles : 95°C 15 secondes, 60°C une minute), fusion (1 cycle : 95°C 15 seconde, 60°C une minute, 95°C 15 secondes). *Rpl32* est sélectionné comme gène de référence pour normaliser les résultats de PCR dans la suite de l'étude. Nous avons réalisé le test *t* (Welch's *t* test) à partir de 3 réplicats biologiques (***P* < 0.001, ***P* < 0.01, **P* < 0.1), afin de vérifier si les gènes étaient significativement différentiellement exprimés par rapport au contrôle. La liste des amorces utilisées lors des RT-qPCR est en Annexe 1.

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

2.1.10. L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Un total de 5.10^6 cellules P5424 traitées au PMA/ionomycine ou DMSO sont réticulées avec du formaldéhyde à 1% pendant 10 min à 20 °C, puis la réaction est arrêtée en ajoutant de la glycine (concentration finale de 250 mM). Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS glacé, puis re-suspendu dans du tampon de lyse (Hepes 20 mM, pH 7,6, SDS à 1%, cocktails d'inhibiteurs de protéases 1X) à une concentration cellulaire finale de 15.10^6 cellules/ml. La chromatine est soniquée dans un Biorupteur (Diagenode) pour avoir des fragments de chromatine ayant une longueur moyenne de 200 à 400 pb (5 cycles de 30 secondes ON et de 30 secondes OFF). Pour chaque immunoprécipitation, un aliquot de lysat cellulaire soniqué, équivalent à 5.10^5 cellules, est dilué avec du tampon de dilution exempt de SDS. Des anticorps spécifiques et un cocktail d'inhibiteurs de protéinases sont ajoutés au lysat et mélangés pendant une nuit à 4°C. Les anticorps utilisés sont les suivants : H3K4me3 (C15410003-50) et H3K27ac (C15410196, Diagenode). Le lendemain, les billes magnétiques couplées à la protéine A (Invitrogen) sont lavées deux fois avec du tampon de dilution (0,15% de SDS, 0,1% de BSA), ajoutées au lysat et placées sur roue pendant 1 heure à 4°C. Ensuite, les billes sont rincées avec les tampons suivants: une fois avec le tampon de rinçage 1 (EDTA 2 mM, Tris 20 mM, pH 8, Triton 1%, SDS 0,1%, NaCl 150 mM), deux fois avec le tampon de rinçage 2 (EDTA 2 mM, Tris 20 mM pH 8, Triton 1%, SDS 0,1%, NaCl 500 mM) et deux fois avec le tampon de rinçage 3 (EDTA 1 mM, Tris 10 mM pH 8). Enfin, les billes sont éluées dans du tampon d'éluion (SDS 1%, NaHCO₃ 0,1 M) et mélangées sur roue à température ambiante pendant 20 min. Pour la réaction de réversion de la réticulation, du NaCl 5 M et 10 mg/ml de protéinase K sont ajoutés au produit élué et à l'input (10% de la chromatine soniquée utilisée pour l'immunoprécipitation). Les échantillons sont ensuite incubés pendant une nuit à 65°C. Le lendemain, l'ADN est purifié avec le kit « QIAquick PCR Purification Kit » (Qiagen) et élué dans 20 µl d'eau. Une PCR quantitative en temps réel avec du SYBR green est utilisée pour quantifier l'ADN immunoprécipité. Les amorces utilisées sont énumérées dans l'annexe 1. Les données représentent le pourcentage d'input normalisé par le promoteur d'*Actb*.

2.1.11. ChIP-seq

Les bibliothèques ChIP-seq pour H3K4me3 et H3K27ac dans les cellules P5424 traitées avec du DMSO ou du PMA/ionomycine sont générées avec le kit de préparation de

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

bibliothèque MicroPlex (Diagenode), conformément aux instructions du fabricant. Les bibliothèques sont séquencées en mode extrémités appariées à l'aide du NextSeq® 500/550 (Illumina), conformément aux instructions du fabricant. Les « reads » sont alignés sur le génome de référence mm9 en utilisant des procédures standard. Les profils ChIP-seq sont visualisés à l'aide de l'outil de visualisation génomique IGV (Thorvaldsdottir et al., 2013).

2.1.12. L'édition génomique avec CRISPR-Cas9

Pour déléter le lncARN XLOC_000895/*Robnr*, un ARNg est conçu de chaque côté de la région ciblée à l'aide de l'outil CRISPRdirect (Naito et al., 2015). Les ARNg sont clonés dans un vecteur de clonage d'ARNg (Addgene, 41824). Ensuite, 1.10^5 cellules sont co-transfectées avec 5 µg du vecteur hCas9 (Addgene, 41815) et 5 µg de chaque vecteur d'ARNg en utilisant le système de transfection Neon (Thermo Fisher Scientific). Deux jours plus tard, les cellules sontensemencées dans des plaques à 96 puits à une dilution limite (0,5 cellule par puits) pour une expansion clonale. Les clones sont criblés au bout de 10 à 14 jours pour la délétion d'allèle homologue par PCR directe en utilisant le kit « Phire Tissue Direct PCR Master Mix » (Thermo Fisher Scientific) selon les instructions du fabricant. Les amorces sont conçues pour encadrer les régions ciblées, ce qui permet de détecter les allèles délétés ou non délétés (de type sauvage). Les clones sont considérés comme ayant subi une délétion d'allèle homologue s'ils présentent la bande de délétion attendue et aucune bande de type sauvage sur le gel d'agarose après amplification par PCR. Nous avons obtenu deux clones avec délétion bi-allélique (Figure 2.11E). Les produits de PCR correspondant aux fragments supprimés sont purifiés à l'aide du kit MinElute Purification (Qiagen) et séquencés (Eurofins Genomics) afin de déterminer les points de rupture exacts. $\Delta Robnr$ -cl1 avait la suppression attendue de 1,1 kb (chr1: 108412002-108413119), tandis que $\Delta Robnr$ -cl2 avait une suppression de 1,2 kb (chr1: 108411914-108413135). Les séquences d'amorces et d'ARNg sont énumérées dans l'annexe 1.

2.2. Résultats

2.2.1. Effet du traitement par le PMA/ionomycine sur l'expression des gènes dans les cellules P5424

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

La lignée cellulaire P5424 est dérivée de thymocytes DN des souris *Rag1* ^{-/-} ; *p53* ^{-/-} mutées (Mombaerts et al., 1995). Les cellules P5424 expriment les marqueurs de surface CD4 et CD8, comme les thymocytes doubles positifs (Mombaerts et al., 1995; Vanhille et al., 2015). Cependant, ces cellules ont une signature transcriptionnelle similaire aux thymocytes double négatives, qui inclut l'expression élevée de *Ptcra* et du gène cible de Notch1, *Hes1*, ainsi qu'un très faible niveau d'expression de *Tcra* (Figure 2.1A, B). Ces observations suggèrent que les cellules P5424 sont en quelque sorte bloquées entre la transition DN-DP au cours du processus de la sélection- β .

Pour étudier les réseaux de régulation des gènes de la signalisation en aval du (pré-)TCR durant les étapes précoces de différenciation des cellules T, nous avons utilisé une combinaison de PMA et d'ionomycine pour stimuler la protéine kinase C (PKC) – et les voies médiées par la calcineurine (Chatila et al., 1989; Holden et al., 2008) dans la lignée P5424 de souris. Il a été démontré que le traitement des précurseurs précoces des cellules T par le PMA/ionomycine, activait la voie de signalisation pré-TCR et induisait l'expression du locus *Tcra* (Del Blanco et al., 2012). En se basant sur le niveau d'expression du gène *Tcra*, nous avons déterminé qu'un traitement avec 10 ng/ml de PMA et 0,5 μ g/ml d'ionomycine pendant 4h aboutit à l'induction la plus élevée de ce gène (Figure 2.1A). Ainsi, nous avons décidé d'utiliser ces conditions dans d'autres expériences. La stimulation au PMA/ionomycine des cellules P5424 reflète la sélection- β en réprimant l'expression des marqueurs précoces des cellules T, *Ptcra* et *Hes1* et en induisant les gènes *Tcra* et *Egr1* (Figure 2.1B).

Pour valider ces résultats, nous avons analysé l'expression du CD25 humain (h) dans la lignée P5424 transfectée de manière stable, où le hCD25 est sous le contrôle du promoteur de *Ptcra* de souris (Reizis and Leder, 2001) (Figure 2.1C). Comme prévu, la stimulation au PMA/ionomycine induit la perte d'expression de hCD25 à la surface des cellules P5424 (Figure 2.1D), ce qui signifie que le promoteur *Ptcra* était fortement réprimé par le traitement au PMA/ionomycine.

Par ailleurs, il a été démontré que le processus de sélection- β entraînait une prolifération cellulaire *in vivo* (Hayday and Pennington, 2007). Cependant, après le traitement des cellules P5424 par le PMA/ionomycine, nous avons observé un blocage de la prolifération cellulaire (Figure 2.1E), accompagné d'une apoptose accrue par rapport aux cellules non

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

stimulées (Figure 2.1F, G). Cela concorde avec les résultats obtenus par Da Silva et al., (Da Silva et al., 2017), et pourrait refléter une forte stimulation des cellules, rappelant le processus de la sélection négative qui se produit aux stades ultérieurs de la maturation des cellules T thymiques, et qui est médiée par l'apoptose induite par de forts stimuli des cellules T (Germain, 2002).

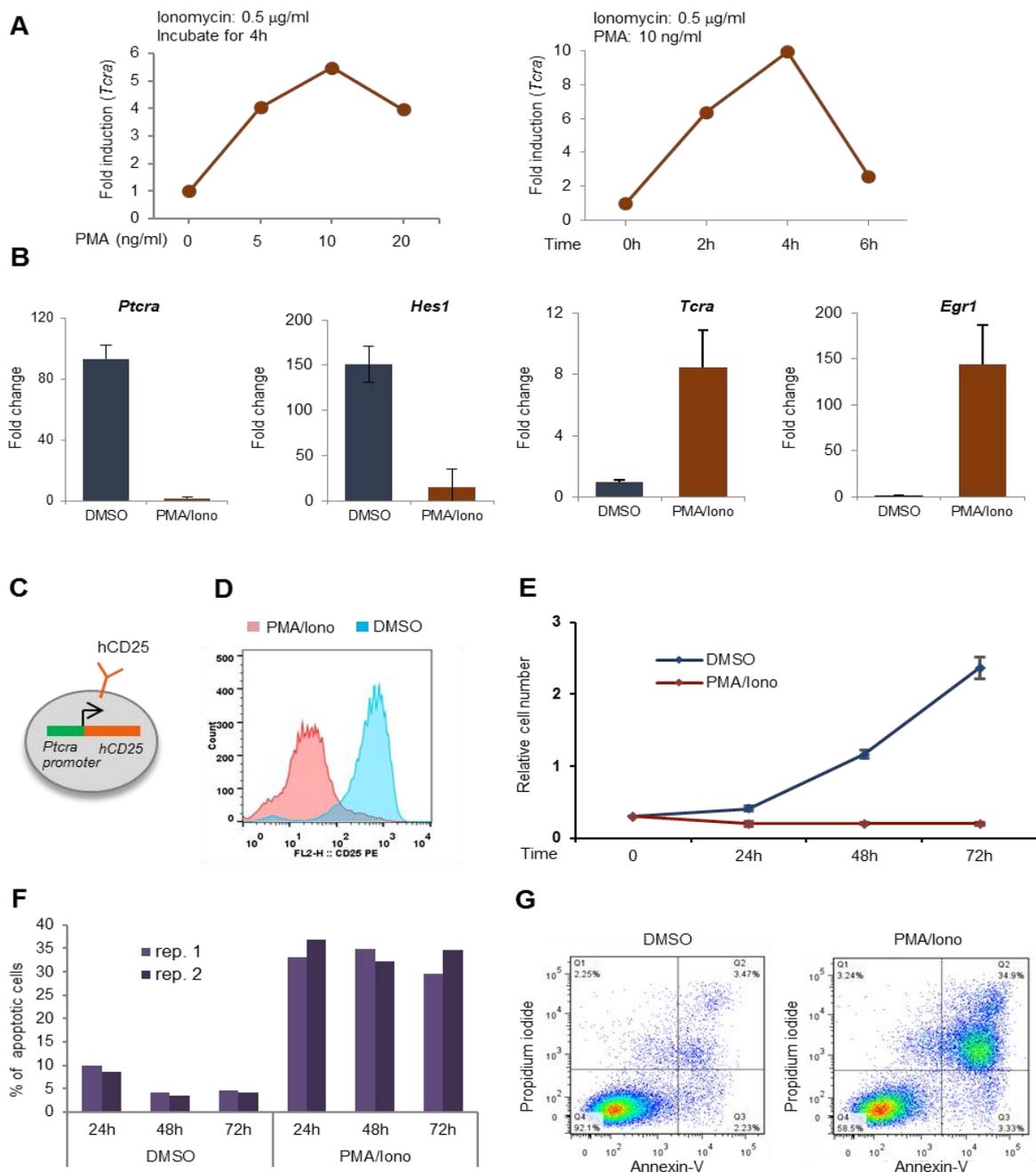


Figure 2.1. Effet du traitement au PMA/ionomycine sur les cellules P5424. A) Effets dépendants du temps d'incubation et de la dose du traitement au PMA/ionomycine sur l'expression de *Tcra* dans les cellules

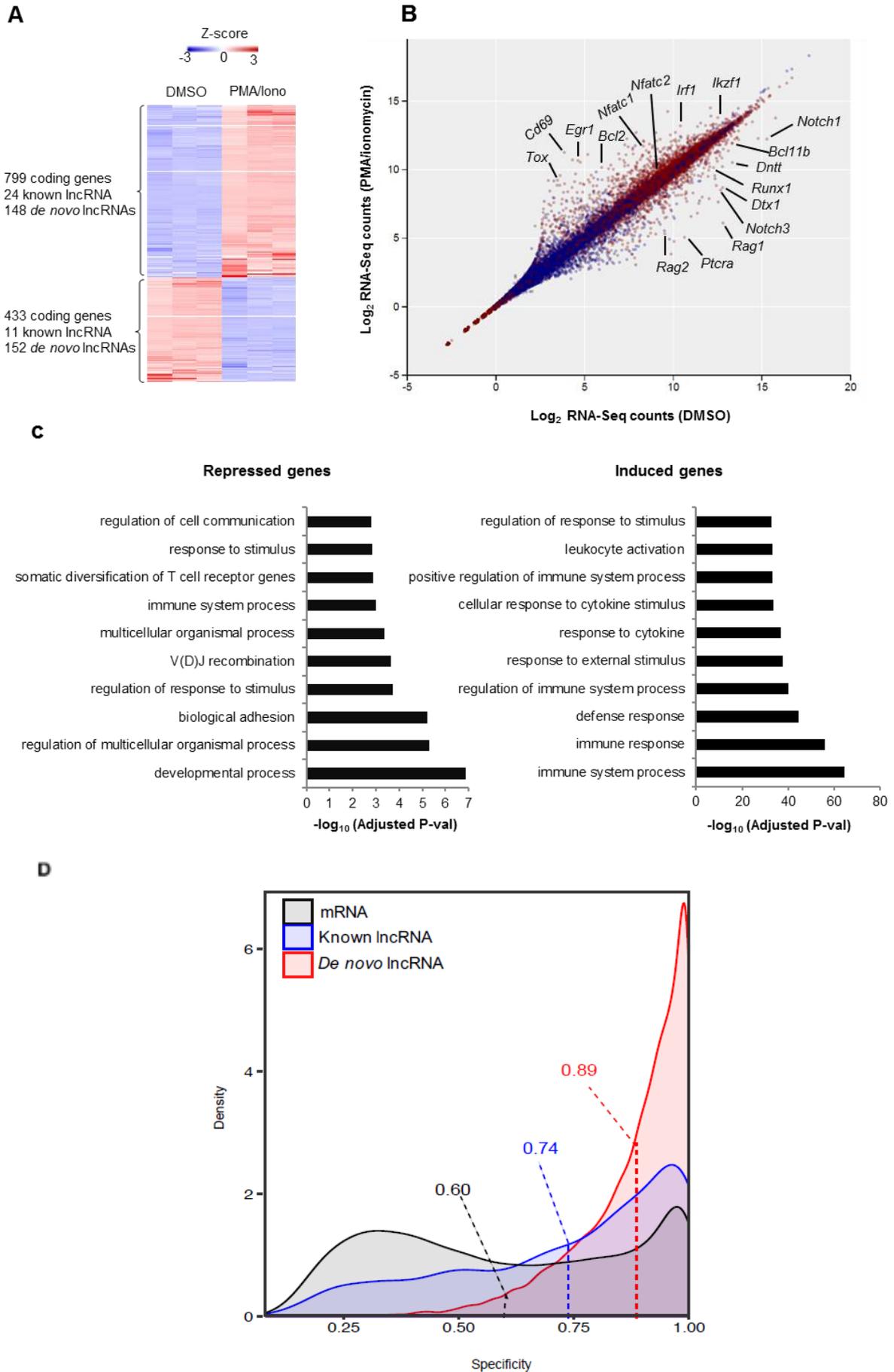
Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

P5424. Les niveaux d'expression de *Tcra* sont mesurés par qPCR. **B)** Diagrammes en barres de l'analyse RT-qPCR montrant l'induction de *Tcra* et *Egr1*, ainsi que la répression de *Ptcra* et *Hes1* dans les cellules P5424 après la stimulation par le PMA/ionomycin. **C)** Représentation schématique de la lignée cellulaire P5424 rapportrice exprimant le marqueur de surface hCD25 via le promoteur *Ptcra*. **D)** Histogrammes d'analyses de la cytométrie en flux montrant la réduction du hCD25 à la surface des cellules en présence de PMA/ionomycin. **E)** Courbe de prolifération des cellules P5424 traitées avec du DMSO ou du PMA/ionomycin pendant 4h. Les cellules sont comptées aux moments indiqués. **F)** Histogramme montrant le pourcentage des cellules P5424 apoptotiques (cellules doubles positives à l'annexine-V et à l'iodure de propidium) après le traitement par le PMA/ionomycin dans deux expériences indépendantes (rep). **G)** Analyse de cytométrie en flux représentative de cellules P5424 colorées à l'iodure de propidium et à l'annexine V après 48 heures de traitement au PMA/ionomycin.

Pour avoir une vue globale sur les effets transcriptionnels et épigénétiques du traitement par le PMA/ionomycin, nous avons effectué des expériences d'ARN-seq et de CHIP-seq (pour H3K4me3 et H3K27ac) sur des cellules P5424 traitées au PMA/ionomycin et des cellules non traitées (DMSO). L'analyse des données ARN-seq pour la découverte *de novo* lncARN (nouveaux transcrits lncARN) nous a permis d'identifier 7098 transcrits correspondant à 6487 gènes *de novo* lncARN dont la majorité sont tissu-spécifiques (Figure 2.2D). Le traitement par le PMA/ionomycin conduit à l'induction de 799 et la répression de 433 gènes codants, ainsi que l'induction de 172, et la répression de 163 lncARN (y compris 148 et 152 *de novo* lncARN, respectivement) (Figure 2.2A). Une première analyse visuelle des données ARN-seq révèle que plusieurs gènes liés à la différenciation précoce des lymphocytes T sont significativement réprimés ex : *Rag1/2*, *Ptcra*, *Dntt*, *Notch1*, *Notch3*, *Dtx1*, *Rag1* et plusieurs gènes liés à la maturation/activation des lymphocytes T sont induits ex : *Nfatc1*, *Nfatc2*, *Tox*, *Ikzf1*, *Cd69*, *Egr1* (Figure 2.2B).

L'analyse d'enrichissement fonctionnel révèle que les gènes codants, réprimés, sont liés à la différenciation précoce des lymphocytes T (ex : processus de développement, recombinaison V (D) J, diversification somatique des gènes du récepteur des cellules T), alors que les gènes codants induits, sont liés à l'activation des lymphocytes (ex : réponse immunitaire, réponse aux cytokines, activation des leucocytes) (Figure 2.2C).

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T



Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

Figure 2.2. Effet du traitement par PMA/ionomycine sur l'expression des gènes dans la lignée P5424.

A) Carte thermique (Heatmap) illustrant le signal ARN-seq normalisé des gènes codants et lncARN différenciellement exprimés dans 3 réplicats témoins (DMSO) et 3 réplicats traités par le PMA/ionomycine (PMA/Iono) des cellules P5424. **B)** Nuage de points montrant les gènes codants (en rouge) et les lncARN (en bleu) régulés positivement et négativement en réponse à la stimulation par le PMA/ionomycine dans les cellules P5424. **C)** Top 10 des processus biologiques identifiés par l'analyse d'enrichissement fonctionnel (g: Profiler) des gènes codants régulés par la stimulation au PMA/ionomycine. **D)** Courbes de densité montrant la distribution des scores de spécificité tissulaire pour chaque classe de transcrit. Les lignes verticales indiquent le score moyen de spécificité tissulaire de la classe correspondante.

Pour évaluer précisément dans quelle mesure la stimulation au PMA/ionomycine des cellules P5424 ressemble au processus de sélection- β , nous avons analysé l'enrichissement relatif de la signature de la sélection- β obtenue en comparant l'expression génique entre les thymocytes DN4 et DN3a (Mingueneau et al., 2013) avec la liste des gènes régulés par le PMA/ionomycine. Cette analyse révèle que les gènes réprimés par la sélection- β sont enrichis dans les cellules P5424 non stimulées tandis (Figure 2.3A) que les gènes induits par la sélection- β sont enrichis dans les cellules stimulées par le PMA/ionomycine (Figure 2.3B). Cependant, nous avons également noté que l'expression de plusieurs gènes induits (tels que *Rorc*, *Ikzf3* et *Camk4*, *Lef1*, *Nfatc3*) et réprimés (*Lfng*, *Maml3*, *Dtx3 / 3l*, *Il2ra* et *IL7r*) par la sélection- β ne sont pas affectés par la stimulation au PMA/ionomycine ou régulés de manière opposés, ce qui suggère qu'un programme de transcription incomplet est induit par le traitement par le PMA/ionomycine. Ainsi, la stimulation par le PMA/ionomycine des cellules P5424 ne correspond pas exactement au processus de la sélection- β , mais constitue un bon modèle pour l'analyse des mécanismes conduisant à la différenciation et à l'activation précoces des cellules T *in vitro*.

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

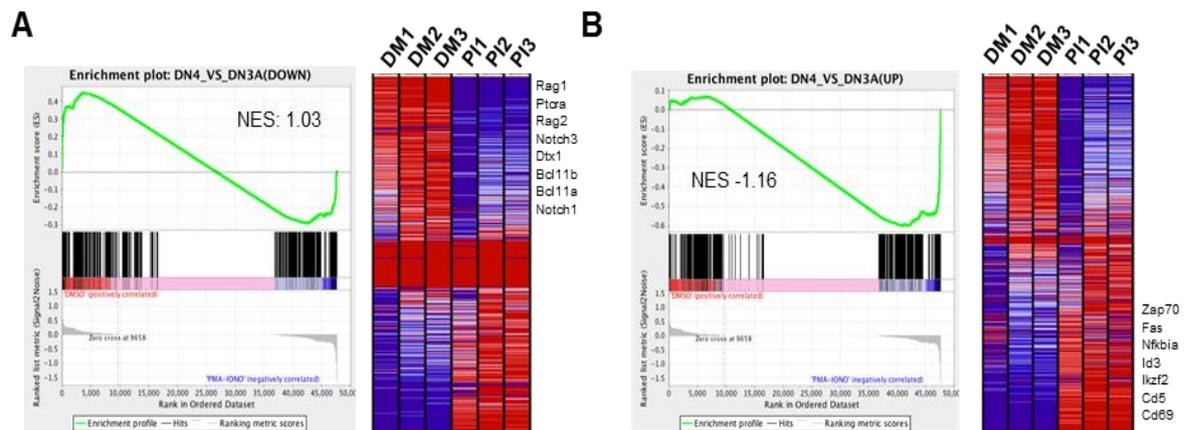


Figure 2.3. L'analyse d'enrichissement des jeux de gènes (GSEA). L'analyse GSEA des gènes réprimés (A) et induits (B) entre les thymocytes DN4 et DN3a dans des cellules P5424 traitées par PMA/ionomycine ou par DMSO. Heatmaps illustrant l'expression relative des top 50 gènes de chaque ensemble de gènes (rouge = élevé, bleu = faible) dans des cellules P5424 traitées par DMSO (DM, 3 réplicats) ou par PMA/ionomycine (PI, 3 réplicats).

2.2.2. Annotation fonctionnelle des lncARN régulés par PMA/ionomycine

Par la suite, nous nous sommes intéressés, aux lncARN régulés par la stimulation au PMA/ionomycine. Nous cherchions particulièrement à savoir si certains lncARN seraient impliqués dans une fonction biologique particulière. Or il n'existe pas à l'heure actuelle des bases de données ou des outils bio-informatiques permettant une analyse directe de la fonction des lncARN, nous avons utilisé l'outil GREAT (McLean et al., 2010). Cet outil associe des régions génomiques (dans le cas présent il s'agit des lncARN) aux gènes codants les plus proches et calcule ensuite un enrichissement de termes GO. Nous nous sommes concentrés sur les enrichissements de termes GO des processus biologiques. Ainsi, nous avons remarqué que les lncARN induits ou réprimés par la stimulation au PMA/ionomycine, sont significativement associés aux gènes impliqués dans le développement et l'activation des lymphocytes T (ex : recombinaison V(D)), régulation positive de la différenciation des lymphocytes T) (Figure 2.4A).

Pour déterminer s'il existait une association statistique entre les lncARN et leurs ARNm voisins régulés par le PMA/ionomycine, nous avons calculé la distance entre chaque

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

lncARN induit ou réprimé et l'ARNm régulé le plus proche, définis comme paires lncARN/ARNm. Nous avons remarqué que les paires lncARN/ARNm séparées par moins de 500 kb sont co-régulés (Figure 2.4B, C). En outre, plus la distance entre les deux gènes est faible, plus la fréquence des paires co-régulés est élevée (Figure 2.4C), démontrant une association significative entre ces paires. Cependant, aucune association significative n'a été trouvée entre les paires lncARN/ARNm régulés de manière différente, ce qui indique que ces paires sont généralement positivement corrélées. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que certains lncARN régulés par le PMA/ionomycin, ou leur séquences régulatrices associées, pourraient jouer un rôle dans la régulation en cis des gènes codants impliqués dans la différenciation ou l'activation des lymphocytes T. Ceci est cohérent avec les études précédentes soulignant que les lncARN à différents stades du développement et de la différenciation des lymphocytes T murins sont généralement adjacents aux gènes codant pour les cytokines ou des facteurs de transcription spécifiques de la lignée (Isoda et al., 2017; Vanden Bempt et al., 2018; Zhu and Xu, 2013).

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

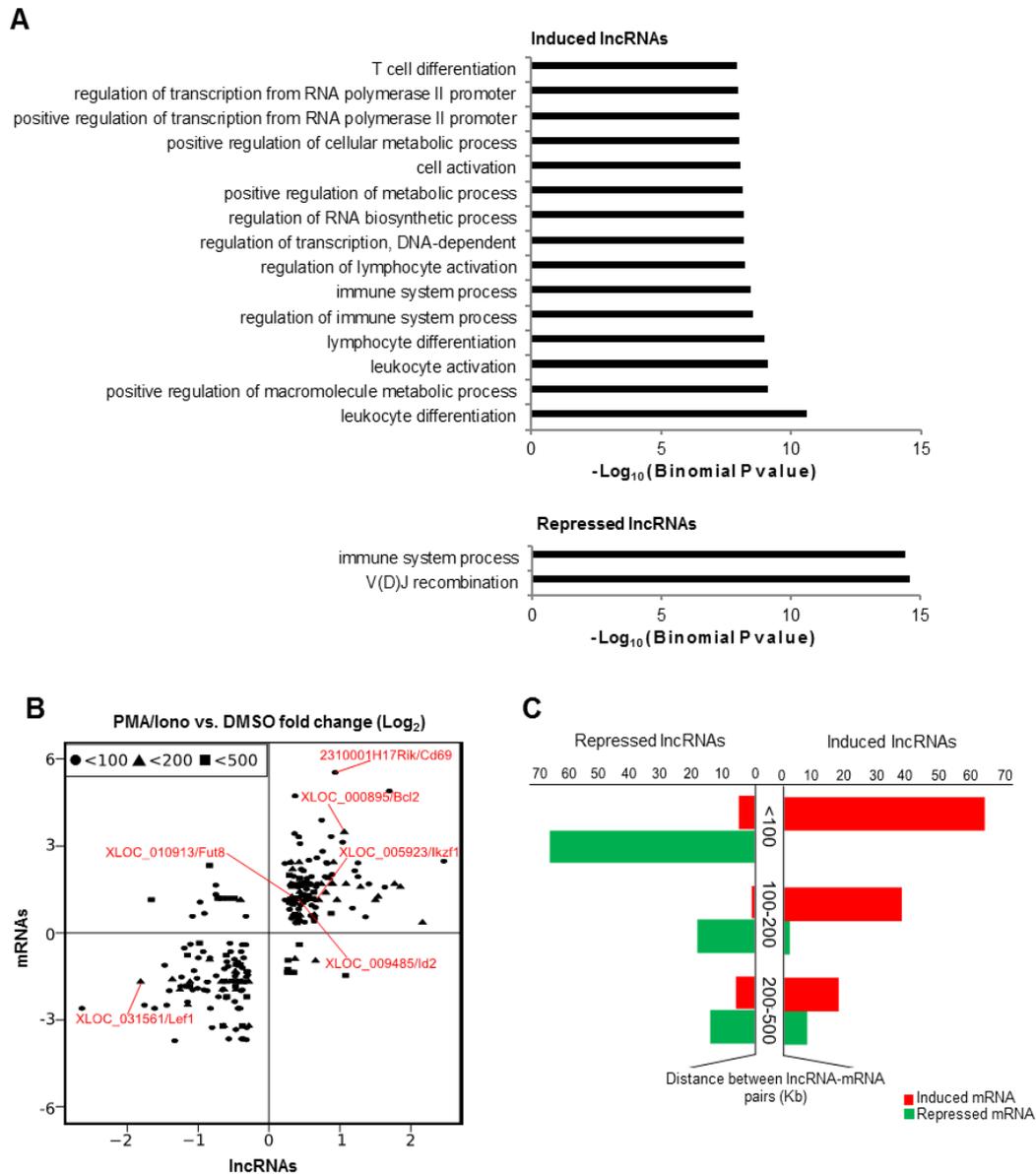


Figure 2.4. Corrélation entre la régulation des lncARN et l'ARNm dans les cellules P5424. A) L'annotation fonctionnelle (processus biologiques) des gènes codants associés aux lncARN régulés par le PMA/ionomycine, à l'aide de l'outil GREAT. Les 15 termes les plus significatifs sont indiqués. Les p-values, p , renvoyées par GREAT pour chacun des termes (test binomiales) sont exprimé sous la forme $-\log_{10}(p)$. **B)** Nuage de points présentant les ratios d'expression en logarithme base 2 (\log_2 Fold Change) entre les conditions PMA/ionomycine et DMSO des paires lncARN/ARNm régulées en fonction de la distance entre leurs TSS (Kb). Les paires séparées par moins de 100, 200 et 500 Kb sont affichées. Les exemples typiques sont surlignés en rouge. **C)** Diagramme à barres présentant le nombre de lncARN (axe des abscisses) régulés en fonction de l'état d'expression (induit/réprimé) de l'ARNm le plus proche et en fonction de la distance qui les sépare (axe des ordonnées).

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

2.2.3. Validation des paires lncARN/ARNm corrélées

Les observations ci-dessus nous ont incité à rechercher plus en détail les locus des paires de lncARN/ARNm co-régulés qui pourraient être impliqués dans les fonctions des cellules T. Pour cela, Nous avons utilisé les données de ChIP-seq H3K4me3 et H3K27ac (acétylation de la lysine 27 de l'histone 3) pour mieux cartographier les régions régulatrices 5' des lncARN candidats. L'inspection visuelle des loci régulés par le PMA/ionomycin sur IGV nous a permis de sélectionner 5 paires lncARN/gènes codant co-induits et 3 co-réprimés montrant une dynamique d'expression et de modification d'histones bien corrélée (Figure 2.5A, 2.6A, respectivement) (Tableau 2.1).

Tableau 2.1. Liste des paires lncARN/gènes codants voisin co-régulés.

	lncRNA	log ₂ Fold Change	P valeur adj	Gène codant voisin	log ₂ Fold Change	P valeur adj
candidats réprimés	XLOC_011166	-3.22	0	<i>Bcl11b</i>	-1,47	6.56E-91
	XLOC_031561	-3.08	3.48E-50	<i>Lef1</i>	-1.97	4.22E-102
	XLOC_004796	-1.46	1.04E-08	<i>Ifngr1</i>	-0,35	1.76E-05
candidats induits	XLOC_000895	2.97	1.35E-17	<i>Bcl2</i>	4.54	4.82E-252
	2310001H17Rik	3.35	9.85E-15	<i>Cd69</i>	8.16	2.91E-242
	XLOC_005923	1.71	3.28E-12	<i>Ikzf1</i>	1.34	7.74E-77
	XLOC_010913	1.72	0.0018	<i>Fut8</i>	1.27	1.78E-50
	XLOC_009485	1.26	0.0009	<i>Id2</i>	1.44	7.69E-37

Nous avons, par la suite, entrepris une première validation par PCR classique de l'expression différentielle des candidats lncARN retenus. Cette analyse nous a permis aussi de valider la structure exon/intron de ces lncARN et vérifier si les résultats correspondent à l'annotation prédite. Il s'agit d'une étape essentielle car beaucoup de lncARN sont encore mal annotés. Pour réaliser cela, nous avons désigné des amorces pour les 8 candidats sélectionnés (Annex 1). Après la stimulation, nous avons tout d'abord confirmé son efficacité par l'induction de l'expression du gène *Tcra* et la répression du gène *Ptcr*. Nous avons par la suite validé l'expression différentielle des huit candidats lncARN régulés par la stimulation au PMA/ionomycin (Figure 2.5B, 2.6B).

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

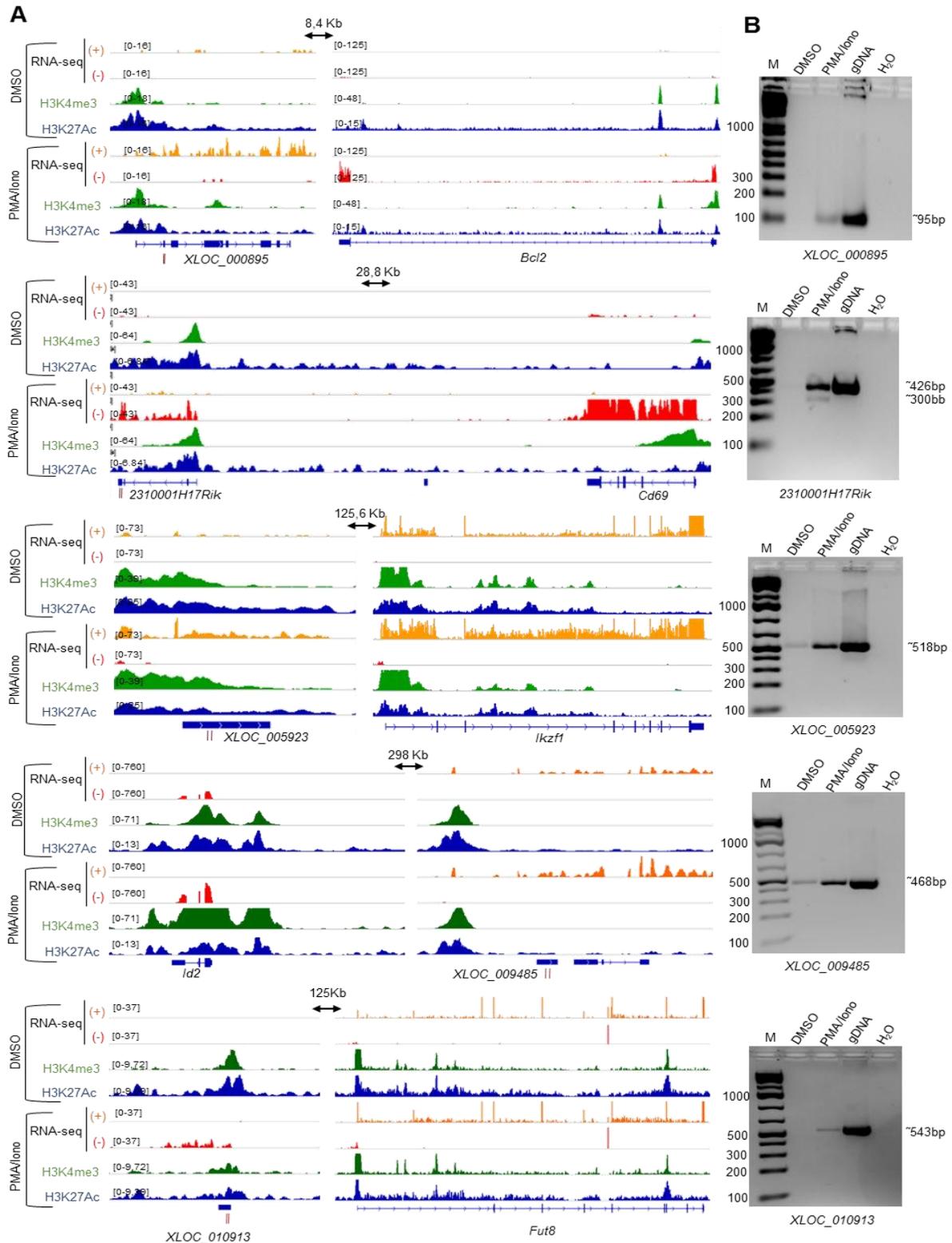


Figure 2.5. Les paires lncARN/ARNm co-induites sélectionnées. A) Captures d'écran effectuées à partir de l'outil de visualisation génomique IGV des cellules contrôles (DMSO, panneaux supérieurs) et cellules stimulées par le PMA/ionomycine (PMA/Iono, panneaux inférieurs), montrant les données ARN-seq (brin + en jaune et brin - en rouge), ainsi que les données ChIP-seq (H3K4me3 en vert et H3K27ac en bleu) des locus lncARN induits et leurs gènes codants voisins. Les flèches noires indiquent la distance entre le lncARN

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

et son gène codant voisin. Les amorces utilisées pour la validation RT-PCR sont désignées par des lignes rouges verticales sous la position du lncARN. **B)** Amplification par PCR classique des lncARN induits par la stimulation au PMA/ionomycine est présentée dans les cellules contrôles (DMSO), les cellules P5424 traitées par le PMA/ionomycine (PMA/Iono) et l'ADN génomique (ADNg). Le gène *Actb* est utilisé comme contrôle interne dans les expériences.

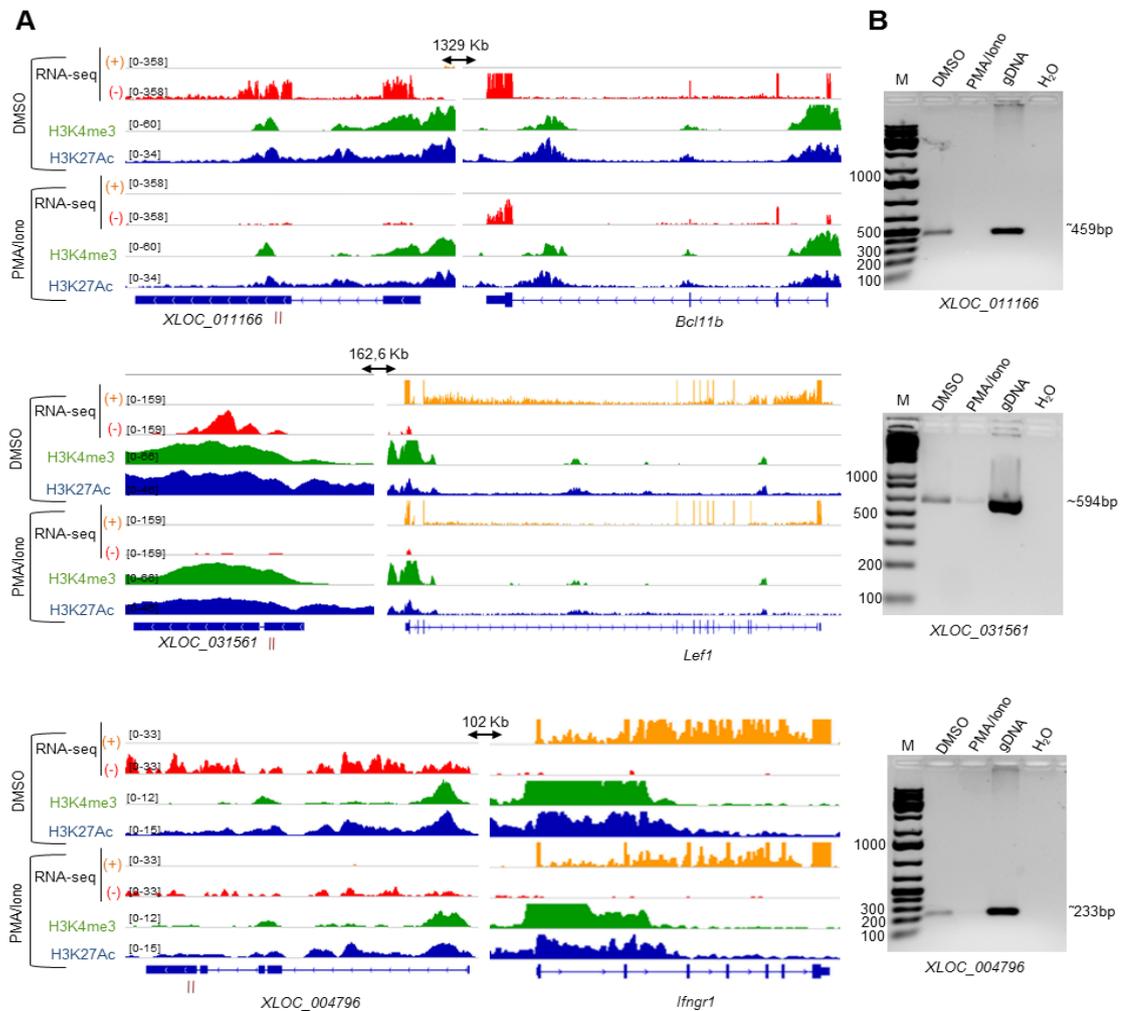


Figure 2.6. Les paires lncARN/ARNm co-réprimés sélectionnées. A) Captures d'écran effectuées à partir de l'outil de visualisation génomique IGV des cellules contrôles (DMSO, panneaux supérieurs) et cellules stimulées par le PMA/ionomycine (PMA/Iono, panneaux inférieurs), montrant les données ARN-seq (brin + en jaune et brin - en rouge), ainsi que les données ChIP-seq (H3K4me3 en vert et H3K27ac en bleu) des locus lncARN réprimés et leurs gènes codants voisins. Les flèches noires indiquent la distance entre le lncARN et son gène codant voisin. Les amorces utilisées pour la validation RT-PCR sont désignées par des lignes rouges verticales sous la position du lncARN. **B)** Amplification par PCR classique des lncARN induits par la stimulation au PMA/ionomycine est présentée dans les cellules contrôles (DMSO), les cellules P5424 traitées par le PMA/ionomycine (PMA/Iono) et l'ADN génomique (ADNg). Le gène *Actb* est utilisé comme contrôle interne dans les expériences.

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

L'étape suivante était de valider la co-régulation des couples lncARN/gènes codants de façon quantitative par RT-qPCR. L'analyse montre là aussi, que les loci sélectionnés sont co-régulés lors du traitement par PMA/ionomycin, validant la quantification par RNA-seq (Figure 2.7).

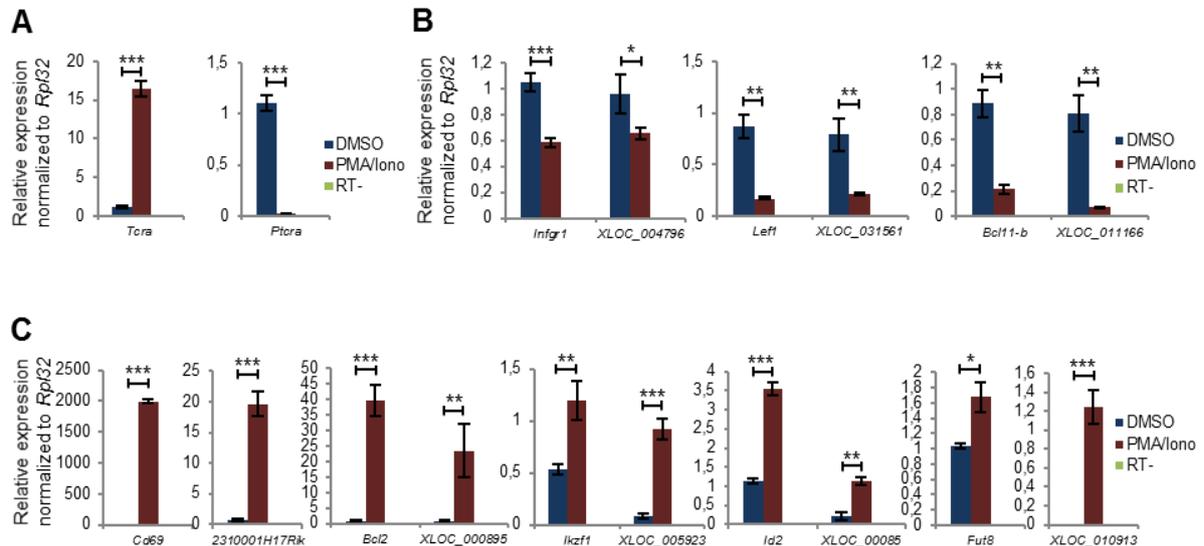
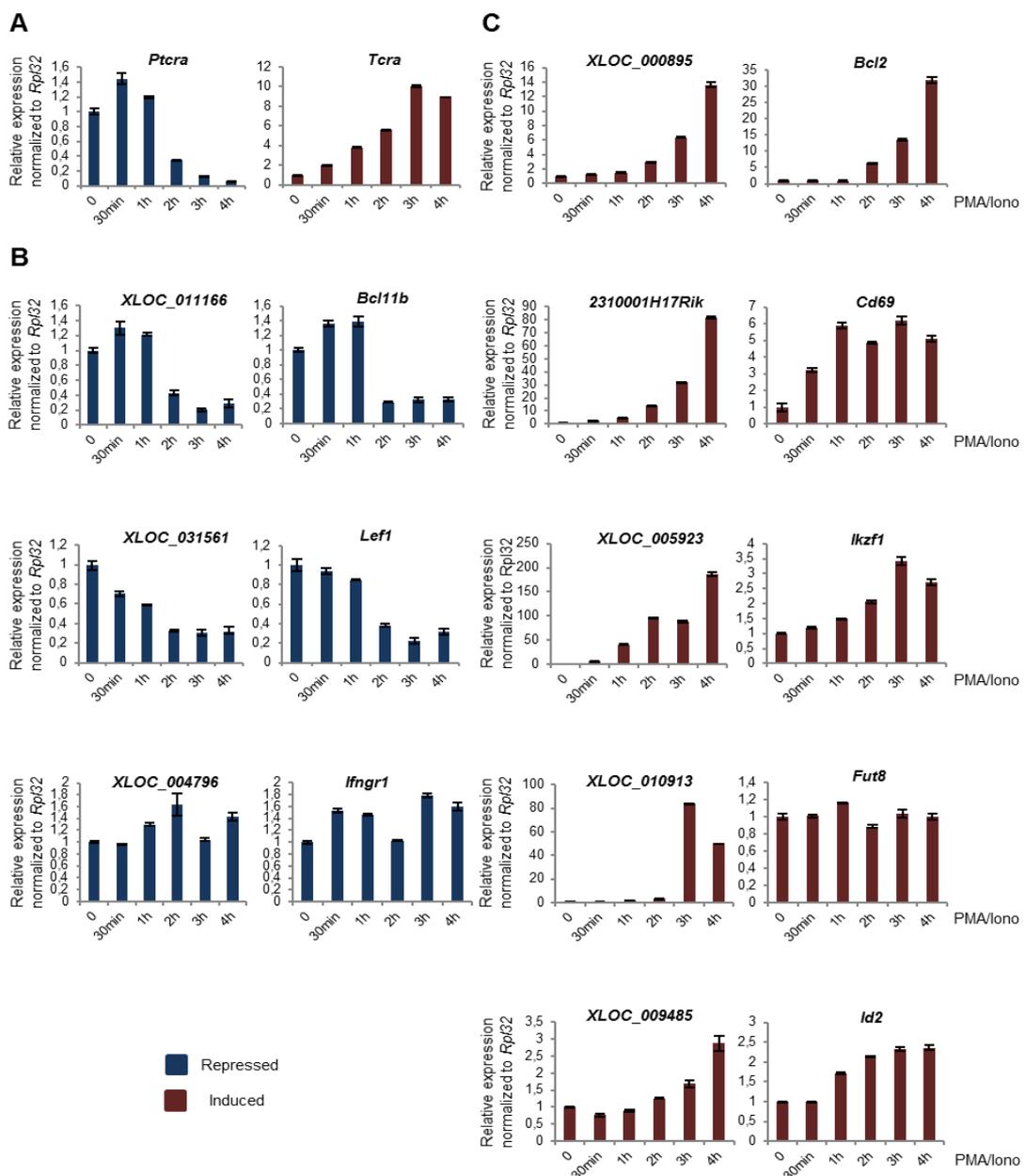


Figure 2.7. L'analyse RT-qPCR de l'expression des paires lncARN/ARNm sélectionnées après la stimulation au PMA/ionomycin dans les cellules P5424. Analyses d'expression des gènes contrôles *Tcra* et *Ptcr* (A), des paires lncARN/ARNm réprimés (B) et des paires lncARN/ARNm induits. (C) *Rpl32* est sélectionné comme gène de référence pour normaliser les résultats de PCR. Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes plus ou moins les écart-types de trois expériences indépendantes. Test de student (uni/bilateral 2, type 2). (*) $p < 0,1$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Une fois la co-régulation des couples lncARN/gènes codants voisins confirmés, nous avons procédé à l'identification des lncARN candidats pour une régulation en cis. Nous avons émis l'hypothèse que, dans ce cas, les lncARN et leurs gènes codants voisins co-régulés devraient suivre la même cinétique d'expression après la stimulation au PMA/ionomycin. Pour cela, nous avons stimulé la lignée P5424 par la même concentration de PMA/ionomycin, mais avec des durées différentes (0-30min-1h-2h-3h-4h). Nous avons tout d'abord confirmé l'efficacité de la stimulation par l'activation progressive du gène *Tcra* et la répression progressive du gène *Ptcr* (Figure 2.8A). Ensuite, nous avons quantifié l'expression différentielle de chaque lncARN/gène codant voisin co-régulé par RT-qPCR. Dans le groupe des pairs lncARN/gènes codants co-réprimés (Figure 2.8B), les lncARN *Xloc-031561*, *Xloc-011166* avec leurs gènes voisins

Chapitre 2. Un régulateur critique de *Bcl2* révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

codants *Lef1* et *Bcl11b* respectivement, montrent des profils d'expressions bien corrélés. En revanche pour le lncARN *Xloc-0007601* et son gène codant voisin *Infgr1*, la répression est transitoire avec des profils d'expressions distincts. Pour le groupe des lncARN/gènes codants voisins co-induits (Figure 2.8C), les profils d'expression des lncARN *Xloc-000895* et *Xloc-005923* avec leurs gènes codants voisins *Bcl2* et *Ikzf1* respectivement sont bien corrélés, alors que les autres sont distincts. Nous avons choisi le couple *XLOC_000895/Bcl2* (qui présentait une cinétique d'activation très similaire, supportant un rôle régulateur en *cis*) pour une caractérisation plus poussée.



Chapitre 2. Un régulateur critique de *Bcl2* révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

Figure 2.8. L'étude cinétique de la régulation des paires lncARN/ARNm sélectionnées par la stimulation au PMA/ionomycin. A-C) Les cellules P5424 sont stimulées par PMA/ionomycin et collectées aux moments indiqués pour l'analyse RT-qPCR des gènes de contrôle *Tcra* et *Ptcr* (A), des paires lncARN/ARNm réprimés (B) et des paires lncARN/ARNm induits (C). Les expériences sont effectuées en triplicats et l'expression est normalisée par *Rpl32*. Les données sont représentées avec un écart type.

Bcl2 est un membre d'une famille de protéines impliquées dans la mort cellulaire programmée (l'apoptose), la réponse immunitaire médiée par les cellules T, ainsi que dans la transformation oncogénique des lignées lymphoïdes (Burlacu, 2003; Dunkle and He, 2011; Hata et al., 2015; Kirkin et al., 2004). En analysant nos données ARN-seq ou d'autres données publiées, nous avons remarqué que le locus XLOC_000895/*Bcl2* est exprimé à un faible niveau dans les thymocytes en développement. Comme *Bcl2* est nécessaire à la différenciation et à la maturation normales des cellules T (Gratiot-Deans et al., 1994), nous avons émis l'hypothèse que ce locus pourrait être exprimé dans une petite population de thymocytes ou à des stades ultérieurs de maturation des cellules T. De plus, il a été démontré que *Bcl2* est régulé positivement dans les thymocytes DP traités avec du PMA/ionomycin, reflétant probablement la survie cellulaire lors de la sélection positive des cellules DP (Tanahashi et al., 2001). Pour déterminer si le locus XLOC_000895/*Bcl2* est exprimé à des stades ultérieurs de maturation des cellules T ou au cours de l'activation des cellules T, nous avons réanalysé un ensemble de données ARN-seq publiées couvrant la plupart des étapes de la différenciation des cellules T thymiques et périphériques (Hu et al., 2013). Remarquablement, l'expression des gènes XLOC_000895 et *Bcl2* est bien corrélée tout au long de la différenciation des lymphocytes T (Figure 2.9A, B), et les deux gènes sont fortement exprimés dans les populations de cellules Th2 différenciées (Figure 2.9C). Ceci suggère un rôle potentiel de ce locus lncARN dans la régulation de l'expression de *Bcl2* au cours de la maturation des cellules T.

Chapitre 2. Un régulateur critique de *Bcl2* révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

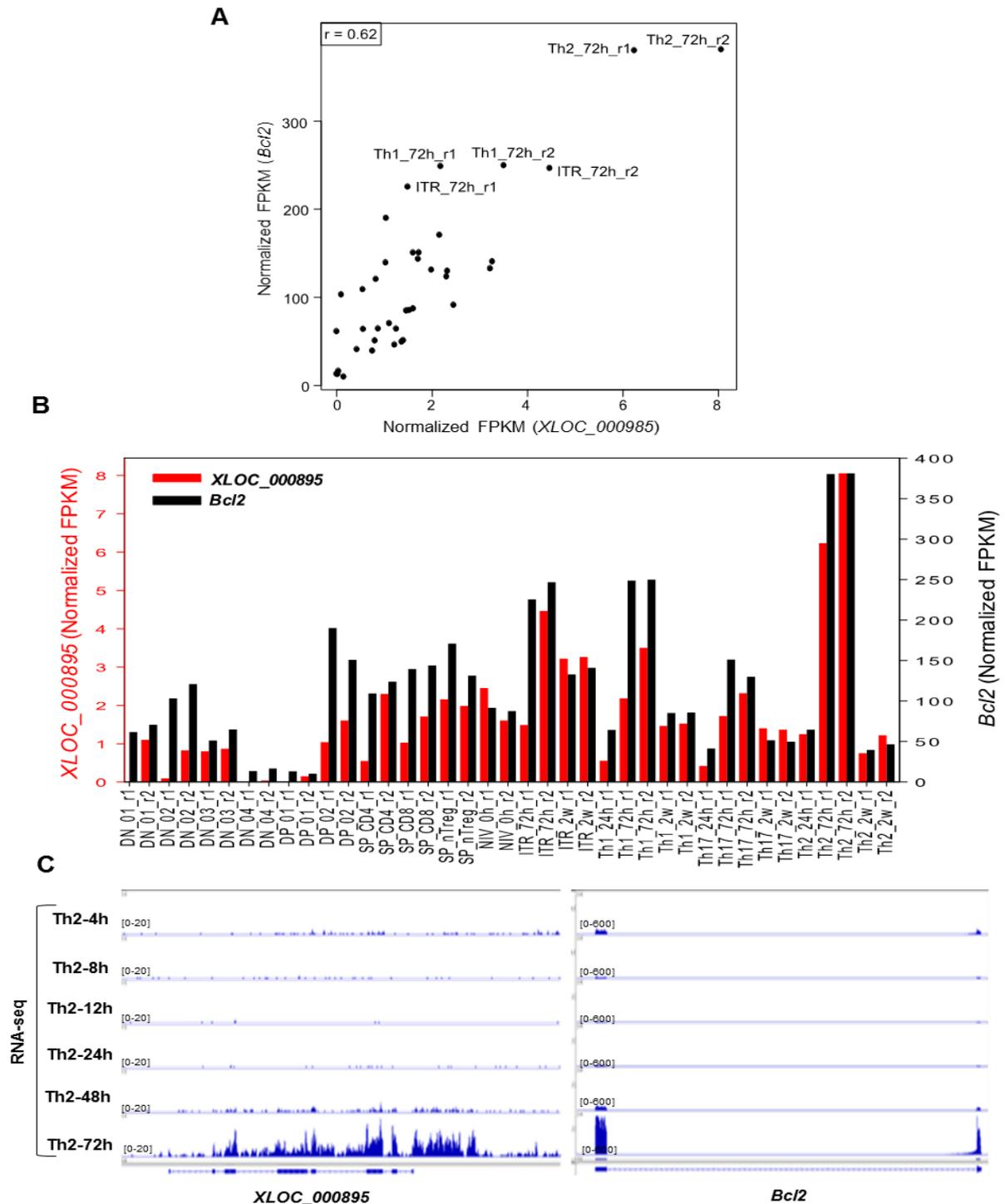
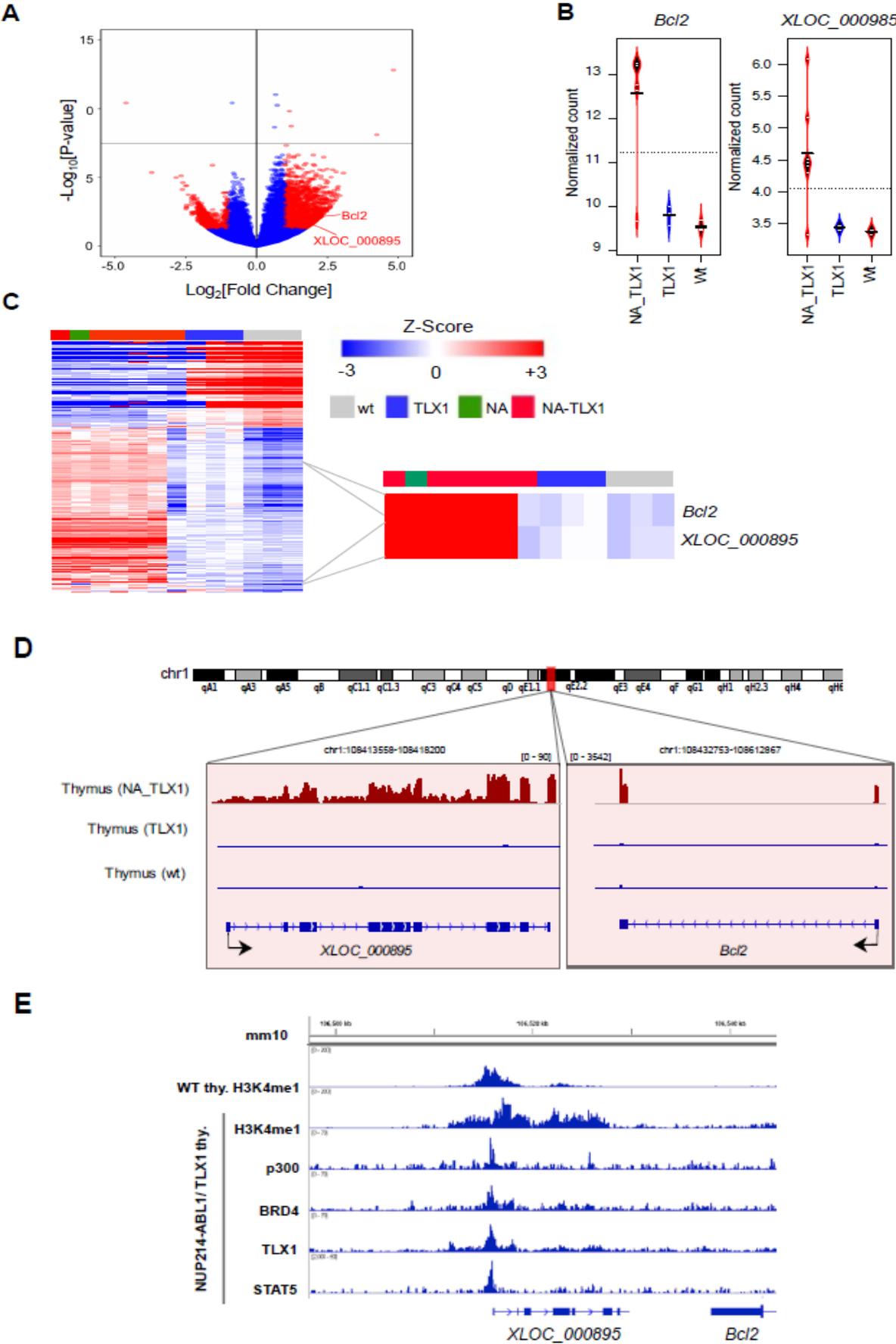


Figure 2.9. L'expression des gènes *XLOC_000895* et *Bcl2* au cours de la différenciation des lymphocytes T. **A)** Nuage de points montrant la corrélation entre l'expression de *Xloc_000895* et *Bcl2* dans des populations de lymphocytes T de souris en utilisant les données d'ARN-seq de *Hu et al.* 2013. **B)** Diagrammes à barres montrant les niveaux d'expression de *Bcl2* et *XLOC_000895* au cours des différentes phases de différenciation des cellules T de souris. **C)** Capture d'écran effectuée à partir l'outil de visualisation génomique IGV pour les données ARN-seq des locus *XLOC_000895* et *Bcl2* au cours de la différenciation des cellules Th2 *in vitro*.

Chapitre 2. Un régulateur critique de *Bcl2* révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

Le gène *Bcl2* est souvent surexprimé dans la grande majorité des lymphomes et des leucémies à cellules T (Coustan-Smith et al., 1996; Feng et al., 2010; Roberts and Huang, 2017). Une étude récente utilisant un modèle murin de leucémie aiguë lymphoblastique T (LAL-T) a identifié *Bcl2* comme cible directe des oncogènes *TLX1* et *NUP214-ABL1* lorsque les deux oncogènes sont exprimés dans les mêmes cellules et ont suggéré qu'il pourrait être une cible thérapeutique potentielle dans ce contexte (Vanden Bempt et al., 2018). Des nouvelles analyses de ces données montrent que le lncARN XLOC_000895 est également induit dans les thymocytes exprimant *TLX1/NUP214-ABL1*, de la même manière que *Bcl2* (Figure 2.10). De plus, nous avons observé une induction de la méthylation de H3K4 au niveau du promoteur de XLOC_000895 ainsi que la liaison de *TLX1* et *STAT5* (une cible directe de la protéine de fusion *NUP214-ABL1*), et des co-facteurs *p300* et *BRD4* dans les thymocytes *TLX1/NUP214-ABL1* positifs (Figure 2.10E). Ces observations suggèrent fortement que XLOC_000895 est une cible directe dans les LAL-T et un régulateur potentiel de *Bcl2*.

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T



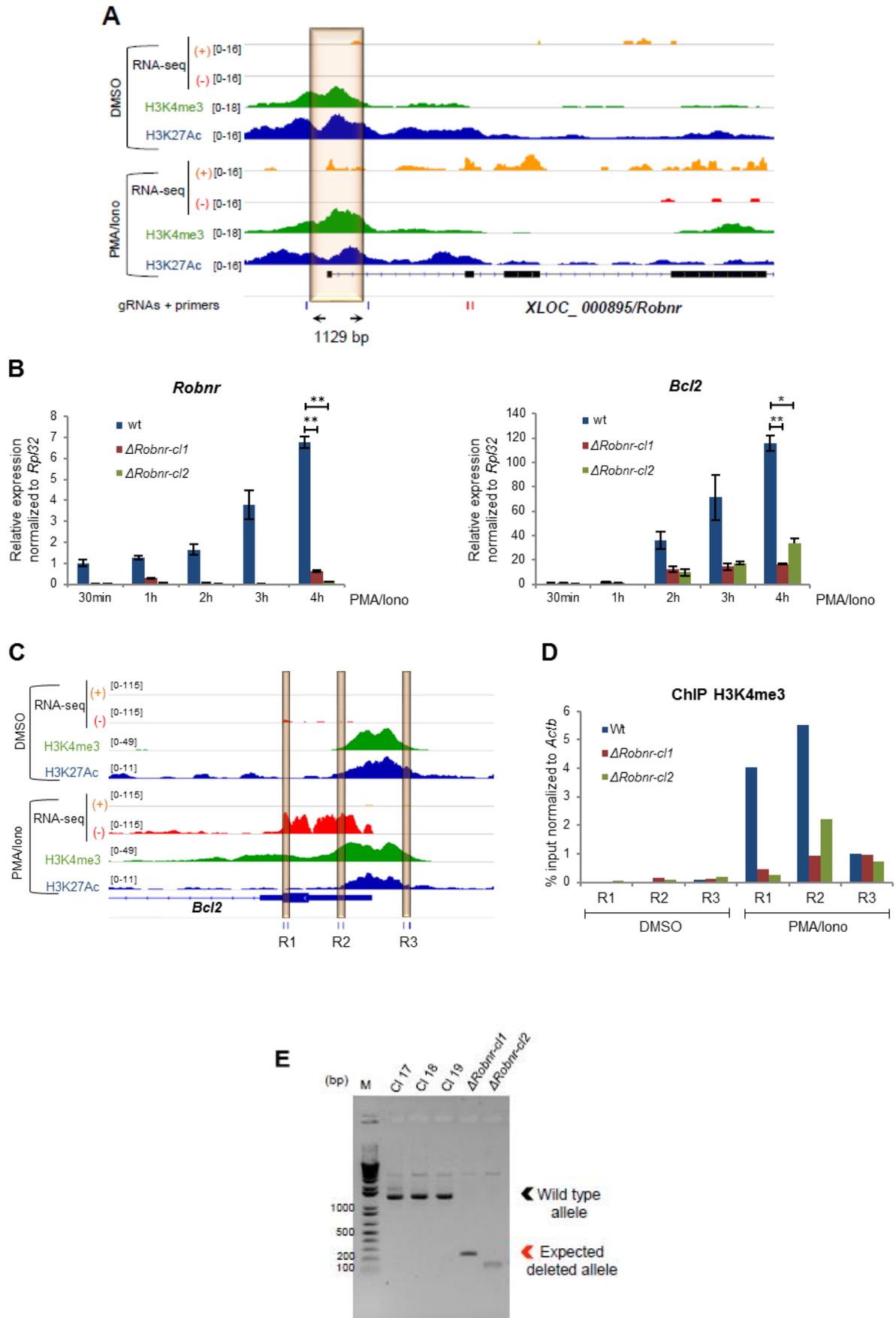
Chapitre 2. Un régulateur critique de *Bcl2* révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

Figure 2.10. L'expression des gènes XLOC_000895 et *Bcl2* dans les thymocytes leucémiques et normaux. **A)** Volcano plot montrant les gènes différentiellement exprimés entre les échantillons leucémique et sauvage (points rouges). *Bcl2* et XLOC_000895 sont souligné. **B)** Bean plots illustrant la distribution d'expression de *Bcl2* (panneau à gauche) et XLOC_000895 (panneau à droite) dans différents modèles de souris transgéniques (NA = NUP214-ABL1). **C)** Heatmap illustrant les gènes différentiellement exprimés entre les modèles sauvages et leucémiques. **D)** Capture d'écran effectuée à partir l'outil de visualisation génomique IGV montrant le signal ARN-seq des locus XLOC_000895 et *Bcl2* dans les thymocytes leucémiques et normaux (les échelles sont indiquées en haut de chaque panneau). **E)** et la couverture génomique par les marques épigénétiques et les facteurs de transcription à proximité du promoteur XLOC_000895.

2.2.4. Le locus XLOC_000895 régule l'expression de *Bcl2* dans les cellules P5424

Nous avons nommé le lncARN XLOC_000895, *Robnr* (ARN non codant régulateur de *Bcl2*). Le lncARN *Robnr* a 3 isoformes partageant un seul site d'initiation de la transcription et 8 exons. Pour investiguer si le locus *Robnr* joue un rôle direct dans la régulation de l'expression de *Bcl2*, nous avons délété le promoteur et la région 5' de cet lncARN en utilisant la technique d'édition génomique CRISPR-Cas9 (Figure 2.11A). Deux clones knock-out homozygotes sont identifiés par un criblage par PCR ($\Delta Robnr-cl1$ et $\Delta Robnr-cl2$; Figure 2.11E). Ensuite, l'expression du gène *Bcl2* est évaluée par RT-qPCR à différents moments de la stimulation par le PMA/ionomycin dans les cellules délétées pour le gène *Robnr* (Figure 2.11B). De manière remarquable, l'expression de *Robnr* est considérablement réduite dans les deux clones de $\Delta Robnr$, démontrant l'inactivation complète du gène *Robnr*. De plus, l'induction de *Bcl2* lors du traitement au PMA/ionomycin est significativement altérée dans les deux clones de $\Delta Robnr$ (Figure 2.11B). Pour évaluer si *Robnr* influence la régulation épigénétique du locus *Bcl2*, nous avons analysé l'enrichissement en H3K4me3 par ChIP-qPCR sur trois régions dynamiques du promoteur *Bcl2* (Figure 2.11C, D). En conséquence, nous avons observé une réduction substantielle de l'enrichissement en H3K4me3 au niveau des deux régions les plus aval du promoteur *Bcl2* dans les clones $\Delta Robnr$ lors du traitement par le PMA/ionomycin (figure 2.11D). Ensemble, nos données appuient fortement l'implication de *Robnr*, ou ses séquences régulatrices associées, dans la régulation du gène *Bcl2*.

Chapitre 2. Un régulateur critique de *Bcl2* révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T



Chapitre 2. Un régulateur critique de *Bcl2* révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

Figure 2.11. Le locus XLOC_000895/*Robnr* régule l'expression de *Bcl2* dans les cellules P5424. **A)** Capture d'écran effectuée à partir l'outil de visualisation génomique IGV montrant les données d'ARN-seq et de ChIP-seq sur le locus XLOC_000895/*Robnr*. La région ciblée par le CRISPR/Cas9 est surlignée en orange. La localisation des ARN guide (ARNg) est désignée par des lignes bleues verticales et la taille de la région ciblée est indiquée. Les amorces utilisées pour l'analyse RT-qPCR sont désignées par des lignes rouges verticales. **B)** Niveaux d'expression relatifs de *Bcl2* et *Robnr* à différents moments du traitement par PMA/ionomycine dans les clones sauvages (wt) et *Robnr* mutés, $\Delta Robnr$ -cl1 et $\Delta Robnr$ -cl2. *Rpl32* est utilisé pour la normalisation. La signification statistique est évaluée après 4h de stimulation à partir de 3 réplicats biologiques par le test t de Welch (non apparié, unilatéral ; *** P <0,001, ** P <0,01, * P <0,1). Les données sont représentées avec un écart type. Les détails sur les séquences d'ARNg, les amorces de PCR sont fournies dans l'annexe 1. **C)** Capture d'écran effectuée à partir l'outil de visualisation génomique IGV montrant les données d'ARN-seq et de ChIP-seq du promoteur *Bcl2*. Les Trois régions génomiques présentant l'enrichissement le plus élevé en H3K4me3 dans les cellules stimulées par PMA/ionomycine sont surlignées en orange. Les amorces utilisées pour la validation ChIP sont indiquées par des lignes bleues verticales. **D)** Analyse ChIP-qPCR de l'enrichissement en H3K4me3 sur le promoteur *Bcl2* dans le type sauvage (wt) et les deux clones *Robnr* mutés, après 4h de traitement par DMSO ou PMA/ionomycine (PMA/Iono). **E)** Validation de la délétion de *Robnr* par la PCR classique dans les clones P5424 correspondants. Les détails sur les amorces de PCR sont fournis dans l'annexe 1.

2.3. Discussion et conclusion

Lors de leur ontogenèse, les lymphocytes T $\alpha\beta$ passent par plusieurs stades de maturation contrôlés par des complexes pré-TCR ou TCR. En particulier, la signalisation en aval du (pré-)TCR déclenche des voies intracellulaires complexes, entraînant des grands changements dans le programme transcriptionnel et épigénétique des gènes associés à la survie, la prolifération et la différenciation cellulaires (Carpenter and Bosselut, 2010). Cependant, une compréhension précise des mécanismes de régulation en jeu lors de la différenciation des lymphocytes T fait encore défaut. Définir les acteurs et les gènes cibles permettant aux cellules T de passer d'un stade immature à un stade mature activé peut non seulement aider à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la régulation de la réponse immunitaire, mais également à faciliter l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les modèles actuels de différenciation des lymphocytes T présentent des limitations dues au défaut de croissance, l'inefficacité de la transfection, ou à la présence d'anomalies non définies, car elles proviennent de blastes de tumeurs naturelles (Bornschein et al., 2018; Del Blanco et al., 2012).

Chapitre 2. Un régulateur critique de *Bcl2* révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

Ici, nous avons montré que la stimulation des cellules P5424 par PMA/ionomycin reproduit globalement le processus de la sélection- β des cellules pro-T, ainsi que des aspects de maturation/activation subséquente des cellules T, y compris l'induction de *Bcl2*. Ce système permettra une meilleure dissection des événements déclenchés par la signalisation (pré-)TCR qui pourraient être omis dans les précurseurs de cellules T primaires triés, issus de populations à l'état d'équilibre. Cette étude a également confirmé que l'intégration des signaux de Ca^{2+} et de kinases est suffisante pour une activation efficace de l'expression génique inductibles dans les précurseurs des lymphocytes T.

Bien que l'activation de la PKC et l'augmentation du niveau de calcium font partie des signaux biochimiques induits par la signalisation du (pré-)TCR au début de la différenciation des cellules T, les signaux induits par le PMA et l'ionomycin ressemblent à une partie, mais pas à la totalité, des signaux nécessaires à la sélection- β et pourraient également refléter les étapes ultérieures de maturation et d'activation des cellules T. En effet, plusieurs différences suggèrent qu'un programme de transcription incomplet est induit par le traitement au PMA/ionomycin des cellules P5424. D'une part, pas tous les gènes régulés par le processus de la sélection- β étaient régulés par la signalisation au PMA/ionomycin ou n'étaient pas régulés de la même manière (Figure 2.3). D'autre part, la sélection- β induit une prolifération cellulaire (Hoffman et al., 1996; Mingueneau et al., 2013), tandis que le traitement par PMA/ionomycin des cellules P5424 entraînait un blocage de la prolifération cellulaire et une induction de l'apoptose (Figure 2.1E-F). Plus généralement, dans les cellules Jurkat, la stimulation par le TCR avec diverses concentrations d'anticorps anti-CD3 a entraîné une activation digitale du NF- κ B (Aifantis et al., 2001; Kingeter et al., 2010), qui est un régulateur connu de sélection- β (Voll et al., 2000). En revanche, le traitement des cellules Jurkat avec diverses concentrations de PMA/ionomycin a entraîné un type d'activation analogue (Kingeter et al., 2010). Ainsi, la stimulation des lignées de lymphocytes T par PMA/ionomycin pourrait mimer certains, mais pas tous les signaux requis lors de la différenciation des lymphocytes T.

Au cours de la dernière décennie, les scientifiques ont montré l'implication complexe des ARN non codant dans la régulation de l'expression des gènes (Geisler and Coller, 2013; Guttman and Rinn, 2012; Morceau et al., 2013). Cependant, peu d'études sur leurs rôles dans le développement, la différenciation et/ou l'activation des lymphocytes T sont disponibles (Wallaert et al., 2017).

Chapitre 2. Un régulateur critique de Bcl2 révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

Dans notre étude, nous avons utilisé le modèle cellulaire P5424 pour étudier l'implication des lncARN dans le développement des lymphocytes T. En utilisant les données d'ARN-seq de cellules P5424 stimulées par le PMA/ionomycine, nous avons identifié 163 lncARN réprimés et 172 induits (Figure 2.2A, B), dont la grande majorité sont *de novo* transcrits. Il est intéressant de noter que les lncARN régulés par la stimulation au PMA/ionomycine se sont avérés être proches des gènes impliqués dans le développement des lymphocytes T (Figure 2.4A). De plus, nous avons observé une co-régulation positive des lncARN et des gènes codants voisins (Figure 2.7). Cette découverte est cohérente avec les rôles émergents des lncARN dans la modulation de l'expression de leurs gènes codants voisins (Orom and Shiekhattar, 2013). Par exemple, il a été suggéré qu'environ 10% des promoteurs des lncARN pourraient réguler les gènes proches (Guttman et al., 2011; Liu et al., 2017). Plusieurs exemples du système hématopoïétique ont démontré une régulation spécifique en cis par des lncARN, notamment *Bcl11b* (Isoda et al., 2017), *IGF1R* (Trimarchi et al., 2014), *Ifng* (Gomez et al., 2013) *y-globine* (Ivaldi et al., 2018) ou *MYC* (Cho et al., 2018). Cependant, les mécanismes cis-régulateurs sous-jacents ne sont pas encore bien compris (Natoli and Andrau, 2012), et pourraient requérir le transcrit lui-même, le processus de transcription ou les éléments cis-régulateurs associés (enhancers ou promoteurs) (Engreitz et al., 2016; Orom and Shiekhattar, 2013; Paralkar et al., 2016).

Pour prouver cela, nous avons évalué le rôle de *XLOC_000895* (*Robnr*), un lncARN induit par PMA/ionomycine situé en aval du gène *Bcl2* (situé à 8,4 kb de la fin de *Bcl2*). La cinétique d'induction de *Robnr* et de *Bcl2* était fortement corrélée. La délétion de *Robnr* par *CRISPR/Cas9* réduit considérablement l'induction de *Bcl2* lors de la stimulation au PMA/ionomycine (Figure 2.11), suggérant que le locus *Robnr* est un régulateur critique de l'expression de *Bcl2* et du marquage épigénétique du promoteur *Bcl2*. Bien qu'il soit possible que le transcrit du lncARN *Robnr* inhibe directement la transcription de *Bcl2*, nos données actuelles n'excluent pas la possibilité que la suppression de *Robnr* inactive un enhancer requis pour la transcription normale de *Bcl2*. Le(s) mécanisme(s) précis conduisant à la régulation de *Bcl2* par le locus *Robnr*, ainsi que la contribution spécifique de la transcription de *Robnr* et/ou de ses éléments régulateurs associés devraient être abordés à l'avenir.

L'homéostasie des cellules T nécessite le maintien d'un équilibre délicat entre les taux de mort cellulaire (apoptose) et de prolifération cellulaire. Certains d'entre les gènes les plus

Chapitre 2. Un régulateur critique de *Bcl2* révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

importants qui contrôlent la mort cellulaire appartiennent à la superfamille *Bcl-2*. Ces protéines déterminent si les cellules T en développement subissent une apoptose dans le thymus ou survivent pour atteindre les organes périphériques (Akashi et al., 1997; Dunkle and He, 2011; Maraskovsky et al., 1997; Sentman et al., 1991; Strasser et al., 1994). Les souris déficientes en *Bcl2* présentent une différenciation normale des lignées B et T, mais elles ne parviennent pas à maintenir l'homéostasie lymphoïde et les lymphocytes meurent par apoptose en réponse à des stimuli d'activation (Veis et al., 1993). Des études antérieures avaient également suggéré que *Bcl2* n'était pas induit lors de la sélection- β , alors que *Bcl2-A1* (*Bcl2*-related protein A1) serait probablement un médiateur important de la survie des thymocytes au cours de ce processus (Mandal et al., 2005). Cependant, *Bcl2-A1* n'est pas exprimé dans les cellules P5424 dans les conditions stimulées ou non stimulées. La *p53* est nécessaire pour l'apoptose induite par les dommages de l'ADN dans les thymocytes (Fotedar et al., 1999; Guidos et al., 1996; Murga and Barber, 2002), ainsi que pour l'élimination des cellules qui ne progressent pas à travers la sélection- β (Haks et al., 1999). L'absence du gène *p53* dans les cellules P5424 pourrait donc biaiser les signaux observés lors de la stimulation au PMA/ionomycin. Tandis que l'expression de *Bcl2-A1* et la répression de *p53* sont bien connues pour contrôler la survie des cellules en aval du pré-TCR, il a été également rapporté que la surexpression de *Bcl2* réduisait la proportion de thymocytes apoptotiques déficients en NFAT5. Cela suggère que NFAT5 peut favoriser la viabilité des thymocytes, au moins en partie, par l'induction de *Bcl2-A1* et *Bcl2* (Berga-Bolanos et al., 2013).

Outre son rôle potentiel dans la sélection- β , la régulation de *Bcl2* par *Robnr* pourrait être importante à d'autres stades de différenciation ou de maturation des cellules T. Par exemple, une co-activation de *Robnr* et de *Bcl2* est observée lors de la différenciation Th2 (Figure 2.9C), indiquant les implications potentielles de ce lncARN dans les réponses immunitaires. Il a été démontré que *Bcl2* était régulé positivement dans les thymocytes DP traités par PMA/ionomycin, reflétant probablement la survie des cellules lors de la sélection positive de cellules DP (Tanahashi et al., 2001). Cependant, il faut enquêter si le gène *Robnr* est également induit dans les cellules soumises à une sélection positive ou pas.

L'évasion de l'apoptose est une caractéristique du cancer humain, elle est souvent médiée par la surexpression des protéines de pro-survie de la famille *Bcl-2* (Hanahan and Weinberg, 2011). Une signalisation défectueuse dans la famille *Bcl-2* permettrait aux

Chapitre 2. Un régulateur critique de *Bcl2* révélé par la découverte systématique de transcrits de lncARN associés à la différenciation des lymphocytes T

thymocytes marqués pour destruction de survivre et d'acquérir des lésions supplémentaires qui favorisent une transformation maligne complète. De plus la surexpression de *Bcl2* peut jouer un rôle déterminant dans la résistance à la chimiothérapie (Adams and Cory, 2007). Par conséquent, les membres pro-survie de la famille Bcl-2 ainsi que les voies qui signalent en amont de ces protéines sont des cibles très attrayantes. Ainsi, les inhibiteurs de *Bcl2* ont été proposés comme une nouvelle stratégie thérapeutique dans les LAL-T (Peirs et al., 2014; Sanda et al., 2013). De façon frappante, *Robnr* et *Bcl2* sont co-induits dans un modèle murin de LAL-T (dépendant de *Bcl2*) (Figure 2.10) (Vanden Bempt et al., 2018). Bien que nous n'ayons pas détecté l'expression de *Robnr* dans les lignées LAL-T humaines (données non présentées), la région humaine orthologue du promoteur de *Robnr* semble être dans une configuration de chromatine ouverte (Knoechel et al., 2014). Cependant, il a été suggéré que cette région était impliquée dans la chimiorésistance dépendante de Notch dans LAL-T et pouvait être spécifiquement ciblée par l'utilisation d'inhibiteurs épigénétiques qui réprimaient l'expression de *Bcl2* (Knoechel et al., 2014).

En conclusion, nous avons identifié les lncARN susceptibles de réguler le développement et les fonctions des cellules T, en utilisant un modèle qui se rapproche au développement précoce des cellules T. Ce modèle *in vitro* devrait nous permettre de mieux comprendre la cinétique des événements de régulation de la transcription induits par la signalisation du (pré-)TCR. La contribution spécifique du locus *Robnr* à la progression de la leucémie et/ou à la fonction et au développement des lymphocytes T par le biais de la régulation de l'apoptose est un résultat très prometteur qui devrait être exploré à l'avenir.

CHAPITRE 3

Conclusions et perspectives

CHAPITRE 3

Conclusions et perspectives

Les longs ARN non codants ou lncARN, sont des molécules d'ARN régulatrices récemment découvertes qui ne codent pas pour des protéines mais qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes et affectent divers processus biologiques au cours du développement normal et pathologique. Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont montré le rôle des lncARN dans le développement, la différenciation et l'activation des lymphocytes T. La majorité des lncARN sont exprimés d'une manière spécifique. Cependant, peu d'ARNm montrent cette propriété. Ces faits suggèrent que les lncARN spécifiques des cellules T jouent un rôle vital dans la complexité du compartiment de ces cellules.

Au cours de ma thèse, nous avons désigné une stratégie pour sélectionner des candidats lncARN/gènes codants voisins co-régulés par la stimulation au PMA/ionomycin à partir des données RNA-seq de la lignée pro-T P5424 stimulée par le PMA/ionomycin. Dans un premier temps nous avons validé l'expression différentielle des lncARN sélectionnés par PCR classique et par RT-qPCR. Ensuite, Grâce à l'étude cinétique de l'expression différentielle des lncARN et leurs gènes codant voisins co-régulés par la stimulation au PMA/ionomycin, nous avons pu sélectionner des candidats lncARN/gènes codants avec des profils bien corrélés suggérant une régulation par le lncARN. Parmi les paires bien corrélées, nous avons constaté que XLOC_000895/*Bcl2* présentait une cinétique d'activation très similaire, suggérant un lien fonctionnel de régulation en cis.

L'analyse d'un ensemble de données ARN-seq publiées couvrant la plupart des étapes de la différenciation des cellules T thymiques et périphériques, révèle que l'expression des gènes XLOC_000895 et *Bcl2* est corrélée tout au long de la différenciation des lymphocytes T et que les deux gènes sont fortement exprimés dans les populations de cellules Th2 différenciées suggérant un rôle potentiel de ce lncARN dans la régulation de l'expression de *Bcl2* au cours de la maturation des cellules T.

En analysant les données d'un modèle murin de LAL-T, nous avons remarqué que *Robnr* et *Bcl2* sont co-induits. De plus, nous avons observé une induction de la méthylation de

Chapitre 3. Conclusions et perspectives

H3K4 au niveau du promoteur de XLOC_000895 ainsi que la liaison des facteurs TLX1 et STAT5, et des co-facteurs p300 et BRD4. Ces observations suggèrent fortement que XLOC_000895 est une cible directe dans les LAL-T et un régulateur potentiel de *Bcl2*.

La délétion de Xloc-000895 (*Robnr*) par la méthode CRISPR-Cas9, affecte l'expression de son gène codant voisin *Bcl2*. De plus, l'analyse de ChIP pour étudier l'enrichissement H3K4me3 a révélé que la délétion de *Robnr* affecte également l'enrichissement en H3K4me3 du locus *Bcl2*. Ensemble ces résultats suggèrent que le locus de *Robnr* est un régulateur critique de l'expression du gène *Bcl2*.

Le modèle d'étude que nous avons étudié, permet de caractériser et analyser les mécanismes conduisant au développement des lymphocytes T matures, comme il ouvrira des perspectives sur le ciblage des lncARN impliqués dans la différenciation des lymphocytes T.

En termes de perspectives, diverses expériences seront entreprises dans le but d'étudier le (s) mécanisme (s) précis conduisant à la régulation de *Bcl2* par le locus *Robnr*.

Il faudrait également voir l'effet de la délétion de *Robnr* sur :

- Les paramètres de vie des cellules P5424.
- L'expression globale des gènes par la réalisation d'une analyse transcriptomique par RNA-seq.

Ainsi, la contribution spécifique du locus *Robnr* dans la progression de la leucémie par le biais de la régulation de l'apoptose devrait être exploré à l'avenir.

Par ailleurs, les autres lncARN sélectionnés dans notre étude pourraient également faire l'objet d'une analyse fonctionnelle. S'il s'avère par la suite que certains de ces lncARN aient un effet sur l'expression de leur gènes codants voisins, leur rôle au cours des différentes étapes de la différenciation lymphoïde sera étudié de façon plus approfondie par l'analyse des données RNA-seq générées par le laboratoire TAGC, qui sont obtenues à partir des thymocytes DN et DP.

Si la fonction de ces lncARN sera confirmée, notre but par la suite est de regarder leur expression au cours de la leucémie aigüe lymphoblastique T et de chercher une cible thérapeutique adéquate.

CHAPITRE 4

Bibliographie

CHAPITRE 4

Bibliographie

- Acuto, O., and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nature Reviews Immunology* 3, 939.
- Adams, J.M., and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337.
- Aderem, A., and Ulevitch, R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406.
- Aifantis, I., Gounari, F., Scorrano, L., Borowski, C., and von Boehmer, H. (2001). Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca²⁺ mobilization and activation of NF- κ B and NFAT. *Nature Immunology* 2, 403.
- Aifantis, I., Raetz, E., and Buonamici, S. (2008). Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nature reviews Immunology* 8, 380-390.
- Akashi, K., Kondo, M., von Freeden-Jeffry, U., Murray, R., and Weissman, I.L. (1997). Bcl-2 Rescues T Lymphopoiesis in Interleukin-7 Receptor-Deficient Mice. *Cell* 89, 1033-1041.
- Akman, H.B., and Bensan, A.E.E. (2014). Noncoding RNAs and cancer. *Turkish Journal of Biology* 38, 817-828.
- Amaral, P.P., Clark, M.B., Gascoigne, D.K., Dinger, M.E., and Mattick, J.S. (2011). lncRNADB: a reference database for long noncoding RNAs. *Nucleic acids research* 39, D146-151.
- Amaral, P.P., Dinger, M.E., Mercer, T.R., and Mattick, J.S. (2008). The Eukaryotic Genome as an RNA Machine. *Science* 319, 1787-1789.
- Amine, B., Vanessa, Z., Lamia, S., and Sophie, E. (2011). La lymphopoïèse T, à la fin d'un long voyage à travers des sites et des potentialités multiples. *Hématologie* 17, 24-39.
- Arslan, Z., Hermanns, V., Wurm, R., Wagner, R., and Pul, Ü. (2014). Detection and characterization of spacer integration intermediates in type I-E CRISPR-Cas system. *Nucleic acids research* 42, 7884-7893.
- Atianand, M.K., and Fitzgerald, K.A. (2014). Long non-coding RNAs and control of gene expression in the immune system. *Trends in molecular medicine* 20, 623-631.
- Aune, T.M., Crooke, P.S., and Spurlock, C.F. (2016). Long noncoding RNAs in T lymphocytes. *Journal of leukocyte biology* 99, 31-44.
- Baker, M. (2011). Long noncoding RNAs: the search for function. *Nature Methods* 8, 379.
- Barndt, R.J., Dai, M., and Zhuang, Y. (2000). Functions of E2A-HEB heterodimers in T-cell development revealed by a dominant negative mutation of HEB. *Molecular and cellular biology* 20, 6677-6685.
- Bassing, C.H., Alt, F.W., Hughes, M.M., D'Auteuil, M., Wehrly, T.D., Woodman, B.B., Gärtner, F., White, J.M., Davidson, L., and Sleckman, B.P. (2000). Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule. *Nature* 405, 583.
- Batista, P.J., and Chang, H.Y. (2013). Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell* 152, 1298-1307.

Chapitre 4. Bibliographie

Berga-Bolanos, R., Alberdi, M., Buxade, M., Aramburu, J., and Lopez-Rodriguez, C. (2013). NFAT5 induction by the pre-T-cell receptor serves as a selective survival signal in T-lymphocyte development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*, 16091-16096.

Bhandoola, A., and Sambandam, A. (2006). From stem cell to T cell: one route or many? *Nature Reviews Immunology* *6*, 117.

Bhartiya, D., Pal, K., Ghosh, S., Kapoor, S., Jalali, S., Panwar, B., Jain, S., Sati, S., Sengupta, S., Sachidanandan, C., *et al.* (2013). lncRNome: a comprehensive knowledgebase of human long noncoding RNAs. *Database : the journal of biological databases and curation* *2013*, bat034.

Bhatia, S. (2013). Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Seminars in oncology* *40*, 666-675.

Bikard, D., Jiang, W., Samai, P., Hochschild, A., Zhang, F., and Marraffini, L.A. (2013). Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic acids research* *41*, 7429-7437.

Blackshaw, S., Harpavat, S., Trimarchi, J., Cai, L., Huang, H., Kuo, W.P., Weber, G., Lee, K., Fraioli, R.E., Cho, S.H., *et al.* (2004). Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS biology* *2*, E247.

Bornschein, S., Demeyer, S., Stirparo, R., Gielen, O., Vicente, C., Geerdens, E., Ghesquiere, B., Aerts, S., Cools, J., and de Bock, C.E. (2018). Defining the molecular basis of oncogenic cooperation between TAL1 expression and Pten deletion in T-ALL using a novel pro-T-cell model system. *Leukemia* *32*, 941-951.

Brannan, C.I., Dees, E.C., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1990). The product of the H19 gene may function as an RNA. *Molecular and cellular biology* *10*, 28-36.

Brockdorff, N. (2013). Noncoding RNA and Polycomb recruitment. *Rna* *19*, 429-442.

Brown, C.J., Hendrich, B.D., Rupert, J.L., Lafrenière, R.G., Xing, Y., Lawrence, J.B., and Willard, H.F. (1992a). The human XIST gene: Analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* *71*, 527-542.

Brown, C.J., Hendrich, B.D., Rupert, J.L., Lafrenière, R.G., Xing, Y., Lawrence, J.B., and Willard, H.F. (1992b). The human XIST gene: Analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell Elsevier*, *3*.

Bu, D., Yu, K., Sun, S., Xie, C., Skogerbo, G., Miao, R., Xiao, H., Liao, Q., Luo, H., Zhao, G., *et al.* (2012). NONCODE v3.0: integrative annotation of long noncoding RNAs. *Nucleic acids research* *40*, D210-215.

Burlacu, B. (2003). Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med* *7*, 249-257.

Cabili, M.N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., and Rinn, J.L. (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes & development* *25*, 1915-1927.

Carpenter, A.C., and Bosselut, R. (2010). Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol* *11*, 666-673.

Carpenter, S., Aiello, D., Atianand, M.K., Ricci, E.P., Gandhi, P., Hall, L.L., Byron, M., Monks, B., Henry-Bezy, M., Lawrence, J.B., *et al.* (2013). A Long Noncoding RNA Mediates Both Activation and Repression of Immune Response Genes. *Science* *341*.

Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* *136*, 642-655.

Chapitre 4. Bibliographie

Casero, D., Sandoval, S., Seet, C.S., Scholes, J., Zhu, Y., Ha, V.L., Luong, A., Parekh, C., and Crooks, G.M. (2015). Long non-coding RNA profiling of human lymphoid progenitor cells reveals transcriptional divergence of B cell and T cell lineages. *Nature Immunology* 16, 1282-1291.

Cavaillé, J. (2004). Des microARN comme s'il en pleuvait.... *Medecine sciences : M/S* 20, 399-401.

Cavazzana-Calvo, M., Six, E., André-Schmutz, I., and Coulombel, L. (2006). Hématopoïèse humaine: des cellules CD34 aux lymphocytes T. *MEDECINE/SCIENCES* 22, 151-159.

Chatenoud, B. (2012). *Immunologie - 6e édition* (Lavoisier).

Chatila, T., Silverman, L., Millerand, R., and Geha, R. (1989). Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *Journal of immunology* 143, 1283-1289.

Chatila T, S.L., Miller R, Geha R (1989). Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *the Journal of Immunology* 143, 1283-1289.

Chen, L.L., and Carmichael, G.G. (2010). Decoding the function of nuclear long non-coding RNAs. *Current opinion in cell biology* 22, 357-364.

Cho, S.W., Kim, S.K., Kim, J.M., and Kim, J.S. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature biotechnology* 31, 230.

Cho, S.W., Xu, J., Sun, R., Mumbach, M.R., Carter, A.C., Chen, Y.G., Yost, K.E., Kim, J., He, J., Nevins, S.A., *et al.* (2018). Promoter of lncRNA Gene PVT1 Is a Tumor-Suppressor DNA Boundary Element. *Cell* 173, 1398-1412 e1322.

Ciofani, M., Schmitt, T.M., Ciofani, A., Michie, A.M., Çuburu, N., Aublin, A., Maryanski, J.L., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2004). Obligatory Role for Cooperative Signaling by Pre-TCR and Notch during Thymocyte Differentiation. *The Journal of Immunology* 172, 5230-5239.

Ciofani, M., and Zuniga-Pflucker, J.C. (2010). Determining gammadelta versus alphass T cell development. *Nature reviews Immunology* 10, 657-663.

Ciofani, M., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2007). The Thymus as an Inductive Site for T Lymphopoiesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23, 463-493.

Clark, B.S., and Blackshaw, S. (2014). Long non-coding RNA-dependent transcriptional regulation in neuronal development and disease. *Frontiers in genetics* 5, 164-164.

Collier, S.P., Collins, P.L., Williams, C.L., Boothby, M.R., and Aune, T.M. (2012). Cutting edge: influence of Tmevpg1, a long intergenic noncoding RNA, on the expression of Ifng by Th1 cells. *Journal of immunology* 189, 2084-2088.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., *et al.* (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, NY)* 339, 819-823.

Coustan-Smith, E., Kitanaka, A., Pui, C.H., McNinch, L., Evans, W.E., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Arico, M., and Campana, D. (1996). Clinical Relevance of BCL-2 Overexpression in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 87.

Curtsinger, J.M., Lins, D.C., Johnson, C.M., and Mescher, M.F. (2005). Signal 3 Tolerant CD8 T Cells Degranulate in Response to Antigen but Lack Granzyme B to Mediate Cytolysis. *The Journal of Immunology* 175, 4392-4399.

Curtsinger, J.M., Lins, D.C., and Mescher, M.F. (2003). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *The Journal of experimental medicine* 197, 1141-1151.

Chapitre 4. Bibliographie

Da Silva, T.A., Oliveira-Brito, P.K.M., Goncalves, T.E., Vendruscolo, P.E., and Roque-Barreira, M.C. (2017). ArtinM Mediates Murine T Cell Activation and Induces Cell Death in Jurkat Human Leukemic T Cells. *International journal of molecular sciences* 18.

Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395.

Del Blanco, B., Garcia-Mariscal, A., Wiest, D.L., and Hernandez-Munain, C. (2012). Tcra enhancer activation by inducible transcription factors downstream of pre-TCR signaling. *Journal of immunology* 188, 3278-3293.

Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D.G., *et al.* (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome research* 22, 1775-1789.

DeSilva, D.R., Urdahl, K.B., and Jenkins, M.K. (1991). Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation. *The Journal of Immunology* 147, 3261-3267.

Dinger, M.E., Pang, K.C., Mercer, T.R., Crowe, M.L., Grimmond, S.M., and Mattick, J.S. (2009). NRED: a database of long noncoding RNA expression. *Nucleic acids research* 37, D122-126.

Djebali, S., Davis, C.A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., *et al.* (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489, 101-108.

Doreen, A.C. (2002). T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunology* 105, 369-374.

Dunkle, A., and He, Y.W. (2011). Apoptosis and autophagy in the regulation of T lymphocyte function. *Immunologic research* 49, 70-86.

Dunoyer, P. (2009). [The battle of Silence : action and inhibition of RNA silencing during plant/virus interactions]. *Medecine sciences : M/S* 25, 505-511.

Dzhagalov, I., Dunkle, A., and He, Y.W. (2008). The anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 promotes T lymphocyte survival at multiple stages. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 181, 521-528.

Egle, A., Harris, A.W., Bath, M.L., O'Reilly, L.A., and Cory, S. (2004). VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood* 103, 2276-2283.

Elling, R., Chan, J., and Fitzgerald, K.A. (2016). Emerging role of long noncoding RNAs as regulators of innate immune cell development and inflammatory gene expression. *European journal of immunology* 46, 504-512.

Engreitz, J.M., Haines, J.E., Perez, E.M., Munson, G., Chen, J., Kane, M., McDonel, P.E., Guttman, M., and Lander, E.S. (2016). Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nature* 539, 452-455.

Eric Sebzda, Sanjeev Mariathasan, Toshiaki Ohteki, Russell Jones, Martin F. Bachmann, a., and Ohashi, P.S. (1999). SELECTION OF THE T CELL REPERTOIRE. *Annual review of immunology* 17, 829-874.

Fatica, A., and Bozzoni, I. (2013). Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics* 15, 7.

Fayard, E., Moncayo, G., Hemmings, B.A., and Holländer, G.A. (2010). Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling in Thymocytes: The Need for Stringent Control. *Science signaling* 3, re5-re5.

Feng, H., Stachura, D.L., White, R.M., Gutierrez, A., Zhang, L., Sanda, T., Jette, C.A., Testa, J.R., Neuberg, D.S., Langenau, D.M., *et al.* (2010). T-lymphoblastic lymphoma cells

Chapitre 4. Bibliographie

express high levels of BCL2, S1P1, and ICAM1, leading to a blockade of tumor cell intravasation. *Cancer cell* *18*, 353-366.

Fitzgerald, K.A., and Caffrey, D.R. (2014). Long noncoding RNAs in innate and adaptive immunity. *Current opinion in immunology* *26*, 140-146.

Fotedar, R., Brickner, H., Saadatmandi, N., Rousselle, T., Diederich, L., Munshi, A., Jung, B., C Reed, J., and Fotedar, A. (1999). Effect of p21(waf1/cip1) transgene on radiation induced apoptosis in T cells. *Oncogene* *18*, 3652-3658.

Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology* *31*, 397-405.

Garitano-Trojaola, A., Agirre, X., Prosper, F., and Fortes, P. (2013). Long non-coding RNAs in haematological malignancies. *International journal of molecular sciences* *14*, 15386-15422.

Gascoyne, R.D., Adomat, S.A., Krajewski, S., Krajewska, M., Horsman, D.E., Tolcher, A.W., O'Reilly, S.E., Hoskins, P., Coldman, A.J., Reed, J.C., *et al.* (1997). Prognostic Significance of Bcl-2 Protein Expression and Bcl-2 Gene Rearrangement in Diffuse Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* *90*, 244-251.

Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, E2579-E2586.

Geisler, S., and Collier, J. (2013a). RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nature reviews Molecular cell biology* *14*, 699-712.

Geisler, S., and Collier, J. (2013b). RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nature reviews Molecular cell biology* *14*, 699-712.

Georgopoulos, K. (2002). Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nature Reviews Immunology* *2*, 162.

Germain, R.N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature reviews Immunology* *2*, 309-322.

Gomez, J.A., Wapinski, O.L., Yang, Y.W., Bureau, J.F., Gopinath, S., Monack, D.M., Chang, H.Y., Brahic, M., and Kirkegaard, K. (2013). The NeST long ncRNA controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the interferon-gamma locus. *Cell* *152*, 743-754.

Gorentla, B.K., and Zhong, X.P. (2012). T cell Receptor Signal Transduction in T lymphocytes. *Journal of clinical & cellular immunology* *2012*, 5.

Gratiot-Deans, J., Merino, R., Nunez, G., and Turka, L.A. (1994). Bcl-2 expression during T-cell development: Early loss and late return occur at specific stages of commitment to differentiation and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* *91*, 10685-10689.

Griffiths-Jones, S. (2003). Rfam: an RNA family database. *Nucleic acids research* *31*, 439-441.

Guidos, C.J., Williams, C.J., Grandal, I., Knowles, G., Huang, M.T., and Danska, J.S. (1996). V(D)J recombination activates a p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. *Genes & development* *10*, 2038-2054.

Gupta, S.K., Piccoli, M.T., and Thum, T. (2014). Non-coding RNAs in cardiovascular ageing. *Ageing research reviews* *17*, 79-85.

Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M.F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B.W., Cassady, J.P., *et al.* (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* *458*, 223-227.

Guttman, M., Donaghey, J., Carey, B.W., Garber, M., Grenier, J.K., Munson, G., Young, G., Lucas, A.B., Ach, R., Bruhn, L., *et al.* (2011). lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* *477*, 295-300.

Chapitre 4. Bibliographie

Guttman, M., and Rinn, J.L. (2012). Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* 482, 339-346.

Haks, M.C., Krimpenfort, P., van den Brakel, J.H.N., and Kruisbeek, A.M. (1999). Pre-TCR Signaling and Inactivation of p53 Induces Crucial Cell Survival Pathways in Pre-T Cells. *Immunity* 11, 91-101.

Han, H., Landreneau, R.J., Santucci, T.S., Tung, M.Y., Macherey, R.S., Shackney, S.E., Sturgis, C.D., Raab, S.S., and Silverman, J.F. (2002). Prognostic value of immunohistochemical expressions of p53, HER-2/neu, and bcl-2 in stage I non-small-cell lung cancer. *Human Pathology* 33, 105-110.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hasserjian, R.P., Aster, J.C., Davi, F., Weinberg, D.S., and Sklar, J. (1996). Modulated expression of notch1 during thymocyte development. *Blood* 88, 970-976.

Hata, A.N., Engelman, J.A., and Faber, A.C. (2015). The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. *Cancer discovery* 5, 475-487.

Hayday, A.C., and Pennington, D.J. (2007). Key factors in the organized chaos of early T cell development. *Nat Immunol* 8, 137-144.

Hayes, S.M., Shores, E.W., and Love, P.E. (2003). An architectural perspective on signaling by the pre-, $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell receptors. *Immunological Reviews* 191, 28-37.

Haywood, M.E., Rose, S.J., Horswell, S., Lees, M.J., Fu, G., Walport, M.J., and Morley, B.J. (2006). Overlapping BXSB congenic intervals, in combination with microarray gene expression, reveal novel lupus candidate genes. *Genes and immunity* 7, 250-263.

Heward, J.A., and Lindsay, M.A. (2014). Long non-coding RNAs in the regulation of the immune response. *Trends in immunology* 35, 408-419.

Hezroni, H., Koppstein, D., Schwartz, M.G., Avrutin, A., Bartel, D.P., and Ulitsky, I. (2015). Principles of long noncoding RNA evolution derived from direct comparison of transcriptomes in 17 species. *Cell reports* 11, 1110-1122.

Hivroz, C. (2005). Everything you ever wanted to know about ZAP-70. *Medecine sciences : M/S* 21, 150-155.

Ho, M.R., Tsai, K.W., and Lin, W.C. (2012). A unified framework of overlapping genes: towards the origination and endogenic regulation. *Genomics* 100, 231-239.

Hoffman, E.S., Passoni, L., Crompton, T., Leu, T.M., Schatz, D.G., Koff, A., Owen, M.J., and Hayday, A.C. (1996). Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. *Genes & development* 10, 948-962.

Holden, N.S., Squires, P.E., Kaur, M., Bland, R., Jones, C.E., and Newton, R. (2008). Phorbol ester-stimulated NF-kappaB-dependent transcription: roles for isoforms of novel protein kinase C. *Cellular signalling* 20, 1338-1348.

Houwing, S., Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D.V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C.B., *et al.* (2007). A Role for Piwi and piRNAs in Germ Cell Maintenance and Transposon Silencing in Zebrafish. *Cell* 129, 69-82.

Hrdlickova, B., de Almeida, R.C., Borek, Z., and Withoff, S. (2014). Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease. *Biochimica et biophysica acta*.

Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, 1262-1278.

Chapitre 4. Bibliographie

Hu, G., Tang, Q., Sharma, S., Yu, F., Escobar, T.M., Muljo, S.A., Zhu, J., and Zhao, K. (2013). Expression and regulation of intergenic long noncoding RNAs during T cell development and differentiation. *Nat Immunol* *14*, 1190-1198.

Hu, W., Alvarez-Dominguez, J.R., and Lodish, H.F. (2012). Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs. *EMBO reports* *13*, 971-983.

Huang, B. (2014). Long non-coding RNA: dancing on immune stage. *Science China Life sciences* *57*, 643-644.

Huang, E.Y., Gallegos, A.M., Richards, S.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2003). Surface Expression of Notch1 on Thymocytes: Correlation with the Double-Negative to Double-Positive Transition. *The Journal of Immunology* *171*, 2296-2304.

Huang, Y., Liu, N., Wang, J.P., Wang, Y.Q., Yu, X.L., Wang, Z.B., Cheng, X.C., and Zou, Q. (2012). Regulatory long non-coding RNA and its functions. *Journal of physiology and biochemistry* *68*, 611-618.

Huarte, M., Guttman, M., Feldser, D., Garber, M., Koziol, M.J., Kenzelmann-Broz, D., Khalil, A.M., Zuk, O., Amit, I., Rabani, M., *et al.* (2010). A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* *142*, 409-419.

Hung, T., Wang, Y., Lin, M.F., Koegel, A.K., Kotake, Y., Grant, G.D., Horlings, H.M., Shah, N., Umbricht, C., Wang, P., *et al.* (2011). Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nature genetics* *43*, 621-629.

Huse, M. (2009). The T-cell-receptor signaling network. *Journal of cell science* *122*, 1269-1273.

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, É., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* *293*, 834-838.

Imamura, K., Imamachi, N., Akizuki, G., Kumakura, M., Kawaguchi, A., Nagata, K., Kato, A., Kawaguchi, Y., Sato, H., Yoneda, M., *et al.* (2014). Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli. *Molecular cell* *53*, 393-406.

Irving, B.A., Alt, F.W., and Killeen, N. (1998). Thymocyte Development in the Absence of Pre-T Cell Receptor Extracellular Immunoglobulin Domains. *Science* *280*, 905-908.

Isaac, E., and Cornelis, M. (2001). THE FUNCTION OF E- AND ID PROTEINS IN LYMPHOCYTE DEVELOPMENT. | *IMMUNOLOGY* *1*.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* *169*, 5429-5433.

Ishizu, H., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2012). Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes & development* *26*, 2361-2373.

Isoda, T., Moore, A.J., He, Z., Chandra, V., Aida, M., Denholtz, M., Piet van Hamburg, J., Fisch, K.M., Chang, A.N., Fahl, S.P., *et al.* (2017). Non-coding Transcription Instructs Chromatin Folding and Compartmentalization to Dictate Enhancer-Promoter Communication and T Cell Fate. *Cell* *171*, 103-119 e118.

Ivaldi, M.S., Diaz, L.F., Chakalova, L., Lee, J., Krivega, I., and Dean, A. (2018). Fetal gamma-globin genes are regulated by the BGLT3 long non-coding RNA locus. *Blood*.

J., R.J.A.T.A.P.K.L.R.S.P.H.V. (2016). g:Profiler-a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic acids research* *44*, W83-89.

Chapitre 4. Bibliographie

Jacquot, S., and Boyer, O. (2006). Heterogeneity and function of human B lymphocytes. *Medecine sciences : M/S* 22, 1075-1080.

Jansen, R., Embden, J.D.A.V., Gaastra, W., and Schouls, L.M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43, 1565-1575.

Jay, A.L. (2001). The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. *Trends in immunology* 22.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, NY)* 337, 816-821.

Jing, Z., Bryan, K.S., Jennifer, A.E., Ji-Joon, S., and Jeannie, T.L. (2008). Polycomb Proteins Targeted by a Short Repeat RNA to the Mouse X Chromosome. *Science*.

John, H.R., and Timothy, J.L. (2002). Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity. *Annual review of immunology* 20, 323-370.

Juliane, B.W.C.F., Janet, K., Jackman, H.F., Sandra, E.W., David, H.W., Robin, J., Guanghui, K., Andrew, C., Chan, a., and Paul, R.F. (1996). Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 Protein-tyrosine Kinase Is Required for T-cell Receptor Function. *The Journal of biological chemistry* 271, 19641-19644.

Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D.A., Dutttagupta, R., Willingham, A.T., Stadler, P.F., Hertel, J., Hackermuller, J., Hofacker, I.L., *et al.* (2007). RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 316, 1484-1488.

Kataoka, M., and Wang, D.Z. (2014). Non-Coding RNAs Including miRNAs and lncRNAs in Cardiovascular Biology and Disease. *Cells* 3, 883-898.

Khalil, A.M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Rivea Morales, D., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B.E., van Oudenaarden, A., *et al.* (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 11667-11672.

Khurana, J.S., and Theurkauf, W. (2010). piRNAs, transposon silencing, and Drosophila germline development. *The Journal of Cell Biology* 191, 905-913.

Kin, T., Yamada, K., Terai, G., Okida, H., Yoshinari, Y., Ono, Y., Kojima, A., Kimura, Y., Komori, T., and Asai, K. (2007). fRNADB: a platform for mining/annotating functional RNA candidates from non-coding RNA sequences. *Nucleic acids research* 35, D145-148.

Kingeter, L.M., Paul, S., Maynard, S.K., Cartwright, N.G., and Schaefer, B.C. (2010). Cutting edge: TCR ligation triggers digital activation of NF-kappaB. *Journal of immunology* 185, 4520-4524.

Kino, T., Hurt, D.E., Ichijo, T., Nader, N., and Chrousos, G.P. (2010). Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Science signaling* 3, ra8.

Kioussis, D., and Pachnis, V. (2009). Immune and Nervous Systems: More Than Just a Superficial Similarity? *Immunity* 31, 705-710.

Kirkin, V., Joos, S., and Zornig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1644, 229-249.

Knoechel, B., Roderick, J.E., Williamson, K.E., Zhu, J., Lohr, J.G., Cotton, M.J., Gillespie, S.M., Fernandez, D., Ku, M., Wang, H., *et al.* (2014). An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics* 46, 364-370.

Chapitre 4. Bibliographie

Koller, B.H., Marrack, P., Kappler, J.W., and Smithies, O. (1990). Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science* 248, 1227-1230.

Komor, A.C., Badran, A.H., and Liu, D.R. (2017). CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell* 168, 20-36.

Krystal, G.W., Armstrong, B.C., and Battey, J.F. (1990). N-myc mRNA forms an RNA-RNA duplex with endogenous antisense transcripts. *Molecular and cellular biology* 10, 4180-4191.

Kwok, Z.H., and Tay, Y. (2017). Long noncoding RNAs: links between human health and disease. *Biochemical Society transactions* 45, 805-812.

Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.C., Bouizegarène, P., and Bogard, M. (2010a). Le monde complexe et mouvant des ARN. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 25, 4-25.

Lamoril, J., Bouizegarène, P., and Bogard, M. (2010b). Le monde complexe et mouvant des ARN. Seconde partie : les microARNs. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 25, 219-240.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

Laouar, Y., Fu, X.Y., Welte, T., and Flavell, R.A. (2003). STAT3 Is Required for Flt3L-Dependent Dendritic Cell Differentiation. *Immunity* 19, 903-912.

Lawrence, E.S. (2002). Signal Transduction Mediated by the T Cell Antigen Receptor: The Role of Adapter Proteins. *Annual review of immunology* 20, 371-394.

Leone, G., Pagano, L., Ben-Yehuda, D., and Voso, M.T. (2007). Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *Haematologica* 92, 1389-1398.

Letourneur, F., and Klausner, R.D. (1992). A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69, 1143-1157.

Li, C., Chen, J., Zhang, K., Feng, B., Wang, R., and Chen, L. (2015a). Progress and Prospects of Long Noncoding RNAs (lncRNAs) in Hepatocellular Carcinoma. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 36, 423-434.

Li, J., Xuan, Z., and Liu, C. (2013). Long non-coding RNAs and complex human diseases. *International journal of molecular sciences* 14, 18790-18808.

Li, J.H., Liu, S.J., Zheng, L.L., Wu, J., Sun, W.J., Wang, Z.L., Zhou, H., Qu, L.H., and Yang, J.H. (2015b). Discovery of Protein-lncRNA Interactions by Integrating Large-Scale CLIP-Seq and RNA-Seq Datasets. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2, 88-88.

Li, Z., Chao, T.C., Chang, K.Y., Lin, N., Patil, V.S., Shimizu, C., Head, S.R., Burns, J.C., and Rana, T.M. (2014). The long noncoding RNA THRIL regulates TNF α expression through its interaction with hnRNPL. *PNAS* 111, 1002-1007.

Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry* 79, 181-211.

Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E., and Petrie, H.T. (2001). Mapping Precursor Movement through the Postnatal Thymus Reveals Specific Microenvironments Supporting Defined Stages of Early Lymphoid Development. *J Exp Med* 194, 127-134.

Liu, C., Bai, B., Skogerbo, G., Cai, L., Deng, W., Zhang, Y., Bu, D., Zhao, Y., and Chen, R. (2005). NONCODE: an integrated knowledge database of non-coding RNAs. *Nucleic acids research* 33, D112-115.

Chapitre 4. Bibliographie

Liu, S.J., Horlbeck, M.A., Cho, S.W., Birk, H.S., Malatesta, M., He, D., Attenello, F.J., Villalta, J.E., Cho, M.Y., Chen, Y., *et al.* (2017). CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells. *Science* 355.

Lopez-Rodriguez, C., Aramburu, J., and Berga-Bolanos, R. (2015). Transcription factors and target genes of pre-TCR signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72, 2305-2321.

MacDonald, H.R., Budd, R.C., and Howe, R.C. (1988). A cd3⁻ subset of cd4⁻8⁺ thymocytes: a rapidly cycling intermediate in the generation of cd4⁺8⁺ cells. *European journal of immunology* 18, 519-524.

Macia, F.S.I., Byrne, M.C., Garcia-Cozar, F., Horton, H.F., and Rao, A. (2002). Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109, 719-731.

Macián, F., López-Rodríguez, C., and Rao, A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20, 2476.

Makarova, K.S., Aravind, L., Grishin, N.V., Rogozin, I.B., and Koonin, E.V. (2002). A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic acids research* 30, 482-496.

Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., *et al.* (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature reviews Microbiology* 9, 467-477.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, NY)* 339, 823-826.

Malissen, B., and Malissen, M. (1996). Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation. *Current opinion in immunology* 8, 383-393.

Malissen, M., Minard, K., Mjolsness, S., Kronenberg, M., Goverman, J., Hunkapiller, T., Prystowsky, M.B., Yoshikai, Y., Fitch, F., Mak, T.W., *et al.* (1984). Mouse T cell antigen receptor: Structure and organization of constant and joining gene segments encoding the α polypeptide. *Cell* 37, 1101-1110.

Mallis, R.J., Bai, K., Arthanari, H., Hussey, R.E., Handley, M., Li, Z., Chingozha, L., Duke-Cohan, J.S., Lu, H., Wang, J.H., *et al.* (2015). Pre-TCR ligand binding impacts thymocyte development before alphabetaTCR expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 8373-8378.

Mandal, M., Borowski, C., Palomero, T., Ferrando, A.A., Oberdoerffer, P., Meng, F., Ruiz-Vela, A., Ciofani, M., Zuniga-Pflucker, J.C., Screpanti, I., *et al.* (2005). The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *The Journal of experimental medicine* 201, 603-614.

Mandal, P.K., and Kazazian, H.H. (2008). SnapShot: Vertebrate Transposons. *Cell* 135, 192-192.e191.

Maraskovsky, E., O'Reilly, L.A., Teepe, M., Corcoran, L.M., Peschon, J.J., and Strasser, A. (1997). Bcl-2 Can Rescue T Lymphocyte Development in Interleukin-7 Receptor-Deficient Mice but Not in Mutant rag-1^{-/-} Mice. *Cell* 89, 1011-1019.

Marino, J.H., Tan, C.P., Taylor, A.A., Bentley, C., Van De Wiele, C.J., Ranne, R., Paliotta, M., Broughan, T.A., and Teague, T.K. (2010). Differential IL-7 responses in developing human thymocytes. *Human immunology* 71, 329-333.

Marques, A.C., and Ponting, C.P. (2014). Intergenic lncRNAs and the evolution of gene expression. *Current opinion in genetics & development* 27, 48-53.

Martin, J., Krzysztow, C., Ines, F., Michael, H., D., J.A., and Emmanuelle, C. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 337.

Chapitre 4. Bibliographie

- Maruyama, R., and Suzuki, H. (2012). Long noncoding RNA involvement in cancer. *BMB reports* 45, 604-611.
- Mathieu, E.L., Belhocine, M., Dao, L.T., Puthier, D., and Spicuglia, S. (2014). Functions of lncRNA in development and diseases. *Med Sci* 30, 790-796.
- McLean, C.Y., Bristor, D., Hiller, M., Clarke, S.L., Schaar, B.T., Lowe, C.B., Wenger, A.M., and Bejerano, G. (2010). GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nature biotechnology* 28, 495-501.
- McVey, M., and Lee, S.E. (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in genetics : TIG* 24, 529-538.
- Milligan, M.J., and Lipovich, L. (2014). Pseudogene-derived lncRNAs: emerging regulators of gene expression. *Frontiers in genetics* 5, 476.
- Mingueneau, M., Kreslavsky, T., Gray, D., Heng, T., Cruse, R., Ericson, J., Bendall, S., Spitzer, M.H., Nolan, G.P., Kobayashi, K., *et al.* (2013). The transcriptional landscape of alphabeta T cell differentiation. *Nat Immunol* 14, 619-632.
- Miyazaki, M., Miyazaki, K., Chen, S., Itoi, M., Miller, M., Lu, L.F., Varki, N., Chang, A.N., Broide, D.H., and Murre, C. (2014). Id2 and Id3 maintain the regulatory T cell pool to suppress inflammatory disease. *Nature Immunology* 15, 767-776.
- Mojica, F.J., Díez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., and Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution* 60, 174-182.
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., and Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology* 36, 244-246.
- Mombaerts, P., Terhorst, C., Jacks, T., Tonegawa, S., and Sancho, J. (1995). Characterization of immature thymocyte lines derived from T-cell receptor or recombination activating gene 1 and p53 double mutant mice. *Immunology* 92, 7420-7424.
- Moore, N.C., Anderson, G., Williams, G.T., Owen, J.J., and Jenkinson, E.J. (1994). Developmental regulation of bc1-2 expression in the thymus. *1994 81 115-1 19 81 115-119*.
- Moran, V.A., Perera, R.J., and Khalil, A.M. (2012). Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs. *Nucleic acids research* 40, 6391-6400.
- Morceau, F., Chateauvieux, S., Gaigneaux, A., Dicato, M., and Diederich, M. (2013). Long and short non-coding RNAs as regulators of hematopoietic differentiation. *International journal of molecular sciences* 14, 14744-14770.
- Mourtada-Maarabouni, M., Hedge, V.L., Kirkham, L., Farzaneh, F., and Williams, G.T. (2008). Growth arrest in human T-cells is controlled by the non-coding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GAS5). *Journal of cell science* 121, 939-946.
- Murga, C., and Barber, D.F. (2002). Molecular Mechanisms of Pre-T Cell Receptor-induced Survival. *Journal of Biological Chemistry* 277, 39156-39162.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M.J., and Janeway, C.A. (2012). *Janeway's immunobiology* (New York: Garland Science).
- Naito, T., Tanaka, H., Naoe, Y., and Taniuchi, I. (2011). Transcriptional control of T-cell development. *International immunology* 23, 661-668.
- Naito, Y., Hino, K., Bono, H., and Ui-Tei, K. (2015). CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics* 31, 1120-1123.

Chapitre 4. Bibliographie

- Natoli, G., and Andrau, J.C. (2012). Noncoding transcription at enhancers: general principles and functional models. *Annual review of genetics* 46, 1-19.
- Novikova, I.V., Hennelly, S.P., and Sanbonmatsu, K.Y. (2013). Tackling structures of long noncoding RNAs. *International journal of molecular sciences* 14, 23672-23684.
- Nuñez, J.K., Lee, A.S.Y., Engelman, A., and Doudna, J.A. (2015). Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature* 519, 193-198.
- Okamura, R.M., Sigvardsson, M., Galceran, J., Verbeek, S., Clevers, H., and Grosschedl, R. (1998). Redundant Regulation of T Cell Differentiation and TCR β Gene Expression by the Transcription Factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity* 8, 11-20.
- Onai, N., Obata-Onai, A., Tussiwand, R., Lanzavecchia, A., and Manz, M.G. (2006). Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development. *Experimental Medicine* 203, 227-238.
- Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C., and Korsmeyer, S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 426, 671.
- Orom, U.A., and Shiekhattar, R. (2013). Long noncoding RNAs usher in a new era in the biology of enhancers. *Cell* 154, 1190-1193.
- Pagani, M., Rossetti, G., Panzeri, I., de Candia, P., Bonnal, R.J., Rossi, R.L., Geginat, J., and Abrignani, S. (2013). Role of microRNAs and long-non-coding RNAs in CD4+ T-cell differentiation. *Immunological Reviews* 253, 82-96.
- Pandey, R.R., Mondal, T., Mohammad, F., Enroth, S., Redrup, L., Komorowski, J., Nagano, T., Mancini-Dinardo, D., and Kanduri, C. (2008). Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Molecular cell* 32, 232-246.
- Pang, K.C., Dinger, M.E., Mercer, T.R., Malquori, L., Grimmond, S.M., Chen, W., and Mattick, J.S. (2009). Genome-wide identification of long noncoding RNAs in CD8+ T cells. *Journal of immunology* 182, 7738-7748.
- Pang, Y., Mao, C., and Liu, S.J. (2018). Encoding activities of non-coding RNAs. *Theranostics* 8, 2496-2507.
- Paralkar, V.R., Taborda, C.C., Huang, P., Yao, Y., Kossenkov, A.V., Prasad, R., Luan, J., Davies, J.O., Hughes, J.R., Hardison, R.C., *et al.* (2016). Unlinking an lncRNA from Its Associated cis Element. *Molecular cell* 62, 104-110.
- Peirs, S., Matthijssens, F., Goossens, S., Van de Walle, I., Ruggero, K., de Bock, C.E., Degryse, S., Canté-Barrett, K., Briot, D., Clappier, E., *et al.* (2014). ABT-199 mediated inhibition of BCL-2 as a novel therapeutic strategy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 124, 3738-3747.
- Pollard, K.M., Cauvi, D.M., Toomey, C.B., Morris, K.V., and Kono, D.H. (2013). Interferon- γ and Systemic Autoimmunity. *Discov Med* 16, 123-131.
- Ponting, C.P., Oliver, P.L., and Reik, W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 136, 629-641.
- Pui, J.C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C., *et al.* (1999). Notch1 Expression in Early Lymphopoiesis Influences B versus T Lineage Determination. *Immunity* 11, 299-308.
- Puvvula, P.K., Desetty, R.D., Pineau, P., Marchio, A., Moon, A., Dejean, A., and Bischof, O. (2014). Long noncoding RNA PANDA and scaffold-attachment-factor SAFA control senescence entry and exit. *Nature communications* 5, 5323.

Chapitre 4. Bibliographie

Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., and Lim, W.A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* *152*, 1173-1183.

Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. (1999). Deficient T Cell Fate Specification in Mice with an Induced Inactivation of Notch1. *Immunity* *10*, 547-558.

Ranzani, V., Rossetti, G., Panzeri, I., Arrigoni, A., Bonnal, R.J., Curti, S., Gruarin, P., Provasi, E., Sugliano, E., Marconi, M., *et al.* (2015). The long intergenic noncoding RNA landscape of human lymphocytes highlights the regulation of T cell differentiation by linc-MAF-4. *Nat Immunol* *16*, 318-325.

Rapicavoli, N.A., Qu, K., Zhang, J., Laberge, R., Chang, H.Y., and Mikhail, M. (2013). A mammalian pseudogene lncRNA at the interface of inflammation and anti-inflammatory therapeutics. *elifesciences* *2*, 16.

Ratner, H.K., Sampson, T.R., and Weiss, D.S. (2016). Overview of CRISPR-Cas9 Biology. *Cold Spring Harbor protocols* *2016*, pdb.top088849-pdb.top088849.

Reimand, J., Arak, T., and Vilo, J. (2011). g:Profiler--a web server for functional interpretation of gene lists (2011 update). *Nucleic acids research* *39*, W307-315.

Reizis, B., and Leder, P. (2001). The Upstream Enhancer Is Necessary and Sufficient for the Expression of the Pre-T Cell Receptor α Gene in Immature T Lymphocytes. *J Exp Med* *194*, 979-990.

Rimer, J., Cohen, I.R., and Friedman, N. (2014). Do all creatures possess an acquired immune system of some sort? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* *36*, 273-281.

Rinn, J.L., and Chang, H.Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annual review of biochemistry* *81*, 145-166.

Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Bruggmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., *et al.* (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* *129*, 1311-1323.

Roberts, A.W., and Huang, D. (2017). Targeting BCL2 With BH3 Mimetics: Basic Science and Clinical Application of Venetoclax in Chronic Lymphocytic Leukemia and Related B Cell Malignancies. *Clinical pharmacology and therapeutics* *101*, 89-98.

Robinson, V.L. (2009). Rethinking the central dogma: Noncoding RNAs are biologically relevant. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* *27*, 304-306.

Rodriguez-Valera, F., Juez, G., and Kushner, D.J. (1983). *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a New Carbohydrate-Utilizing Extreme Halophile. *Systematic and Applied Microbiology* *4*, 369-381.

Romero, Y., Calvel, P., and Nef, S. (2012). Petits ARN non codants et spermatogénèse. *Medecine sciences : M/S* *28*, 490-496.

Rosalind, C.L., Rhonda, L.F., and A., V. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843-854.

Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annual review of immunology* *24*, 419-466.

Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., and Ito, M. (2010). Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *American journal of reproductive immunology* *63*, 601-610.

Chapitre 4. Bibliographie

Sanda, T., Tyner, J.W., Gutierrez, A., Ngo, V.N., Glover, J., Chang, B.H., Yost, A., Ma, W., Fleischman, A.G., Zhou, W., *et al.* (2013). TYK2-STAT1-BCL2 pathway dependence in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer discovery* 3, 564-577.

Sander, J.D., and Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology* 32, 347-355.

Satpathy, A.T., and Chang, H.Y. (2015). Long noncoding RNA in hematopoiesis and immunity. *Immunity* 42, 792-804.

Savignac, M., Mellstrom, B., and Naranjo, J.R. (2007). Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 454, 523-533.

Schlessinger, J. (1993). How receptor tyrosine kinases activate ras. *Trends in biochemical sciences* 18, 273-275.

Schneider, C., King, R.M., and Philipson, L. (1988). Genes Specifically Expressed at Growth Arrest of Mammalian Cells. *Cell* 54, 787-793.

Schonrock, N., Harvey, R.P., and Mattick, J.S. (2012). Long noncoding RNAs in cardiac development and pathophysiology. *Circulation research* 111, 1349-1362.

Sentman, C.L., Shutter, J.R., Hockenbery, D., Kanagawa, O., and Korsmeyer, S.J. (1991). bcl-2 Inhibits Multiple Forms of Apoptosis but Not Negative Selection in Thymocytes. *Cell* 67, 879-888.

Seo, W., and Taniuchi, I. (2016). Transcriptional regulation of early T-cell development in the thymus. *European journal of immunology* 46, 531-538.

Shah, D.K., and Zúñiga-Pflücker, J.C. (2014). An Overview of the Intrathymic Intricacies of T Cell Development. *The Journal of Immunology* 192, 4017-4023.

Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., Kundig, T.M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B., and Mak, T.W. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261, 609-612.

Singer, A., Adoro, S., and Park, J.H. (2008). Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nature reviews Immunology* 8, 788-801.

Siri, A., de Boysson, H., and Boursier, G. (2012). Regulatory T lymphocytes CD4(+): current issues. *Medecine sciences : M/S* 28, 646-651.

Smelty, P., Marchal, C., Jaffredo, T., Sire, J.Y., and Fellah, J.S. (2011). [Reappraisal of the role of pTalpha for pre-TCR signaling: lessons from non mammalian vertebrates]. *Medecine sciences : M/S* 27, 346-348.

Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. (2009). T cell activation. *Annual review of immunology* 27, 591-619.

Sohini, C., Aritra, D., Ranjan, K.M., Sudipto, S., and Zhumur, G. (2014). LncRBase: An Enriched Resource for lncRNA Information. *PLoS ONE* 7.

Spicuglia, S., Bonnet, M., and Ferrier, P. (2007). Alpha/beta versus gamma/delta T cell development: a choice linked to the transcription factor Sox13. *Medecine sciences : M/S* 23, 457-458.

Spurlock, C.F., Tossberg, J.T., Guo, Y., Collier, S.P., Crooke, P.S., and Aune, T.M. (2015). Expression and functions of long noncoding RNAs during human T helper cell differentiation. *Nature communications* 6.

Spurlock, C.F., Tossberg, J.T., Matlock, B.K., Olsen, N.J., and Aune, T.M. (2014). Methotrexate Inhibits NF- κ B Activity Via Long Intergenic (Noncoding) RNA-p21 Induction. *Arthritis & Rheumatology* 66, 2947-2957.

Chapitre 4. Bibliographie

Staal, F.J.T., and Sen, J.M. (2008). The canonical Wnt signaling pathway plays an important role in lymphopoiesis and hematopoiesis. *European journal of immunology* 38, 1788-1794.

Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology* 21, 139-176.

Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature reviews Immunology* 5, 189-200.

Strasser, A., Harris, A.W., Corcoran, L.M., and Cory, S. (1994). Bcl-2 expression promotes B- but not T-lymphoid development in scid mice. *Nature* 368, 457-460.

Subramanian, A., Kuehn, H., Gould, J., Tamayo, P., and Mesirov, J.P. (2007). GSEA-P: a desktop application for Gene Set Enrichment Analysis. *Bioinformatics* 23, 3251-3253.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., *et al.* (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15545-15550.

Sun, M., and Kraus, W.L. (2014). From Discovery to Function: The Expanding Roles of Long Non-Coding RNAs in Physiology and Disease. *Endocrine reviews*, er20141034.

Supratim, C. (2010). Small Noncoding RNAs: Biogenesis, Function, and Emerging Significance in Toxicology. *J BIOCHEM MOLECULAR TOXICOLOGY* 24.

Szymanski, M., Erdmann, V.A., and Barciszewski, J. (2007). Noncoding RNAs database (ncRNAdb). *Nucleic acids research* 35, D162-164.

Taft, R.J., Pheasant, M., and Mattick, J.S. (2007). The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 29, 288-299.

Tanahashi, M., Yokoyama, T., Kobayashi, Y., Yamakawa, Y., Maeda, M., and Fujii, Y. (2001). Effect of phorbol ester and calcium ionophore on human thymocytes. *Human Immunology* 62, 771-781.

Taniuchi, I., and Littman, D.R. (2004). Epigenetic gene silencing by Runx proteins. *Oncogene* 23, 4341-4345.

Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.C., Komori, T., Ito, Y., and Littman, D.R. (2002). Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 111, 621-633.

Taubeneck, U. (1967). *J. D. Watson: Molecular Biology of the Gene*. 494 S., 195 Abb., 24 Tab. New York 1965: W. A. Benjamin, Inc. \$ 11.00. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* 7, 171-171.

Tawfik, K., Kimler, B.F., Davis, M.K., Fan, F., and Tawfik, O. (2012). Prognostic significance of Bcl-2 in invasive mammary carcinomas: a comparative clinicopathologic study between “triple-negative” and non-“triple-negative” tumors. *Human Pathology* 43, 23-30.

The, E.P.C., Birney, E., Stamatoyannopoulos, J.A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T.R., Margulies, E.H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E.T., *et al.* (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799.

Thorvaldsdottir, H., Robinson, J.T., and Mesirov, J.P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics* 14, 178-192.

Chapitre 4. Bibliographie

Tian, P., Wang, J., Shen, X., Rey, J.F., Yuan, Q., and Yan, Y. (2017). Fundamental CRISPR-Cas9 tools and current applications in microbial systems. *Synthetic and Systems Biotechnology* 2, 219-225.

Trimarchi, T., Bilal, E., Ntziachristos, P., Fabbri, G., Dalla-Favera, R., Tsirogos, A., and Aifantis, I. (2014). Genome-wide mapping and characterization of Notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia. *Cell* 158, 593-606.

Tripathi, V., Ellis, J.D., Shen, Z., Song, D.Y., Pan, Q., Watt, A.T., Freier, S.M., Bennett, C.F., Sharma, A., Bubulya, P.A., *et al.* (2010). The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Molecular cell* 39, 925-938.

Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226, 1097-1099.

Turner, M., Galloway, A., and Vigorito, E. (2014). Noncoding RNA and its associated proteins as regulatory elements of the immune system. *Nat Immunol* 15, 484-491.

Ulitsky, I., and Bartel, D.P. (2013). lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell* 154, 26-46.

Vagin, V.V., Sigova, A., Li, C.H., Seitz, H., Gvozdev, V., and Zamore, P.D. (2006). A Distinct Small RNA Pathway Silences Selfish Genetic Elements in the Germline. *Science* 313, 320-324.

Vanden Bempt, M., Demeyer, S., Broux, M., De Bie, J., Bornschein, S., Mentens, N., Vandepoel, R., Geerdens, E., Radaelli, E., Bornhauser, B.C., *et al.* (2018). Cooperative Enhancer Activation by TLX1 and STAT5 Drives Development of NUP214-ABL1/TLX1-Positive T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer cell* 34, 271-285 e277.

Vanhille, L., Griffon, A., Maqbool, M.A., Zacarias-Cabeza, J., Dao, L.T., Fernandez, N., Ballester, B., Andrau, J.C., and Spicuglia, S. (2015). High-throughput and quantitative assessment of enhancer activity in mammals by CapStarr-seq. *Nature communications* 6, 6905.

Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229-240.

Vigneau, S., Rohrlich, P.S., Brahic, M., and Bureau, J.F. (2003). Tmevpg1, a Candidate Gene for the Control of Theiler's Virus Persistence, Could Be Implicated in the Regulation of Gamma Interferon. *Journal of Virology* 77, 5632-5638.

Volders, P.J., Helsen, K., Wang, X., Menten, B., Martens, L., Gevaert, K., Vandesompele, J., and Mestdagh, P. (2013). LNCipedia: a database for annotated human lincRNA transcript sequences and structures. *Nucleic acids research* 41, D246-251.

Voll, R.E., Jimi, E., Phillips, R.J., Barber, D.F., Rincon, M., Hayday, A.C., Flavell, R.A., and Ghosh, S. (2000). NF- κ B Activation by the Pre-T Cell Receptor Serves as a Selective Survival Signal in T Lymphocyte Development. *Immunity* 13, 677-689.

Wallaert, A., Durinck, K., Taghon, T., Van Vlierberghe, P., and Speleman, F. (2017). T-ALL and thymocytes: a message of noncoding RNAs. *J Hematol Oncol* 10, 66.

Walsh, K.M., de Smith, A.J., Chokkalingam, A.P., Metayer, C., Roberts, W., Barcellos, L.F., Wiemels, J.L., and Buffler, P.A. (2013). GATA3 risk alleles are associated with ancestral components in Hispanic children with ALL. *Blood* 122, 3385-3387.

Wang, P., Xue, Y., Han, Y., Lin, L., Wu, C., Xu, S., Jiang, Z., Xu, J., Liu, Q., and Cao, X. (2014). The STAT3-binding long noncoding RNA linc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science* 344, 310-313.

Chapitre 4. Bibliographie

Wapinski, O., and Chang, H.Y. (2011). Long noncoding RNAs and human disease. *Trends in cell biology* 21, 354-361.

Weber, B.N., Chi, A.W., Chavez, A., Yashiro-Ohtani, Y., Yang, Q., Shestova, O., and Bhandoola, A. (2011). A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature* 476, 63-68.

Weirick, T., John, D., Dimmeler, S., and Uchida, S. (2015). C-It-Loci: a knowledge database for tissue-enriched loci. *Bioinformatics* 31, 3537-3543.

Weiss, L.M., Warnke, R.A., Sklar, J., and Cleary, M.L. (1987). Molecular Analysis of the T(14;18) Chromosomal Translocation in Malignant Lymphomas. *New England Journal of Medicine* 317, 1185-1189.

Williams, G.T., Mourrada-Maarabouni, M., and Farzaneh, F. (2011). A critical role for non-coding RNA GAS5 in growth arrest and rapamycin inhibition in human T-lymphocytes. *Biochemical Society transactions* 39, 482-486.

Willingham, A.T., Orth, A.P., Batalov, S., Peters, E.C., Wen, B.G., Aza-Blanc, P., Hogenesch, J.B., and Schultz, P.G. (2005). A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT. *Science* 309, 1570-1573.

Wolfer, A., Bakker, T., Wilson, A., Nicolas, M., Ioannidis, V., Littman, D.R., Wilson, C.B., Held, W., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2001). Inactivation of Notch1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8 T cell development. *Nature Immunology* 2, 235.

Wu, T., Wang, J., Liu, C., Zhang, Y., Shi, B., Zhu, X., Zhang, Z., Skogerbo, G., Chen, L., Lu, H., *et al.* (2006). NPInter: the noncoding RNAs and protein related biomacromolecules interaction database. *Nucleic acids research* 34, D150-152.

Xia, F., Dong, F., Yang, Y., Huang, A., Chen, S., Sun, D., Xiong, S., and Zhang, J. (2014). Dynamic Transcription of Long Non-Coding RNA Genes during CD4+ T Cell Development and Activation. *PloS one* 9.

Yap, K.L., Li, S., Muñoz-Cabello, A.M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M.J., and Zhou, M.M. (2010). Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Molecular cell* 38, 662-674.

Yu, S., Zhou, X.Q., Steinke, F.C., Liu, C., Chen, S.C., Zagorodna, O., Jing, X., Yokota, Y., Meyerholz, D.K., Mullighan, C.G., *et al.* (2012). The TCF-1 and LEF-1 Transcription Factors Have Cooperative and Opposing Roles in T Cell Development and Malignancy. *Immunity* 37, 813-826.

Yue, F., Cheng, Y., Breschi, A., Vierstra, J., Wu, W., Ryba, T., Sandstrom, R., Ma, Z., Davis, C., Pope, B.D., *et al.* (2014). A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* 515, 355-364.

Yui, M.A., and Rothenberg, E.V. (2014). Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. *Nature reviews Immunology* 14, 529-545.

Zhang, J., Mikecz, K., Finnegan, A., and Glant, T.T. (2000). Spontaneous Thymocyte Apoptosis Is Regulated by a Mitochondrion-Mediated Signaling Pathway. *The Journal of Immunology* 165, 2970-2974.

Zhang, N., and He, Y.W. (2005). The Antiapoptotic Protein Bcl-xL Is Dispensable for the Development of Effector and Memory T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 174, 6967-6973.

Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P., and Samelson, L.E. (1998). LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92, 83-92.

Chapitre 4. Bibliographie

Zhao, Z., Bai, J., Wu, A., Wang, Y., Zhang, J., Wang, Z., Li, Y., Xu, J., and Li, X. (2015). Co-LncRNA: investigating the lncRNA combinatorial effects in GO annotations and KEGG pathways based on human RNA-Seq data. *Database : the journal of biological databases and curation* 2015.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557-1569.

Zhu, L., and Xu, P.C. (2013). Downregulated LncRNA-ANCR promotes osteoblast differentiation by targeting EZH2 and regulating Runx2 expression. *Biochemical and biophysical research communications* 432, 612-617.

Annexe 1

Annexe 1: Liste des amorces utilisées dans cette étude

Liste des amorces utilisées pour la PCR classique

Nom d'amorce	séquence d'amorce	Température d'hybridation
<i>Egr-1</i>	R:TTCTTTATGCCAACTTGATGGTCTAG F:CTTCACCTCTATCCAAAGGACTTGA	60°
<i>Ptα</i>	R:TGCCATTGCCAGCTGAGA F:CTGGCTCCACCCATCACACT	60°
<i>Act-b</i>	R:CATGTCGTCCCAGTTGGTAA F:GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT	60°
<i>XLOC_011166</i>	R:AGGTGACAGGGCCTTTCTTG F:GAGACCAGGAAGCCACTGTC	63°
<i>XLOC_031561</i>	R:CGGCTGGTGTTCAGTTAG F:CTGCTCAGTCACCCCTTTGT	62°
<i>XLOC_004796</i>	R:GATCCAGTTCTGTGTGTGAGTCT F:ACAGGGCTCCTCAGGAAAGA	62°
<i>XLOC_000895</i>	R:TGCTGCTCTGGGATCTCTCA F:CCGGACATGTGTTTCAAGTCTCA	64°
<i>NR_040266</i>	R:TGGTGGCTGACATTCATTCCT F:TCCTGTGGCAGCTGAATTCC	64°
<i>XLOC_005923</i>	R:AGACTGAGATGGGAAGGGA F:CAAAGGGAGCTGGGGATGAG	62°
<i>XLOC_010913</i>	R:TGCTAGGATTCAGGCTTGGTG F:AGCTGTGTAGGCAAGTGAGC	60°
<i>XLOC_009485</i>	R:AAGGGTGGGGAAAGGATGGA F:CACCCTGACACTCTCGAAGC	60°

Annexe 1

Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR

Nom d'amorce	séquence d'amorce	Température d'hybridation
<i>Egr-1</i>	R:TTCTTTATGCCAACTTGATGGTCTAG F:CTTCACCTCTATCCAAAGGACTTGA	60°
<i>Pta</i>	R:TGCCATTGCCAGCTGAGA F:CTGGCTCCACCCATCACACT	60°
<i>Act-b</i>	R:CATGTCGTCCCAGTTGGTAA F:GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT	60°
<i>Tcrα</i>	R:GAGGATTCCGAGTCCCATAAC F:AAAGAGACCAACGCCACCTAC	60°
<i>XLOC_011166</i>	F:TGGTTATCAGGACAGTGAGCAC R:AGGTGACAGGGCCTTTCTTG	60°
<i>Bcl11b</i>	R:TGGGAAGAGGAGGCAGCTAT F:AAAGGCATCTGTCCCAAGCA	60°
<i>XLOC_031561</i>	R:CGGGTACAGGGACCCTTCTA F:CTGCTCTCACACTGGCTGAA	60°
<i>Lef1</i>	R:GGCTTGTCTGACCACCTAATG F:TCTTCGCCGAGATCAGTCAT	60°
<i>XLOC_004796</i>	R:CGCTCCTGTAATTTGTCCTCCT F:ACAGGGCTCCTCAGGAAAGA	60°
<i>Ifngr1</i>	R:TCCTTCTTCCTCCTGATCTCCA F:GGGCCAGAGTTAAAGCTAAGGT	60°
<i>XLOC_000895</i>	R:TGCTGCTCTGGGATCTCTCA F:CCGGACATGTGTTTCACTCTCA	64°
<i>Bcl2</i>	R:GCTGGGGCCATATAGTTCCA F:GAGAGCGTCAACAGGGAGAT	60°
<i>NR_040266</i>	R:ACCCTCCAAGCTTTGTATGCA F:TCCTGTGGCAGCTGAATTCC	60°
<i>Cd69</i>	R:CCAGAATATCGCTTCAGAAACGT F:TCTCCACCACAACCAAGAGT	60°
<i>XLOC_005923</i>	F:TCCTACTTTTCTGTACCCTCCCA R:AGACACTGAGATGGGAAGGGA	60°
<i>Ikzf1</i>	R:GCTCATCCCCTTCATCTGGA F:TGGATGTCGATGAGGGTCAA	60°
<i>Xloc_010913</i>	R:TCCAGGTGATGAATGTAGCTCC F:AGCTGTGTAGGCAAGTGAGC	60°
<i>Fut8</i>	R:GAAGGCTGCTTCTGTTCCCA F:CCACAACCTTGGCTGGAAAAG	60°
<i>XLOC_009485</i>	R:TTCTACAGAGGAGGTGCGGT F:AGAAGGCAAAGCTAGCTCGG	60°

Annexe 1

<i>Id2</i>	R: GCCACAGAGTACTTTGCTATCA F: CACCCTGAACACGGACATCA	60°
------------	--	-----

Liste des amorces utilisées pour la ChIP-qPCR

Nom d'amorce	séquence d'amorce	Température d'hybridation
<i>Bcl2(R1)</i>	R: ACCTACCCAGCCTCCGTTAT F:GAGAGCGTCAACAGGGAGAT	60°
<i>Bcl2(R2)</i>	R:GAATCGGGAGTTGGGGTCTG F: TGCGGTGCTCTTGAGATCTC	
<i>Bcl2(R3)</i>	R:TCAGCTAACCATGTGAACCCC F: TCCTGGAGACTGTGTTGGGA	

Les séquences des ARN Guides

Nom	Séquence (5'-3')	Les coordonnées génomiques	Lataille de la région déletée (bp)
Bcl2_G1	CCAGGGATTTAGGTCACATATTG	chr1:108411996-108412018	1129
Bcl2_G2	AAGGAATTTAACACTTGAAGTGG	chr1:108413103-108413125	

Liste des amorces utilisées pour détecter la délétion

Name	Séquence (5'-3')	Les coordonnées génomiques	Taille de la bande (bp)	
			Avec délétion	Sans délétion
Bcl2_F	ACACACAGGTCCAAGTCAAGG	chr1:108411879-108411899	217	1346
Bcl2_R	GCCACCTCTTTAGCCCAGAA	chr1:108413205-108413224		

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

A critical regulator of Bcl2 revealed by systematic transcript discovery of lncRNAs associated with T-cell differentiation

Wiam Saadi^{1,2,3}, Yasmina Kermezli^{1,2,3}, Lan T. M. Dao^{1,2,4}, Evelyne Mathieu^{1,2}, David Santiago-Algarra^{1,2}, Iris Manosalva^{1,2}, Magali Torres^{1,2}, Mohamed Belhocine^{1,2,5}, Lydie Pradel^{1,2}, Beatrice Loriod¹, Mourad Aribi³, Denis Puthier^{1,2} & Salvatore Spicuglia^{1,2}

Normal T-cell differentiation requires a complex regulatory network which supports a series of maturation steps, including lineage commitment, T-cell receptor (TCR) gene rearrangement, and thymic positive and negative selection. However, the underlying molecular mechanisms are difficult to assess due to limited T-cell models. Here we explore the use of the pro-T-cell line P5424 to study early T-cell differentiation. Stimulation of P5424 cells by the calcium ionophore ionomycin together with PMA resulted in gene regulation of T-cell differentiation and activation markers, partially mimicking the CD4⁺CD8⁻ double negative (DN) to double positive (DP) transition and some aspects of subsequent T-cell maturation and activation. Global analysis of gene expression, along with kinetic experiments, revealed a significant association between the dynamic expression of coding genes and neighbor lncRNAs including many newly-discovered transcripts, thus suggesting potential co-regulation. CRISPR/Cas9-mediated genetic deletion of *Robnr*, an inducible lncRNA located downstream of the anti-apoptotic gene *Bcl2*, demonstrated a critical role of the *Robnr* locus in the induction of *Bcl2*. Thus, the pro-T-cell line P5424 is a powerful model system to characterize regulatory networks involved in early T-cell differentiation and maturation.

T lymphocytes are one of the main players of the adaptive immunity. T-cell development in the thymus requires temporally regulated rearrangements of the T-cell receptor (*Tcr*) genes and a series of selection events, whereby newly assembled TCR complexes signal for cell survival, proliferation and differentiation processes^{1,2}. The *Tcrb* locus rearranges in the most immature thymocytes, known as CD4⁻CD8⁻ double-negative (DN) thymocytes. Thymocytes that have successfully rearranged a *Tcrb* allele differentiate into CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) thymocytes in a process known as β -selection. This process is driven by signaling through the pre-TCR, which is composed of TCR β and the invariant pT α protein, and through cooperation with the Notch signaling pathway^{1,3}. The β -selection process triggers the activation of *Tcra* rearrangements and transcription along with complex intracellular pathways resulting in wide changes in the transcriptional and epigenetic programs of the immature T cells⁴⁻⁶. The expression of a functionally rearranged *Tcra* gene leads to the formation of a variable TCR $\alpha\beta$ heterodimer and, ultimately, to the selection of TCR $\alpha\beta$ expressing cells which will terminally differentiate into CD4⁺ or CD8⁺ single positive (SP) T cells. Disruptions of these genetic and epigenetic processes might result in oncogenic transformation of T-cell precursors (*i.e.* leukemia and lymphoma^{7,8}) or immune-related pathologies⁹.

Long non-coding RNAs (lncRNAs) are a heterogeneous group of non-coding genes transcribed by RNA polymerase II from intergenic or intragenic regions and varying in length from 200 nt to over 100 kb¹⁰. Many studies have demonstrated that lncRNAs are key components of the repertoire of regulatory elements that control normal

¹Aix-Marseille University, Inserm, TAGC, UMR1090, Marseille, France. ²Equipe Labélisée Ligue Contre le Cancer, Marseille, France. ³Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria. ⁴Present address: Vinmec Research Institute of Stem cell and Gene technology (VRISG), Hanoi, Vietnam. ⁵Present address: Molecular Biology and Genetics Laboratory, Dubai, United Arab Emirates. Wiam Saadi and Yasmina Kermezli contributed equally. Mourad Aribi, Denis Puthier and Salvatore Spicuglia jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.P. (email: denis.puthier@univ-amu.fr) or S.S. (email: salvatore.spicuglia@inserm.fr)

development and disease^{11–13}. Although the mechanism(s) of regulation of gene expression by lncRNAs are not yet well understood, many of them have been shown to mediate epigenetic modifications by recruiting chromatin remodeling complexes to specific loci, thus regulating both the expression of neighboring genes and distant genomic sequences¹⁴.

Several lncRNAs involved in normal and malignant hematopoiesis have been discovered^{15–17}, including lncRNAs involved in T-cell differentiation and activation^{18–22}, T-cell immune response^{23–25}, lymphoid malignancies^{26–32} and immuno-deficiencies^{23,33}. As the expression of lncRNAs is highly tissue- and context-specific, it is likely that many relevant lncRNAs involved in T-cell lymphocyte differentiation and function have not yet been identified.

To gain insights into the lncRNAs regulatory circuits that underlie T lymphocyte differentiation and activation we used the pro-T-cell line P5424 as a tractable model³⁴. The P5424 cell line has been derived from *Rag1*^{-/-}; *p53*^{-/-} mice and express the CD4 and CD8 markers, but also early T-cell markers, such as *Hes1* and *Ptcra*, which encodes for the surrogate α chain (pT α) of the pre-TCR complex, suggesting that the cells are blocked at the β -selection checkpoint^{5,34,35}. Combined treatment of T cells with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin have been shown to resemble (pre-)TCR mediated signaling by synergistic activation of calcium ions (Ca⁺) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways^{36–40}, thus partially mimicking early T cell differentiation processes. Here, we show that signals induced by the PMA and ionomycin stimulation of P5424 cells resemble part, but not all the signals required for the β -selection process and aspects of subsequent T-cell maturation/activation, including the induction of the anti-apoptotic gene *Bcl2*. By combining transcriptomic and epigenomic experiments, we identified a set of lncRNAs, including many previously uncharacterized transcripts, associated with the regulation of key T-cell genes. Genetic inactivation of the PMA/ionomycin inducible lncRNA *XLOC_000895* (*Robnr*), located downstream of the *Bcl2* gene, resulted in impaired *Bcl2* activation, thus revealing a critical regulator of the *Bcl2* locus and highlighting the usefulness of the P5424 pro-T-cell line to dissect the molecular basis of T-cell regulatory networks.

Results

Effect of the PMA/ionomycin treatment on P5424 gene expression. The P5424 cell line was derived from DN thymocytes of *p53* and *Rag1* double knock-out mice³⁴. Akin other DN-derived leukemic cell lines, the P5424 cells express the CD4 and CD8 surface markers, likewise double positive (DP) thymocytes^{34,35}. However, these cells have a transcription signature similar to double negative (DN) thymocytes, which includes high expression of *Ptcra* and the Notch1-target gene *Hes1*, as well as, very low level of *Tcra* expression (Supplementary Fig. 1A,B). These observations suggest that P5424 cells are somehow blocked between the DN-to-DP transition during the β -selection process.

To study the gene regulatory networks downstream of the (pre-)TCR signaling during early T-cell differentiation we used a combination of PMA and ionomycin to stimulate the protein kinase C (PKC)- and the calcineurin-mediated pathways^{36,41} in the mouse P5424 T-cell precursor cell line. PMA/ionomycin treatment of early T-cell precursors has been shown to activate the pre-TCR signaling pathway and to induce the expression of the *Tcra* locus³⁷. Based on the expression level of the *Tcra* gene, we determined that treatment with 10 ng/ml of PMA and 0.5 μ g/ml of ionomycin for 4 h resulted in the highest gene induction (Supplementary Fig. 1A). Thus, we decided to use these conditions in further experiments. The PMA/ionomycin stimulation of P5424 cells reflects the β -selection by repressing the expression of the early T-cell markers *Ptcra* and *Hes1* and inducing the *Tcra* and *Egr1* genes (Supplementary Fig. 1B). To further validate these findings, we analyzed the expression of the human (h)CD25 in a stable transfected P5424 cell line, where hCD25 is under the control of the mouse *Ptcra* promoter⁴² (Supplementary Fig. 1C). As expected, the PMA/ionomycin stimulation caused an homogeneous loss of hCD25 expression at the surface of the P5424 cells (Supplementary Fig. 1D), meaning that the *Ptcra* promoter was strongly repressed by the PMA/ionomycin treatment.

The β -selection process has been shown to result in cell proliferation *in vivo*¹. However, after the PMA/ionomycin treatment of P5424 cells, we observed a blockage of cell proliferation (Supplementary Fig. 1E), accompanied by an increased apoptosis compared to unstimulated cells (Supplementary Fig. 1G–F). This was consistent with previous results⁴³ and might reflect an overstimulation of the cells, reminiscent of the negative selection occurring at later stages of thymic T cell maturation, which is mediated by apoptosis induced by strong T-cell stimuli⁴⁴.

To have a comprehensive view of the transcriptional and epigenomics effects of the PMA/ionomycin treatment, we performed RNA-seq and ChIP-seq (for H3K4me3 and H3K27ac) experiments on mock (DMSO) and PMA/ionomycin-treated P5424 cells. Analysis of the RNA-seq for *de novo* discovery of lncRNAs identified 7098 transcripts corresponding to 6487 *de novo* lncRNA genes (Supplementary Dataset 1). As expected, most *de novo* lncRNAs were T-cell specific (Supplementary Fig. 2A). The PMA/ionomycin treatment led to 799 induced and 433 repressed coding genes, as well as 172 induced and 163 repressed lncRNAs (including 148 and 152 *de novo* lncRNAs, respectively) (adjusted p-value < 0.01; fold change > 2; Supplementary Dataset 2; Fig. 1A). However, we did not observe substantial changes in the level of histone modifications at promoters of differentially regulated genes (data not shown). Visual inspection of significantly regulated genes reveals that several genes related to the early differentiation of T lymphocytes were significantly repressed (e.g., *Rag1/2*, *Ptcra*, *Dntt*, *Notch1*, *Notch3*, *Dtx1*) while genes associated with T-cell activation or maturation were induced (e.g., *Nfatc1*, *Nfatc2*, *Tox*, *Ikzf1*, *Cd69*, *Egr1*) (Fig. 1B). Accordingly, functional enrichment analysis revealed that the repressed genes were related to development and early differentiation of T lymphocytes (e.g., developmental process, V(D)J recombination, somatic diversification of T-cell receptor genes), whereas the induced genes were linked to T-cell activation (e.g., immune response, response to cytokine, leukocyte activation) (Fig. 1C).

To precisely assess to what extent the PMA/ionomycin stimulation of P5424 cells resembles the β -selection process, we analyzed the relative enrichment of the β -selection signature obtained by comparing gene

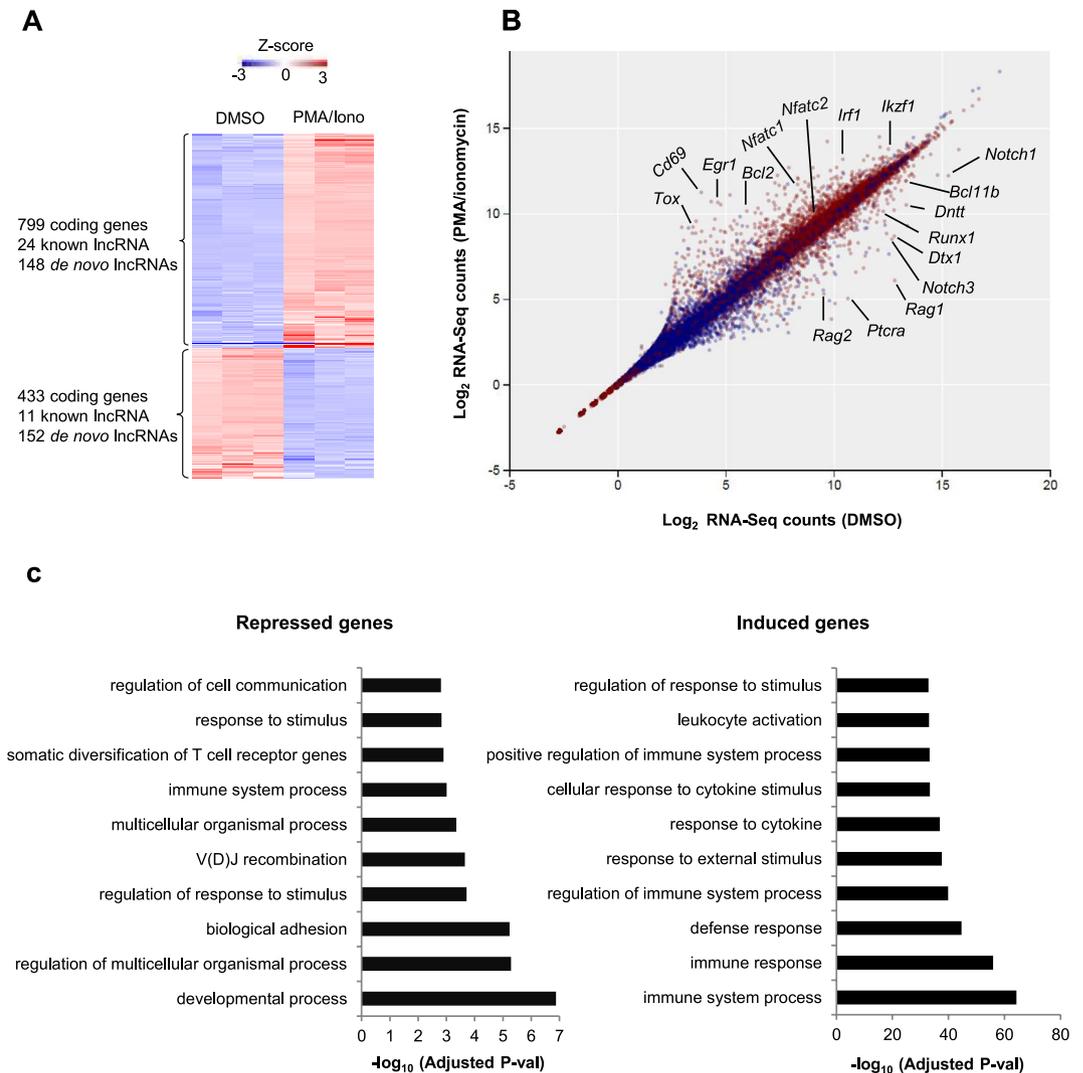


Figure 1. Effect of the PMA/ionomycin treatment on P5424 gene expression. (A) Heatmap showing the normalized RNA-seq signal of differentially expressed coding and lncRNA genes in 3 controls (DMSO) and 3 PMA/ionomycin-treated (PMA/Iono) P5424 cells. (B) Scatter plot highlighting upregulated and downregulated coding genes (red) and lncRNAs (blue) in response to PMA/ionomycin stimulation on P5424 cells. (C) The top 10 biological processes identified by functional enrichment analysis (g:Profiler) of coding genes that were affected by stimulation with PMA/ionomycin.

expression between DN4 and DN3a thymocytes⁴⁵. As shown in Supplementary Figure 1H–I, genes repressed by the β -selection were enriched in unstimulated P5424 cells (Supplementary Fig. 1H), while β -selection induced genes were enriched in PMA/ionomycin treated cells (Supplementary Fig. 1I). However, we also noted that the expression of several β -selection induced (such as *Rorc*, *Ikzf3* and *Camk4*, *Lef1*, *Nfatc3*) and repressed (*Lfng*, *Maml3*, *Dtx3/3l*, *Il2ra* and *IL7r*) genes were not affected by the PMA/ionomycin treatment or regulated in the opposite way, suggesting that an incomplete transcriptional program was induced following PMA/ionomycin treatment. Thus, although the PMA/ionomycin stimulation of P5424 cells did not exactly match the β -selection process, it provides a good *in vitro* model for the analysis of mechanisms leading to early T-cell differentiation and activation.

Functional annotation of PMA/ionomycin-regulated lncRNAs. As an initial assessment of the biological functions of lncRNAs affected by the PMA/ionomycin treatment, we investigated the biological processes enriched in the set of coding genes surrounding the differentially expressed lncRNAs, using the GREAT tool⁴⁶. This tool assigns biological meaning to a set of non-coding genomic regions (in this case, the lncRNA loci) by analyzing the annotations of the surrounding genes using a binomial test. Strikingly, PMA/ionomycin-regulated lncRNAs were significantly associated with coding genes involved in the development and activation of T cells (e.g. V(D)J recombination and regulation of T lymphocyte differentiation) (Fig. 2A).

To determine whether there was a statistical association between the regulated lncRNAs and their neighboring mRNAs, we computed the distance between each induced or repressed lncRNA and the closest regulated mRNA,

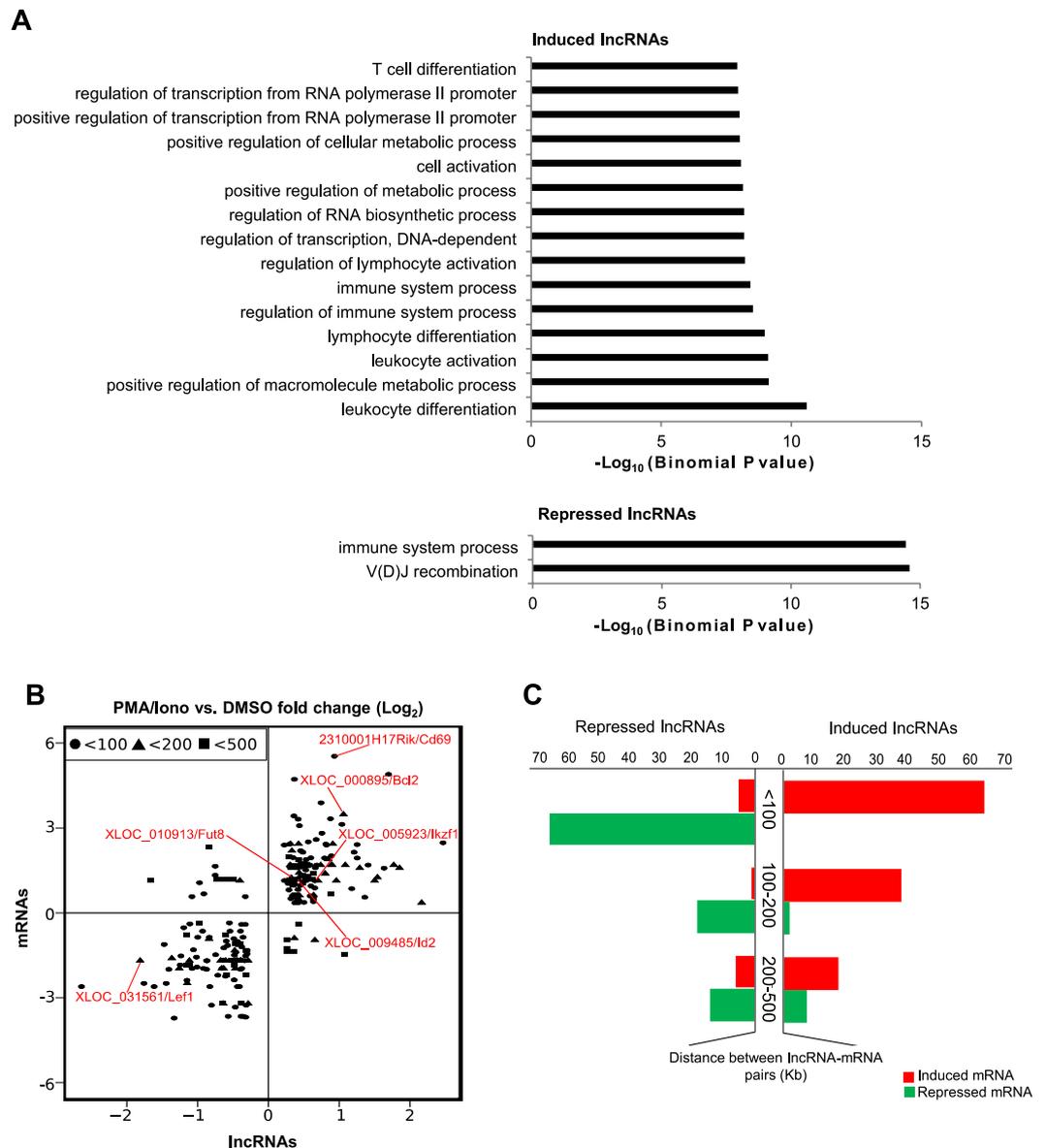


Figure 2. Correlation between lncRNAs and mRNAs regulation in P5424 cells. (A) The functional annotation (biological processes) of coding genes which are associated with PMA/ionomycin-regulated lncRNAs, using the GREAT tool. The top 15 most significant terms are indicated. The inverted Log_{10} of the Binomial P value is represented. (B) Scatter plot depicting the Log_2 (fold-change between PMA/ionomycin and DMSO) of regulated mRNA/lncRNA pairs in respect to the distance between their TSSs (Kb). Pairs separated by less than 100 kb, 200 kb and 500 Kb are displayed. Typical examples are highlighted in red. (C) Bar plot displaying the number of regulated lncRNAs (x-axis) according to the expression state (induced/repressed) of their closest mRNA and in terms of the distance between them (y-axis).

defined as lncRNA/mRNA pairs (Supplementary Dataset 3). We observed that pairs of lncRNA/mRNA separated by less than 500 kb were similarly co-regulated (Fig. 2B,C). Moreover, the lower the distance were between the two genes, the higher was the frequency of concordant changes (Fig. 2C). Indeed, we found that 40.74% of the regulated lncRNAs were located at less than 100 kb from a similarly regulated mRNA (Fig. 2C), demonstrating a significant association between consistently regulated lncRNA/mRNA pairs ($P = 2e^{-19}$ and $1e^{-30}$ for the induced and repressed lncRNA/mRNA pairs located at less than 100 kb, respectively; hypergeometric test). However, no significant association was found between pairs of dissimilarly regulated lncRNAs and mRNAs, indicating that PMA/ionomycin regulated lncRNA/mRNA pairs are generally positively correlated. Overall, these results suggested that some of the PMA/ionomycin-regulated lncRNAs, or the associated regulatory sequences, might play a role in the *cis*-regulation of coding genes involved in T-cell differentiation or activation. This is consistent with previous studies highlighting that lncRNAs at various stages of the murine T lymphocytes development and differentiation are preferentially located adjacent to genes coding for cytokines or lineage-specific transcription factors^{18,20,47}.

Validation of correlated lncRNA/mRNA pairs. The above observations pointed us to look more in detail for pairs of coregulated lncRNA/mRNA loci that might be involved in T-cell functions (Supplementary Dataset 3). We used H3K4me3 and H3K27ac ChIP-seq data to better map the 5' regulatory regions of the lncRNA candidates. Visual inspection of the PMA/ionomycin-regulated loci led to the selection of 5 co-induced and 3 co-repressed lncRNA/coding gene pairs showing correlated expression and histone modification dynamics (Figs 3A, 4A, respectively). RT-PCR assessment of the selected lncRNAs retrieved the expected results (Figs 3B, 4B; Supplementary Fig. 3C and data not shown). Subsequently, we validated the co-regulation of the lncRNA/mRNA pairs in PMA/ionomycin- and DMSO-treated P5424 cells by RT-qPCR (Fig. 4D,E). As anticipated, selected loci were significantly co-regulated in the expected direction upon PMA/ionomycin treatment.

To further elucidate the relationships between the lncRNAs and their neighboring coding genes, as well as the potential *cis*-regulatory functions of these lncRNAs, we analyzed their gene expression kinetics after PMA/ionomycin stimulation. We collected PMA/ionomycin stimulated P5424 cells at different time points (0–30min–1h–2h–3h–4h) and performed RT-qPCR analysis. The progressive *Tcra* activation and *Ptcr* repression confirmed the quality of the kinetic experiments (Fig. 5A). Repression of the lncRNAs *XLOC_031561* and *XLOC_011166* expressions correlated well with the repression of their associated coding genes *Lef1* and *Bcl11b*, respectively (Fig. 5B). Likewise, some induced lncRNA/mRNA pairs showed a consistent regulation (*XLOC_000895/Bcl2* and *XLOC_005923/Ikzf1*), while the other induced lncRNA/mRNA pairs were less well correlated (Fig. 5C). Among the well correlated pairs, we found that the *XLOC_000895/Bcl2* pair displayed a highly similar kinetic of activation, hence strongly supporting a functional *cis*-regulatory link.

Bcl2 is a major regulator of cell death (apoptosis) and is involved in T-cell mediated immune response, as well as in oncogenic transformation of lymphoid lineages^{48–51}. The *XLOC_000895/Bcl2* locus was expressed at low levels in developing thymocytes as observed with our or published RNA-seq datasets (data not shown and Supplementary Fig. 4). As *Bcl2* is required for normal T-cell differentiation and maturation⁵², we hypothesized that this locus might be expressed at high level in a small population of thymocytes or at later T-cell maturation stages. Consistent with this, *Bcl2* has been shown to be up-regulated in DP thymocytes treated with PMA/ionomycin, likely reflecting cell survival during positive selection of DP cells⁵³. To explore whether the *XLOC_000895/Bcl2* pairs is expressed at later stages of T-cell maturation or during T-cell activation, we re-analyzed a published RNA-seq dataset covering most stages of thymic and peripheral T-cell differentiation¹⁸. Interestingly, we observed that expression of the *XLOC_000895* and *Bcl2* genes were well correlated throughout T-cell differentiation (Supplementary Fig. 4A,B), with the highest expression of both genes in differentiated Th2 cell populations (Supplementary Fig. 4C). This suggests a potential role of this lncRNA locus in the regulation of *Bcl2* expression during T-cell maturation.

The *Bcl2* gene is often up-regulated in T-cell leukemia and lymphoma^{54–56}. A recent study using a mouse model of T acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) identified *Bcl2* as a direct target of TLX1 and NUP214-ABL1 oncogenes when both oncogenes were expressed in the same cells and suggested to be a potential therapeutic target in this context⁴⁷. New analyses of this data demonstrated that the *XLOC_000895* lncRNA was also induced in TLX1/NUP214-ABL1 expressing thymocytes, similarly to *Bcl2* (Supplementary Fig. 5). Moreover, we observed an increase of H3K4 methylation at the promoter of *XLOC_000895* along with binding of TLX1 and STAT5 (a direct target of NUP214-ABL1 fusion protein) as well as p300 and BRD4 co-factors in TLX1/NUP214-ABL1 positive thymocytes (Supplementary Fig. 5E). These observations strongly suggested that *XLOC_000895* is a direct target in T-ALL and a potential regulator of *Bcl2*.

***XLOC_000895* locus regulates the expression of *Bcl2* in P5424 cells.** We named the *XLOC_000895* lncRNA *Robnr* (*Regulator of Bcl2 non-coding RNA*). The *Robnr* lncRNA has 3 predicted isoforms sharing a single transcription start site and 8 exons (Supplementary Dataset 1). To investigate whether the *Robnr* locus plays a direct role in the regulation of *Bcl2* expression, we deleted its promoter and the 5' region of this lncRNA using CRISPR/Cas9-mediated genome editing (Fig. 6A). Two homozygous knockout clones were identified by PCR screen ($\Delta Robnr-cl1$ and $\Delta Robnr-cl2$; Supplementary Fig. 6). Next, the expression of *Bcl2* gene was assessed by RT-qPCR at different time points of PMA/ionomycin stimulation in *Robnr* deleted cells (Fig. 6B). As expected, the expression of *Robnr* was reduced to background levels in the two $\Delta Robnr$ clones, demonstrating the full inactivation of the lncRNA gene. Interestingly, the induction of *Bcl2* upon PMA/ionomycin treatment was significantly impaired in the two $\Delta Robnr$ clones (Fig. 6B). To assess whether *Robnr* influences the epigenetic regulation of the *Bcl2* locus, we analyzed the enrichment of H3K4me3 by ChIP-qPCR on three dynamic regions of the *Bcl2* promoter (Fig. 6C,D). Accordingly, we observed a substantial reduction of H3K4me3 enrichment at the two most downstream regions of the *Bcl2* promoter in the $\Delta Robnr$ clones upon PMA/ionomycin treatment (Fig. 6D). Taken together, our data strongly support the involvement of *Robnr*, or its associated regulatory sequences, in the regulation of the pro-apoptotic *Bcl2* gene.

Discussion

T-cell differentiation is subjected to several developmental checkpoints which are controlled by either pre-TCR or TCR complexes. In particular, (pre-)TCR downstream signaling triggers complex intracellular pathways resulting in wide changes in the transcriptional and epigenetic program of genes associated with cell survival, proliferation and differentiation⁴. However, a precise understanding of the regulatory mechanisms at play during T-cell differentiation is still lacking. Defining the players which allow T cells to pass from immature stages to an activated mature stage and their gene targets may not only help to gain a better understanding of the mechanisms underlying the immune response regulation, but also provide insight into disease states and thereby facilitate the identification of new therapeutic targets in which T-cell disorders play pathogenetic roles.

Current T cell differentiation models have limitations due to growth defect, transfection inefficiency, feeders requirement for co-culture or presence of undefined abnormalities because they are derived from natural tumor

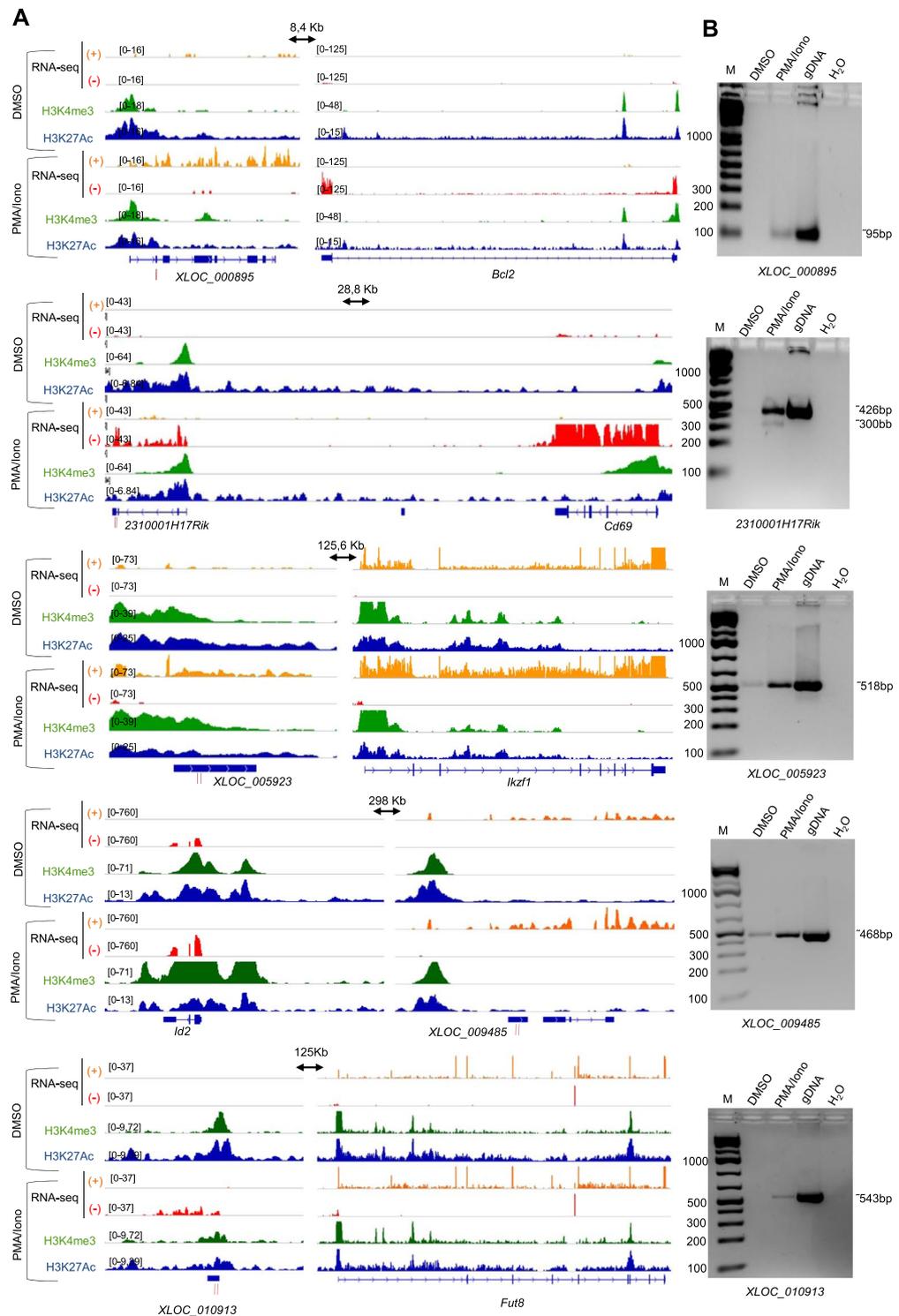


Figure 3. Selected co-induced lncRNA/mRNA pairs. (A) The genome browser screenshots of control cells (DMSO, upper panels) and PMA/ionomycin-treated cells (PMA/Iono, lower panels) show the RNA-seq data (strand + in yellow and strand - in red) as well as the ChIP-seq data (H3K4me3 in green and H3K27ac in blue) on the induced lncRNA loci and their nearby coding genes. Black arrows indicate the distance between the lncRNA and its neighboring gene. The primers used for RT-PCR validation are denoted by vertical red lines under the lncRNA position. (B) The PCR amplification of some lncRNAs that are induced by the PMA/ionomycin treatment are shown in control cells (DMSO), PMA/ionomycin-treated P5424 cells (PMA/Iono) and genomic DNA (gDNA). The *Actb* gene was used as an internal control in the experiments (Supplementary Fig. 3C).

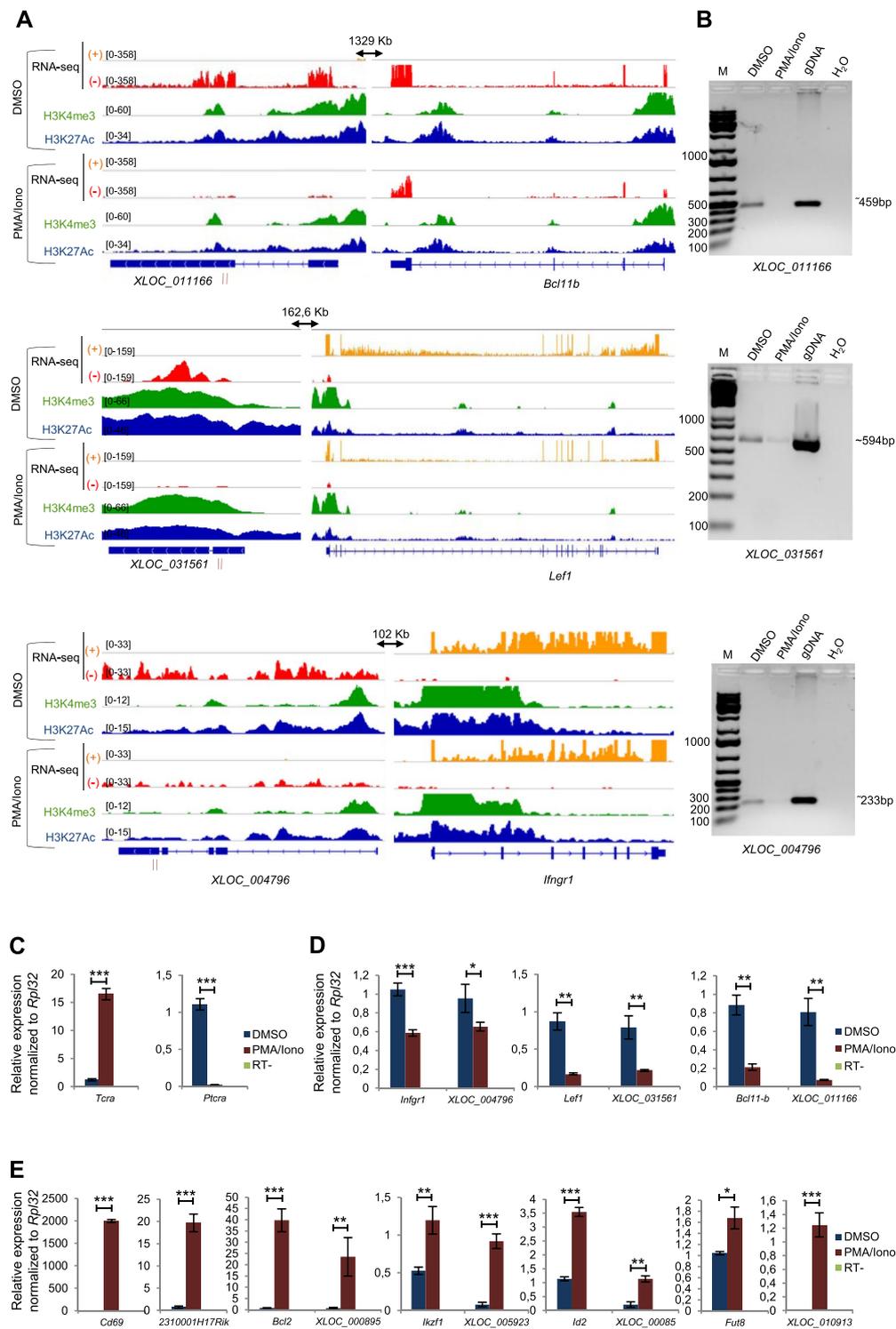


Figure 4. Selected co-repressed lncRNA/mRNA pairs. **(A)** The genome browser screenshots of control cells (DMSO, upper panels) and PMA/ionomycin-treated cells (PMA/Iono, lower panels) show the RNA-seq data (strand + in yellow and strand – in red) as well as the ChIP-seq data (H3K4me3 in green and H3K27ac in blue) on the repressed lncRNA loci and their nearby coding genes. Arrows indicate the distance between the lncRNA and its neighboring gene. The primers used for RT-PCR validation are denoted by vertical red lines under the lncRNA position. **(B)** The PCR amplification of some lncRNAs that are repressed by the PMA/ionomycin treatment are shown in control cells (DMSO), PMA/ionomycin-treated P5424 cells (PMA/Iono) and genomic DNA (gDNA). The *Actb* gene was used as an internal control in the experiments (Supplementary Fig. 3C). **(C–E)** RT-qPCR analyses in P5424 cells treated with DMSO or PMA/ionomycin of *TcrA* and *PtcrA* control genes **(C)**, repressed lncRNA/mRNA pairs **(D)** and induced lncRNA/mRNA pairs **(E)**. Gene expression was normalized to *Rpl32*. Statistical significance was assessed by Student's *t*-test (unpaired, two-tailed) from 3 biological replicates (***P* < 0.001, ***P* < 0.01, **P* < 0.1). Data are represented with standard deviation.

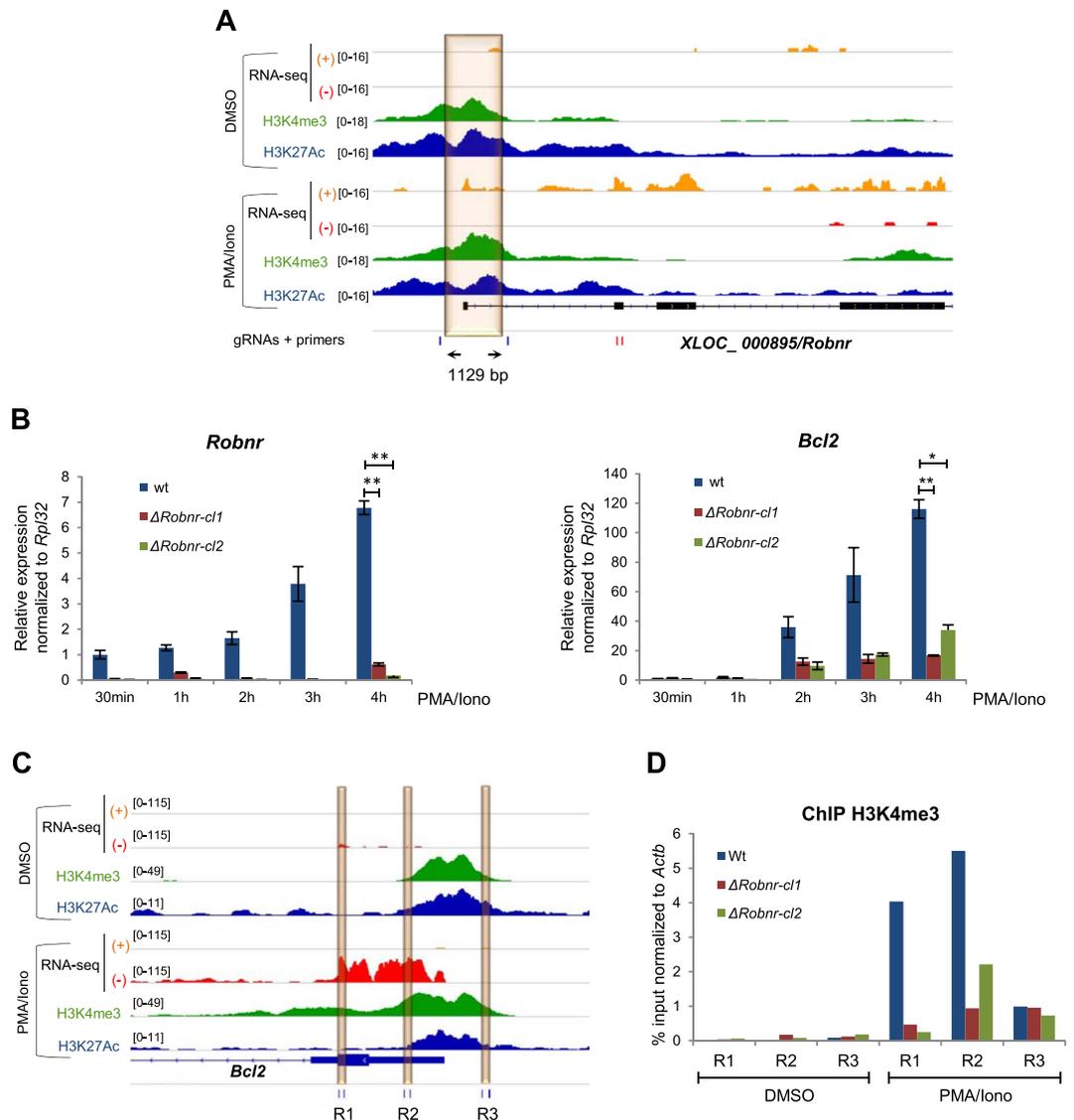


Figure 6. The *XLOC_000895/Robnr* locus regulates *Bcl2* expression. **(A)** Genome browser tracks showing the RNA-seq and ChIP-seq data on the *XLOC_000895/Robnr* locus. The CRISPR/Cas9 targeted region is highlighted in orange. The location of guide RNAs (gRNAs) are denoted by vertical blue lines and the size of the targeted region is indicated. The primers used for RT-qPCR analysis are denoted by vertical red lines. **(B)** Relative expression levels of *Bcl2* and *Robnr* at different time points of the PMA/ionomycin treatment in wild-type (wt) and *Robnr*-mutated clones, $\Delta Robnr-cl1$ and $\Delta Robnr-cl2$. *Rpl32* was used for normalization. The statistical significance was assessed at 4 h of stimulation from 3 biological replicates by a Student's *t*-test (unpaired, one-tailed; *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.1$). Data are represented with standard deviation. Details about the gRNA sequences, the PCR primers and the expected amplicons are provided in Supplementary Table 1. **(C)** Genome browser tracks showing the RNA-seq and ChIP-seq data surrounding the *Bcl2* promoter. Three genomic regions displaying a higher H3K4me3 enrichment in PMA/ionomycin stimulated cells are highlighted. The primers used for ChIP validation are denoted by vertical blue lines. **(D)** ChIP-qPCR analysis of the H3K4me3 enrichment on the *Bcl2* promoter in wild-type (wt) and the two *Robnr*-mutated clones, after an exposure to DMSO or PMA/ionomycin (PMA/Iono) for 4 h. The graph shows the results of 3 replicates. The promoter of *Actb* was used for normalization.

also confirmed that integration of Ca^{2+} and kinase signaling is sufficient for efficient activation of inducible gene expression in T-cell precursors.

Although PKC activation and calcium elevation may be part of the biochemical signals induced by (pre-) TCR signaling during early T cell differentiation, signals induced by PMA and ionomycin resemble part, but not all, of the signals required for the β -selection and might also reflect subsequent T-cell maturation and activation steps. Indeed, several differences suggested that an incomplete transcriptional program is induced by the PMA/ionomycin treatment of P5424 cells. On the one hand, not all the genes regulated by the β -selection process were regulated by the PMA/ionomycin signaling or were not regulated in the same way (Supplementary Fig. 1H–I).

On the other hand, the β -selection induces cell proliferation^{45,58}, while PMA/ionomycin treatment of the P5424 cells resulted in a blockage of cell proliferation and an induction of apoptosis (Supplementary Fig. 1E,F). More generally, in Jurkat cells, TCR stimulation with various concentrations of anti-CD3 resulted in digital activation of $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ ^{59,60}, which is a known regulator of the β -selection⁶¹. In contrast, treatment of Jurkat cells with various concentration of PMA/ionomycin resulted in analog type of activation⁵⁹. Thus, stimulation of T cell lines by PMA/ionomycin might mimic some, but not all, the signals received during T cell differentiation.

Scientific evidences accumulated over the last decade demonstrated a complex involvement and diverse activities of non-coding RNA in the regulation of gene expression^{11–13}. However, few studies concerning their roles in the development, differentiation and/or activation of T lymphocytes are available⁶². In our study, we used the P5424 cellular model to investigate the lncRNAs involvement in T lymphocytes development. Using RNA-seq data of P5424 cells stimulated with PMA/ionomycin, we identified 163 repressed and 172 induced lncRNAs (Fig. 1A,B), with the vast majority representing de novo transcripts. Interestingly, lncRNAs regulated by the PMA/ionomycin stimulation were found to be close to genes involved in T-cell development (Fig. 2A). In addition, we observed a positive co-regulation of neighboring lncRNAs and coding genes (Fig. 4D,E). This finding is consistent with the emerging roles of lncRNAs in the modulation of expression of their nearby protein-coding genes⁶³. For instances, functional screening have suggested that approximately 10% of the lncRNA promoters may regulate nearby genes^{64,65}. Several examples from the hematopoietic system have demonstrated specific *cis*-regulation by lncRNAs, including *Bcl11b*²⁰, *IGF1R*²⁸, *Ifng*²³, *y-globin*⁶⁶ or *MYC*⁶⁷ loci. However, the underlying *cis*-regulatory mechanisms are not yet fully understood⁶⁸, and might require the transcript itself, the transcriptional process or the associated *cis*-regulatory elements (either enhancers or promoters)^{63,69,70}.

As a proof of principle, we assessed the role of *XLOC_000895 (Robnr)* lncRNA, located downstream of the *Bcl2* gene (8.4 kb from the end of *Bcl2*). Both genes were highly induced after PMA/ionomycin-treatment of the P5424 cells and their kinetics of induction were tightly correlated. The induction of the pro-survival gene *Bcl2* was contrasting with the high level of apoptosis observed following PMA/ionomycin treatment, and might reflect an overstimulation of the T cell line⁴³. Genetic deletion of *Robnr* using the CRISPR/Cas9 editing significantly reduced the induction of *Bcl2* upon PMA/ionomycin stimulation (Fig. 6), implying that the *Robnr* locus is a critical regulator of *Bcl2* expression and the epigenetic marking of the *Bcl2* promoter. While it is possible that the *Robnr* lncRNA transcript directly promotes *Bcl2* transcription, our current data did not exclude the possibility that *Robnr* deletion inactivated an enhancer required for normal *Bcl2* transcription. The precise mechanism(s) leading to *Bcl2* regulation by the *Robnr* locus, as well as the specific contribution of the *Robnr* transcript and/or its associated regulatory elements should be addressed in the future.

T-cell homeostasis requires maintaining a delicate balance between the rates of cell death (apoptosis) and cell proliferation. Some of the most important genes controlling cell death belong to the Bcl-2 superfamily. These proteins are known to determine whether developing T cells undergo apoptosis in the thymus or survive to reach peripheral organs^{50,71–74}. *Bcl2* deficient mice demonstrate normal differentiation of both B and T lineages, but these mice fail to maintain lymphoid homeostasis and display lymphocytes apoptosis in response to activation stimuli⁷⁵. Previous studies have also suggested that *Bcl2* is not induced during β -selection, whereas *Bcl2-A1* (Bcl2-related protein A1) is likely to be an important mediator of thymocyte survival during this process⁷⁶. However, *Bcl2-A1* is not expressed in P5424 cells in neither unstimulated or stimulated conditions. p53 is required for apoptosis induced by DNA damage in thymocytes^{77–79} and also for the deletion of cells that fail to progress through the β -selection checkpoint⁸⁰. The absence of p53 gene in P5424 cells could therefore bias the signals observed upon PMA/ionomycin stimulation. While expression of Bcl2-A1 and repression of p53 are well recognized to control cell survival downstream from the pre-TCR, it has also been reported that overexpression of *Bcl2*, and to a minor extend of *Bcl2-A1*, rescued the survival defect of NFAT5-deficient thymocytes observed during β -selection⁸¹. This suggests that *Bcl2* could also be relevant in the pro-survival function of the pre-TCR signaling. Besides its potential role in the β -selection, the regulation of *Bcl2* by the *Robnr* locus might be important at other stages of T cell differentiation or maturation. For instances, co-activation of *Robnr* and *Bcl2* is observed during Th2 differentiation (Supplementary Fig. 4C) pointing out potential implications of this lncRNA in the immune responses. *Bcl2* has been shown to be up-regulated in DP thymocytes treated with PMA/ionomycin, likely reflecting cell survival during positive selection of DP cells⁵³. Whether *Robnr* is also induced in cells undergoing positive selection need to be investigated in the future.

Evasion of apoptosis is a hallmark of human cancer and is often mediated by overexpression of the pro-survival Bcl-2 family proteins⁸². Defective signaling through the Bcl-2 family would enable thymocytes flagged for destruction to survive and acquire additional lesions that promote full malignant transformation. This leads T-ALL blasts to become dependent on this specific pathway whose actions perturb the normal balance between thymocyte life and death signaling cues⁸³. Indeed, *Bcl2* overexpression can act as a major determinant of chemotherapy resistance⁸⁴. Therefore, the pro-survival members of the Bcl-2 family as well as the pathways that signal upstream of these proteins are attractive candidate targets and *Bcl2* inhibitors have been proposed as a novel therapeutic strategy in T-ALL^{85,86}. Strikingly, *Robnr* and *Bcl2* are co-induced in a mouse model of (*Bcl2*-dependent) T-ALL (Supplementary Fig. 5)⁴⁷. Although, we did not detect the expression of *Robnr* in human T-ALL cell lines (data not shown), the human orthologous region of the *Robnr* promoter appears to be in an open chromatin configuration⁸⁷. Strikingly, this region was suggested to be involved in Notch-dependent chemoresistance in T-ALL and can be specifically targeted by the use of epigenetic inhibitors that repressed the *Bcl2* expression⁸⁷.

In conclusion, using a model system that approximates early T cell development, we identified lncRNAs potentially regulating T cell development and functions. This *in vitro* model system should allow us to better understand the kinetics of transcriptional regulation events driven by (pre-)TCR signaling that might be missed by studying steady state populations *ex vivo*. The specific contribution of the *Robnr* locus to the progression of leukemia and/or T cell function and development through the regulation of apoptosis is an important outcome of this work that should be explored in the future.

Materials and Methods

Cell culture. The P5424 line was grown in RPMI-1640 GlutaMAX™ medium (Thermo Fisher Scientific, 61870-010), supplemented with 10% fetal calf serum (Thermo Fisher Scientific, 10270-106) at 37 °C, 5% CO₂. Cells were subcultured every 2–3 days and routinely tested for mycoplasma contamination.

Stimulation of P5424 cells. P5424 cells were grown in 6-well plates at density of 3×10^5 cells/ml. Cells were treated by DMSO or PMA at 10 ng/ml (P1585, Sigma) and ionomycin at 0.5 µg/ml (I3909, Sigma) for 4 hours in triplicates, except for experiments described in Supplementary Figure 1. In the kinetic studies, cells were stimulated as described above, but they were collected at the indicated time points after treatment.

Cell proliferation and apoptosis assays. P5424 cells were treated with DMSO or PMA/ionomycin for 4 hours. Cells were washed and recovered for 24, 48 or 72 hours. The cell proliferation was analyzed with the Scepter™ cell counter (Millipore) and a 60 µm sensor tip, following the manufacturer instructions. To quantify apoptotic cells, the samples were washed with phosphate-buffered solution (PBS), then stained with propidium iodide (PI) and Annexin-V using the Annexin-V-FLUOS staining kit (11858777001, Roche) following the manufacturer instructions. Cells stained with Annexin-V-FLUOS and PI were detected by flow cytometry analysis (FACS) using a LSRII cytometer (BD Biosciences). FlowJo 7.6.5 was used to analyze the FACS data. The percentage of PI and Annexin-V positive cells was calculated.

RNA extraction and cDNA synthesis. The extraction of total RNA was performed using the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen) according to the protocol recommended by the supplier. Total RNA was quantified using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and stored at –80 °C until needed. The reverse transcription was carried out using the Invitrogen™ SuperScript™ VILO™ Master Mix according to the manufacturer instructions.

RNA-seq. Poly(A) RNA was isolated from three replicates of P5424 cells treated with DMSO or PMA/ionomycin and was used for the RNA-seq library preparation, using the TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina). Libraries were paired-end sequenced on the Illumina NextSeq 500 sequencer. Reads were aligned using STAR aligner (v2.4.2a) with arguments “outFilterMismatchNoverLmax” and “outFilterMultimapNmax” set to 0.08 and 1, respectively. Transcripts discovery was performed using Cufflinks (v2.2.1) with the “library-type” argument set to fr-firststrand, and a GTF file obtained from GENCODE (“Comprehensive gene annotation”, vM1) provided as the genomic annotation. The GTF files produced for each sample by Cufflinks were combined using Cuffmerge. The “class code” assigned to each transcript by Cuffmerge was used to defined unknown transcripts (class code “u”). Only *de novo* transcripts with counts greater than 0 in at least one RNA-seq sample were kept for subsequent analyses (Supplementary Dataset 1). These *de novo* transcripts were combined with the GENCODE GTF file to produce the final genomic annotation that was provided to FeatureCounts (v1.4.6-p4) for quantification. Differential gene expression was performed using DESeq2 (v1.6.3). To create bigwig files, reads from Watson and Crick strands were selected using SAMtools (v0.1.9) and provided to the bam2wig.py script from the RSeQC program suite (v2.6.4) (Supplementary Dataset 2). Public RNA-seq data from Hu *et al.*⁸⁸ and Vanden Bempt *et al.*⁴⁷ were downloaded from the GEO database (accession numbers GSE48138 and GSE102209, respectively) and processed as described above. RNA-seq profiles were visualized using the IGV genome browser⁸⁹.

Tissue specificity. To estimate the bias toward tissue-specificity for each transcript, we processed a set of fastq files obtained from the SRA database (accession number SRP012040). This dataset corresponds to 30 mouse tissues sequenced with a paired-end strategy on an Illumina HiSeq2000⁹⁰. After read mapping, gene expression levels were quantified using Cuffdiff⁹¹. Based on the log₂-transformed FPKM values, we assessed the tissue-specificity for each gene across every tissue using the tau score, as described by Kryuchkova-Mostacci and Robinson-Rechavi⁹². The tau score formula is:

$$\text{Tau} = \sum_{i=0}^n \frac{(1 - \hat{x}_i)}{n - 1}; \hat{x}_i = \frac{x_i}{\max_{1 \leq i \leq n}(x_i)}$$

where: n corresponds to the number of samples, X_i to the expression level in condition i, and $\text{Max}(x_i)$ to the maximum expression level through all tissues.

Genomic pairing of lncRNA and mRNA. For each differentially expressed lncRNA we identified the closest differentially expressed mRNA (hereafter lncRNA/mRNA pairs) and computed the distance between the two TSSs. Supplementary Dataset 3 provides the list of co-regulated lncRNA/mRNA pairs. All plots (bar and scatter) were done using the ggplot2 R package⁹³.

Functional enrichment analysis. Gene ontology (GO) enrichment of biological processes was assessed on PMA/ionomycin-regulated coding genes using the g:Profiler web server⁹⁴. The top 10 GO terms enrichments having the lowest P value were used to select the annotations (Fig. 1C). Functional enrichment of biological processes associated with coding genes surrounding PMA/ionomycin-regulated lncRNAs was performed using the online tool GREAT (Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool)⁴⁶ and default setting. GREAT assigns each gene a regulatory domain consisting of a basal region of –5 kb/+1 kb from TSS, and an extension up to the nearest gene basal region, but no more than 1 Mb in both directions. Subsequently, it assigns biological meaning to a set of provided non-coding genomic regions (in this case, the lncRNA loci) by analyzing the annotations of the surrounding genes, using a Binomial test. We selected the first 15 significant GO terms with the lowest Binomial P values (Fig. 2A).

Gene set enrichment analysis. To analyze the extent of concordance between the β -selection and the PMA/ionomycin stimulation process, we performed a Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)^{95,96}. For this purpose, we extracted a β -selection signature from the ‘immgen’ webtool (<http://rstats.immgen.org/PopulationComparison>) by comparing the gene expression between DN4 and DN3a thymocytes, based on the microarray data from Mingueneau *et al.*⁴⁵. GSEA software was downloaded from <http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>.

Qualitative analyses of gene expression. cDNAs from DMSO- or PMA/ionomycin-treated P5424 cells were analyzed by PCR with cycles of 95 °C for 1 minute, followed by 30 cycles including denaturation at 95 °C for 20 seconds, hybridization to T_m which varied from 60 °C to 64 °C, for 20 seconds and extension step at 68 °C for 1 minute. A final extension step at 68 °C for 4 minutes was performed. The 25 μ l PCR reactions were prepared with 1 μ l of cDNA from the RT-PCR reaction in accordance with the Herculase II Fusion protocol (Agilent, Waldbronn, Germany). The amplicons were analyzed by agarose gel electrophoresis by adjusting the percentage of agarose in respect of the expected fragments length. The PCR analysis of the lncRNAs regulated by the PMA/ionomycin stimulation was carried out using specific primers (Supplementary Table 1). Genomic DNA was used as an amplification control, *Egr1* and *Tcra* genes were used to check the stimulation efficiency and *Actb* gene was used as a sample quality control.

Quantitative analyses of gene expression. The qPCR reactions were performed using the Applied Biosystems™ *QuantStudio*™ 6 Flex Real-Time PCR System with Power SYBR® Green PCR Master Mix. Primers sequences are listed in Supplementary Table 1. *Rpl32* was used as a reference gene to normalize the qPCR results. The Student’s t-test was performed (unpaired, two-tailed) from 3 biological replicates (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.1$). Data are represented with standard deviation.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). A total of 5×10^6 of DMSO or PMA/ionomycin treated P5424 cells was crosslinked with 1% formaldehyde for 10 min at 20 °C, followed by a quench with glycine at a final concentration of 250 mM. Pelleted cells were washed twice with ice-cold PBS, and then re-suspended in lysis buffer (20 mM Hepes pH 7.6, 1% SDS, 1X protease inhibitor cocktail) at final cell concentration of 15×10^6 cells/ml. The chromatin was sonicated with a Bioruptor (Diagenode) to reach an average chromatin fragment length of 200–400 bp (5 pulses of 30 sec ON and 30 sec OFF). For each immunoprecipitation, an aliquot of sonicated cell lysate, equivalent to 5×10^5 cells, was diluted with SDS-free dilution buffer. Specific antibodies and proteinase inhibitor cocktail were added to the lysate and mixed overnight at 4 °C. The antibodies used were the following: H3K4me3 (C15410003-50) and H3K27ac (C15410196, Diagenode). The next day, Protein A-coupled magnetic beads (Invitrogen) were washed twice with dilution buffer (0.15% SDS, 0.1% BSA), added to the lysate and placed on the rotating wheel for 1 hour at 4 °C. Beads were then washed with each of the following buffers: once with the Wash Buffer 1 (2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8, 1% Triton, 0.1% SDS, 150 mM NaCl), twice with the Wash Buffer 2 (2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8, 1% Triton, 0.1% SDS, 500 mM NaCl) and twice with the Wash Buffer 3 (1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8). Finally, beads were eluted in Elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃) and mixed on a rotating wheel at room temperature for 20 min. To reverse the crosslink, 5 M NaCl and 10 mg/ml of proteinase K were added to the eluted material and to an input (10% of the sonicated chromatin used for immunoprecipitation). The samples were then incubated overnight at 65 °C. The next day, the DNA was purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and eluted in 20 μ l of water. Quantitative real-time PCR with SYBR green was used to quantify the immunoprecipitated DNA. The primers used are listed in Supplementary Table 1. Data represent the percentage of input normalized to the *Actb* promoter.

ChIP-seq. ChIP-seq libraries for H3K4me3 and H3K27ac in P5424 cells treated with DMSO or PMA/ionomycin were generated with the MicroPlex Library Preparation Kit (Diagenode), according to the manufacturer instructions. The libraries were sequenced in paired-end 75/75nt mode using the NextSeq® 500/550 (Illumina), according to manufacturer’s instructions. Reads were mapped to the mm9 reference genome using standard procedures. ChIP-seq profiles were visualized using the IGV genome browser⁸⁹.

CRISPR-Cas9 genome editing. To knock-out the *XLOC_000895/Robnr lncRNA*, a gRNAs was designed on each side of the targeted region using the CRISPRdirect tool⁹⁷. The gRNAs were cloned into a gRNA cloning vector (Addgene, 41824). Then 1×10^5 cells were co-transfected with 5 μ g of the hCas9 vector (Addgene, 41815) and 5 μ g of each gRNA vector using the Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific). Two days later, cells were seeded in 96-well plates at limiting dilution (0.5 cells per well) for clonal expansion. Individual cell clones were screened after 10–14 days for homologous allele deletion by direct PCR using Phire Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer protocol. Forward and reverse primers were designed to bracket the targeted regions, allowing for the detection of knock-out or wild-type alleles. Clones were considered to have undergone homologous allele deletion if they showed the expected deletion band and no wild-type band on an agarose gel after PCR amplification. We obtained two clones with biallelic deletion (Supplementary Fig. 6). The PCR products corresponding to the deleted fragments were purified using the MinElute Purification kit (Qiagen) and sequenced (Eurofins Genomics) to determine the exact break points. Δ *Robnr-cl1* had the expected 1.1 kb deletion (chr1:108412002–108413119), while Δ *Robnr-cl2* had a deletion of 1.2 kb (chr1:108411914–108413135). Primers and gRNAs sequences are listed in Supplementary Table 1.

Data Availability

RNA-seq and ChIP-seq data described in this study are available in GEO database under the accession number GSE120655 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

References

- Hayday, A. C. & Pennington, D. J. Key factors in the organized chaos of early T cell development. *Nat Immunol* **8**, 137–44 (2007).
- Spicuglia, S., Zacarias-Cabeza, J., Pekowska, A. & Ferrier, P. Epigenetic regulation of antigen receptor gene rearrangement. *F1000 Biology Reports* **2**, 23 (2010).
- Taghon, T. & Rothenberg, E. V. Molecular mechanisms that control mouse and human TCR-alpha and TCR-gammadelta T cell development. *Semin Immunopathol* **30**, 383–98 (2008).
- Carpenter, A. C. & Bosselut, R. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol* **11**, 666–73 (2010).
- Pekowska, A. *et al.* H3K4 tri-methylation provides an epigenetic signature of active enhancers. *EMBO J* **30**, 4198–210 (2011).
- Zhang, J. A., Mortazavi, A., Williams, B. A., Wold, B. J. & Rothenberg, E. V. Dynamic transformations of genome-wide epigenetic marking and transcriptional control establish T cell identity. *Cell* **149**, 467–82 (2012).
- Aifantis, I., Raetz, E. & Buonamici, S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol* **8**, 380–90 (2008).
- Ntziachristos, P., Abdel-Wahab, O. & Aifantis, I. Emerging concepts of epigenetic dysregulation in hematological malignancies. *Nature Immunology* (2016).
- Notarangelo, L. D. Immunodeficiency and immune dysregulation associated with proximal defects of T cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* **31**, 97–101 (2014).
- Spicuglia, S., Maqbool, M. A., Puthier, D. & Andrau, J. C. An update on recent methods applied for deciphering the diversity of the noncoding RNA genome structure and function. *Methods* **63**, 3–17 (2013).
- Geisler, S. & Coller, J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 699–712 (2013).
- Guttman, M. & Rinn, J. L. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* **482**, 339–46 (2012).
- Morceau, F., Chateauvieux, S., Gagneaux, A., Dicato, M. & Diederich, M. Long and short non-coding RNAs as regulators of hematopoietic differentiation. *Int J Mol Sci* **14**, 14744–70 (2013).
- Bonasio, R. & Shiekhattar, R. Regulation of transcription by long noncoding RNAs. *Annu Rev Genet* **48**, 433–55 (2014).
- Alvarez-Dominguez, J. R. *et al.* HF. Global discovery of erythroid long noncoding RNAs reveals novel regulators of red cell maturation. *blood* **123**, 570–581 (2014).
- Atianand, M. K. & Fitzgerald, K. A. Long non-coding RNAs and control of gene expression in the immune system. *Trends Mol Med* **20**, 623–31 (2014).
- Fitzgerald, K. A. & Caffrey, D. R. Long noncoding RNAs in innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* **26**, 140–6 (2014).
- Zhu, L. & Xu, P. C. Downregulated lncRNA-ANCR promotes osteoblast differentiation by targeting EZH2 and regulating Runx2 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **432**, 612–7 (2013).
- Xia, F. *et al.* Dynamic Transcription of Long Non-Coding RNA Genes during CD4+ T Cell Development and Activation. *PLoS ONE* **9** (2014).
- Isoda, T. *et al.* Non-coding Transcription Instructs Chromatin Folding and Compartmentalization to Dictate Enhancer-Promoter Communication and T Cell Fate. *Cell* **171**, 103–119 e18 (2017).
- Pagani, M. *et al.* Role of microRNAs and long-non-coding RNAs in CD4+ T-cell differentiation. *Immunological Reviews* **253**, 82–96 (2013).
- Casero, D. *et al.* Long non-coding RNA profiling of human lymphoid progenitor cells reveals transcriptional divergence of B cell and T cell lineages. *Nature Immunology* **16**, 1282–1291 (2015).
- Gomez, J. A. *et al.* The NeST long ncRNA controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the interferon-gamma locus. *Cell* **152**, 743–54 (2013).
- Willingham, A. T. *et al.* A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT. *Science* **309**, 1570–3 (2005).
- Wang, Y. *et al.* Long noncoding RNA derived from CD244 signaling epigenetically controls CD8+ T-cell immune responses in tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, E3883–92 (2015).
- Garzon, R. *et al.* Expression and prognostic impact of lncRNAs in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 18679–84 (2014).
- Yang, X. *et al.* A Network Based Method for Analysis of lncRNA-Disease Associations and Prediction of lncRNAs Implicated in Diseases. *PLOS ONE* **9** (2014).
- Trimarchi, T. *et al.* Genome-wide mapping and characterization of Notch-regulated long noncoding RNAs in acute leukemia. *Cell* **158**, 593–606 (2014).
- Wallaert, A. *et al.* Long noncoding RNA signatures define oncogenic subtypes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* (2016).
- Ngoc, P. C. T. *et al.* Identification of novel lncRNAs regulated by the TAL1 complex in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* (2018).
- Gioia, R. *et al.* lncRNAs downregulated in childhood acute lymphoblastic leukemia modulate apoptosis, cell migration, and DNA damage response. *Oncotarget* **8**, 80645–80650 (2017).
- Alvarez-Dominguez, J. R. & Lodish, H. F. Emerging mechanisms of long noncoding RNA function during normal and malignant hematopoiesis. *Blood* **130**, 1965–1975 (2017).
- Salviano-Silva, A., Lobo-Alves, S. C., Almeida, R. C., Malheiros, D. & Petzl-Erler, M. L. Besides Pathology: Long Non-Coding RNA in Cell and Tissue Homeostasis. *Noncoding RNA* **4** (2018).
- Mombaerts, P., Terhorst, C., Jacks, T., Tonegawa, S. & Sancho, J. Characterization of immature thymocyte lines derived from T-cell receptor or recombination activating gene 1 and p53 double mutant mice. *Immunology* **92**, 7420–7424 (1995).
- Vanhille, L. *et al.* High-throughput and quantitative assessment of enhancer activity in mammals by CapStarr-seq. *Nat Commun* **6**, 6905 (2015).
- Chatila, T., Silverman, L., Millerand, R. & Geha, R. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol* **143**, 1283–1289 (1989).
- Del Blanco, B., Garcia-Mariscal, A., Wiest, D. L. & Hernandez-Munain, C. Tcr α enhancer activation by inducible transcription factors downstream of pre-TCR signaling. *J Immunol* **188**, 3278–93 (2012).
- Oh-hora, M. Calcium signaling in the development and function of T-lymphocyte cells. *Immunological Reviews* **231**, 210–224 (2009).
- Brignall, R. *et al.* Integration of Kinase and Calcium Signaling at the Level of Chromatin Underlies Inducible Gene Activation in T Cells. *J Immunol* **199**, 2652–2667 (2017).
- Su, R. C., Sridharan, R. & Smale, S. T. Assembly of silent chromatin during thymocyte development. *Semin Immunol* **17**, 129–40 (2005).
- Holden, N. S. *et al.* Phorbol ester-stimulated NF-kappaB-dependent transcription: roles for isoforms of novel protein kinase C. *Cell Signal* **20**, 1338–48 (2008).
- Reizis, B. & Leder, P. The Upstream Enhancer Is Necessary and Sufficient for the Expression of the Pre-T Cell Receptor α Gene in Immature T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* **194**, 979–990 (2001).
- Da Silva, T. A., Oliveira-Brito, P. K. M., Goncalves, T. E., Vendruscolo, P. E. & Roque-Barreira, M. C. ArtinM Mediates Murine T Cell Activation and Induces Cell Death in Jurkat Human Leukemic T Cells. *Int J Mol Sci* **18** (2017).
- Germain, R. N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* **2**, 309–22 (2002).

45. Mingueneau, M. *et al.* The transcriptional landscape of alphabeta T cell differentiation. *Nat Immunol* **14**, 619–32 (2013).
46. McLean, C. Y. *et al.* GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotechnol* **28**, 495–501 (2010).
47. Vanden Bempt, M. *et al.* Cooperative Enhancer Activation by TLX1 and STAT5 Drives Development of NUP214-ABL1/TLX1-Positive T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* **34**, 271–285 e7 (2018).
48. Burlacu, B. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J. Cell. Mol. Med.* **7**, 249–257 (2003).
49. Kirkin, V., Joos, S. & Zornig, M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* **1644**, 229–49 (2004).
50. Dunkle, A. & He, Y. W. Apoptosis and autophagy in the regulation of T lymphocyte function. *Immunol Res* **49**, 70–86 (2011).
51. Hata, A. N., Engelman, J. A. & Faber, A. C. The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. *Cancer Discov* **5**, 475–87 (2015).
52. Gratiot-Deans, J., Merino, R., Nunez, G. & Turka, L. A. Bcl-2 expression during T-cell development: Early loss and late return occur at specific stages of commitment to differentiation and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10685–10689 (1994).
53. Tanahashi, M. *et al.* Effect of phorbol ester and calcium ionophore on human thymocytes. *Human Immunology* **62**, 771–781 (2001).
54. Feng, H. *et al.* T-lymphoblastic lymphoma cells express high levels of BCL2, SIP1, and ICAM1, leading to a blockade of tumor cell intravasation. *Cancer Cell* **18**, 353–66 (2010).
55. Coustan-Smith, E. *et al.* Clinical Relevance of BCL-2 Overexpression in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* **87** (1996).
56. Roberts, A. W. & Huang, D. Targeting BCL2 With BH3 Mimetics: Basic Science and Clinical Application of Venetoclax in Chronic Lymphocytic Leukemia and Related B Cell Malignancies. *Clin Pharmacol Ther* **101**, 89–98 (2017).
57. Bornschein, S. *et al.* Defining the molecular basis of oncogenic cooperation between TAL1 expression and Pten deletion in T-ALL using a novel pro-T-cell model system. *Leukemia* **32**, 941–951 (2018).
58. Hoffman, E. S. *et al.* Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development *in vivo*. *Genes & Development* **10**, 948–962 (1996).
59. Kingeter, L. M., Paul, S., Maynard, S. K., Cartwright, N. G. & Schaefer, B. C. Cutting edge: TCR ligation triggers digital activation of NF- κ B. *J Immunol* **185**, 4520–4 (2010).
60. Aifantis, L., Gounari, F., Scorrano, L., Borowski, C. & von Boehmer, H. Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca²⁺ mobilization and activation of NF- κ B and NFAT. *Nature Immunology* **2**, 403 (2001).
61. Voll, R. E. *et al.* NF- κ B Activation by the Pre-T Cell Receptor Serves as a Selective Survival Signal in T Lymphocyte Development. *Immunity* **13**, 677–689 (2000).
62. Wallaert, A., Durinck, K., Taghon, T., Van Vlierberghe, P. & Speleman, F. T-ALL and thymocytes: a message of noncoding RNAs. *J Hematol Oncol* **10**, 66 (2017).
63. Orom, U. A. & Shiekhattar, R. Long noncoding RNAs usher in a new era in the biology of enhancers. *Cell* **154**, 1190–3 (2013).
64. Liu, S. J. *et al.* CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells. *Science* **355** (2017).
65. Guttman, M. *et al.* lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* **477**, 295–300 (2011).
66. Ivaldi, M. S. *et al.* Fetal gamma-globin genes are regulated by the BGLT3 long non-coding RNA locus. *Blood* (2018).
67. Cho, S. W. *et al.* Promoter of lincRNA Gene PVT1 Is a Tumor-Suppressor DNA Boundary Element. *Cell* **173**, 1398–1412 e22 (2018).
68. Natoli, G. & Andrau, J. C. Noncoding transcription at enhancers: general principles and functional models. *Annu Rev Genet* **46**, 1–19 (2012).
69. Paralkar, V. R. *et al.* Unlinking an lincRNA from Its Associated cis Element. *Mol Cell* **62**, 104–10 (2016).
70. Engreitz, J. M. *et al.* Local regulation of gene expression by lincRNA promoters, transcription and splicing. *Nature* **539**, 452–455 (2016).
71. Sentman, C. L., Shutter, J. R., Hockenbery, D., Kanagawa, O. & Korsmeyer, S. J. bcl-2 Inhibits Multiple Forms of Apoptosis but Not Negative Selection in Thymocytes. *cell* **67**, 879–888 (1991).
72. Akashi, K., Kondo, M., von Freeden-Jeffry, U., Murray, R. & Weissman, I. L. Bcl-2 Rescues T Lymphopoiesis in Interleukin-7 Receptor-Deficient Mice. *cell* **89**, 1033–1041 (1997).
73. Maraskovsky, E. *et al.* Bcl-2 Can Rescue T Lymphocyte Development in Interleukin-7 Receptor-Deficient Mice but Not in Mutant rag-1^{-/-} Mice. *cell* **89**, 1011–1019 (1997).
74. Strasser, A., Harris, A. W., Corcoran, L. M. & Cory, S. Bcl-2 expression promotes B- but not T-lymphoid development in scid mice. *nature* **368**, 457–60 (1994).
75. Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *cell* **75**, 229–240 (1993).
76. Mandal, M. *et al.* The BCL2A1 gene as a pre-T cell receptor-induced regulator of thymocyte survival. *J Exp Med* **201**, 603–14 (2005).
77. Murga, C. & Barber, D. F. Molecular Mechanisms of Pre-T Cell Receptor-induced Survival. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 39156–39162 (2002).
78. Guidos, C. J. *et al.* V(D)J recombination activates a p53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. *Genes & Development* **10**, 2038–2054 (1996).
79. Fotedar, R. *et al.* Effect of p21(waf1/cip1) transgene on radiation induced apoptosis in T cells. *Oncogene* **18**, 3652–8 (1999).
80. Haks, M. C., Krimpenfort, P., van den Brakel, J. H. N. & Kruisbeek, A. M. Pre-TCR Signaling and Inactivation of p53 Induces Crucial Cell Survival Pathways in Pre-T Cells. *Immunity* **11**, 91–101 (1999).
81. Berga-Bolanos, R., Alberdi, M., Buxade, M., Aramburu, J. & Lopez-Rodriguez, C. NFAT5 induction by the pre-T-cell receptor serves as a selective survival signal in T-lymphocyte development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 16091–16096 (2013).
82. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
83. Strasser, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* **5**, 189–200 (2005).
84. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324–37 (2007).
85. Peirs, S. *et al.* ABT-199 mediated inhibition of BCL-2 as a novel therapeutic strategy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *blood* **124**, 3738–47 (2014).
86. Sanda, T. *et al.* TYK2-STAT1-BCL2 pathway dependence in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Discov* **3**, 564–77 (2013).
87. Knoechel, B. *et al.* An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **46**, 364–70 (2014).
88. Hu, G. *et al.* Expression and regulation of intergenic long noncoding RNAs during T cell development and differentiation. *Nat Immunol* **14**, 1190–8 (2013).
89. Thorvaldsdottir, H., Robinson, J. T. & Mesirov, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* **14**, 178–92 (2013).
90. Lin, S. *et al.* Comparison of the transcriptional landscapes between human and mouse tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 17224–17229 (2014).
91. Trapnell, C. *et al.* Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol* **31**, 46–53 (2013).
92. Kryuchkova-Mostacci, N. & Robinson-Rechavi, M. A benchmark of gene expression tissue-specificity metrics. *Brief Bioinform* **18**, 205–214 (2017).
93. Ito, K. & Murphy, D. Application of ggplot2 to Pharmacometric Graphics. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* **2**, e79 (2013).

94. Reimand, J., Arak, T. & Vilo, J. g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2011 update). *Nucleic Acids Res* **39**, W307–15 (2011).
95. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 15545–50 (2005).
96. Subramanian, A., Kuehn, H., Gould, J., Tamayo, P. & Mesirov, J. P. GSEA-P: a desktop application for Gene Set Enrichment Analysis. *Bioinformatics* **23**, 3251–3 (2007).
97. Naito, Y., Hino, K., Bono, H. & Ui-Tei, K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics* **31**, 1120–3 (2015).

Acknowledgements

We thank the Transcriptomics and Genomics Marseille-Luminy (TGML) platform for sequencing the RNA and ChIP samples and the Marseille-Luminy cell biology platform for the management of cell culture. We thank students from the Polytech Marseille (Génie Biologique 4 A; promotion 2015) for their technical help in the context of a practical session funded by CoReBio PACA. Work in the laboratory of S.S. was supported by recurrent fundings from INSERM and Aix-Marseille University and by the Foundation for Cancer Research ARC (ARC PJA 20151203149) and A*MIDEX (ANR-11-IDEX-0001-02), Plan Cancer 2015 (C15076AS) and 2018 (THYNCRNA), and Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer. W.S. and Y.K. were supported by the Franco-Algerian consortium Hubert Curien (PHC) Tassili (15MDU935).

Author Contributions

D.P. and S.S. designed the project and supervised the work. W.S. performed most experimental work. Y.K. performed most bioinformatics analysis. L.T.M.D., E.M., D.S.A., I.M., M.T., L.P., B.L. contributed to experimental work. M.B. and D.P. contributed to bioinformatics analysis. M.A. supervised part of the work and provided advices. W.S. and S.S. wrote the manuscript. All the authors oversaw and proofread the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41247-5>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

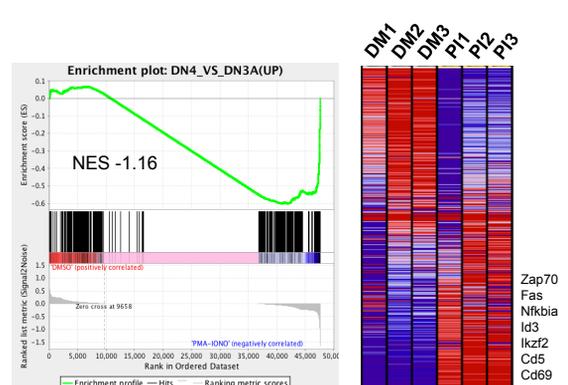
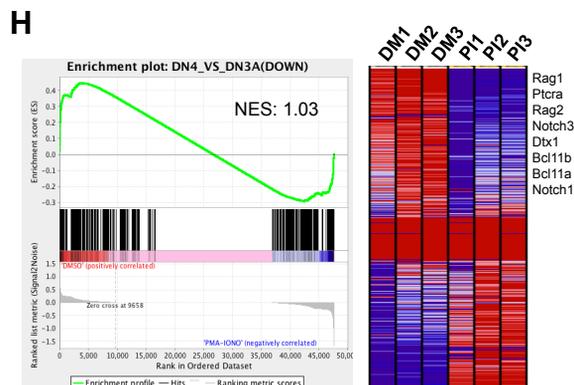
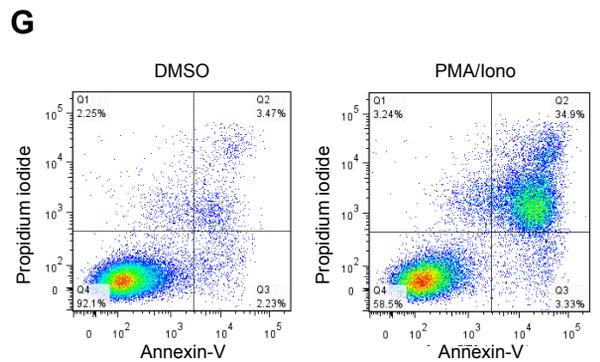
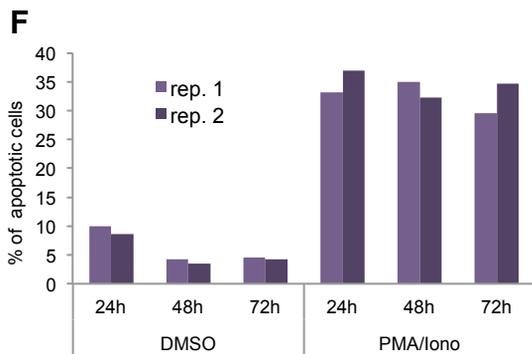
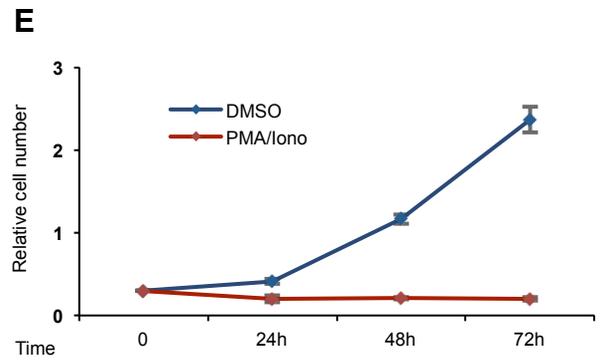
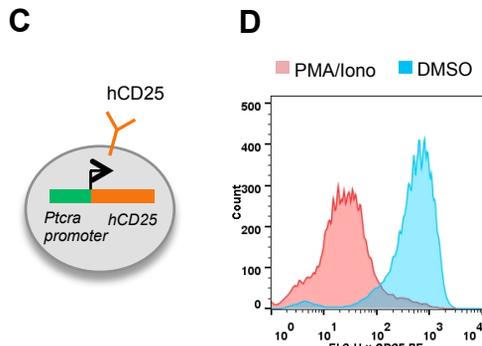
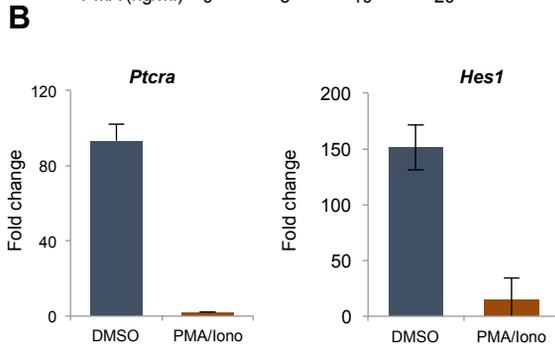
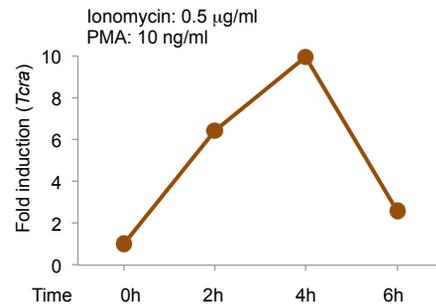
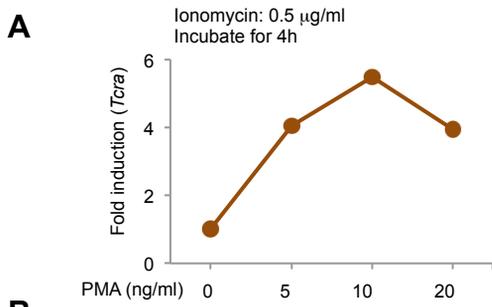
Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



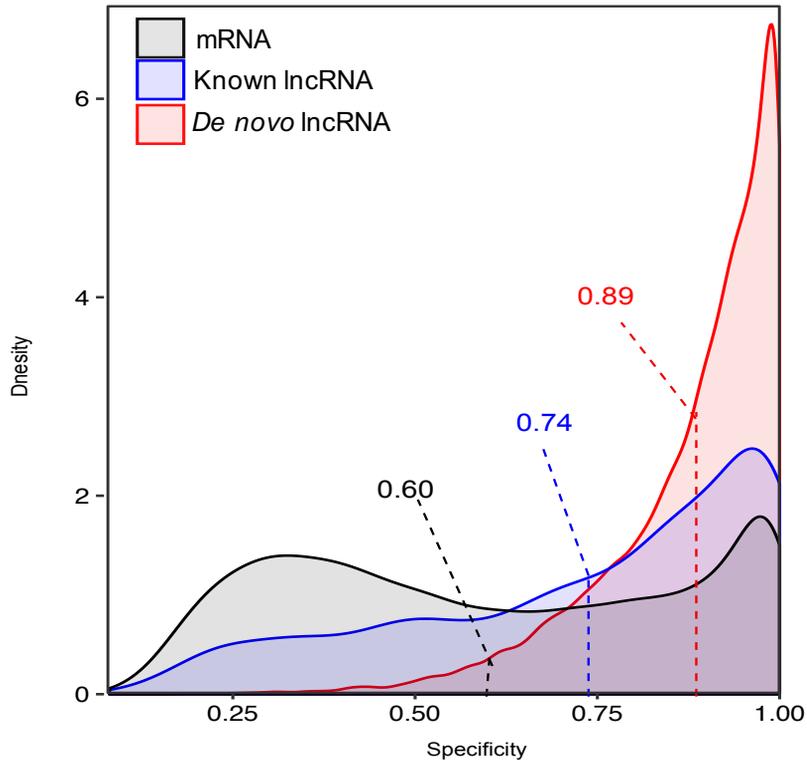
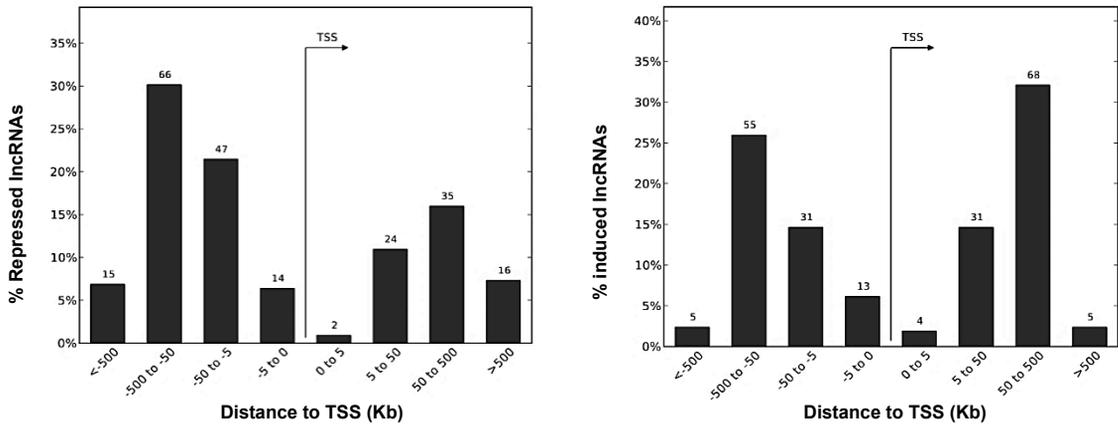
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

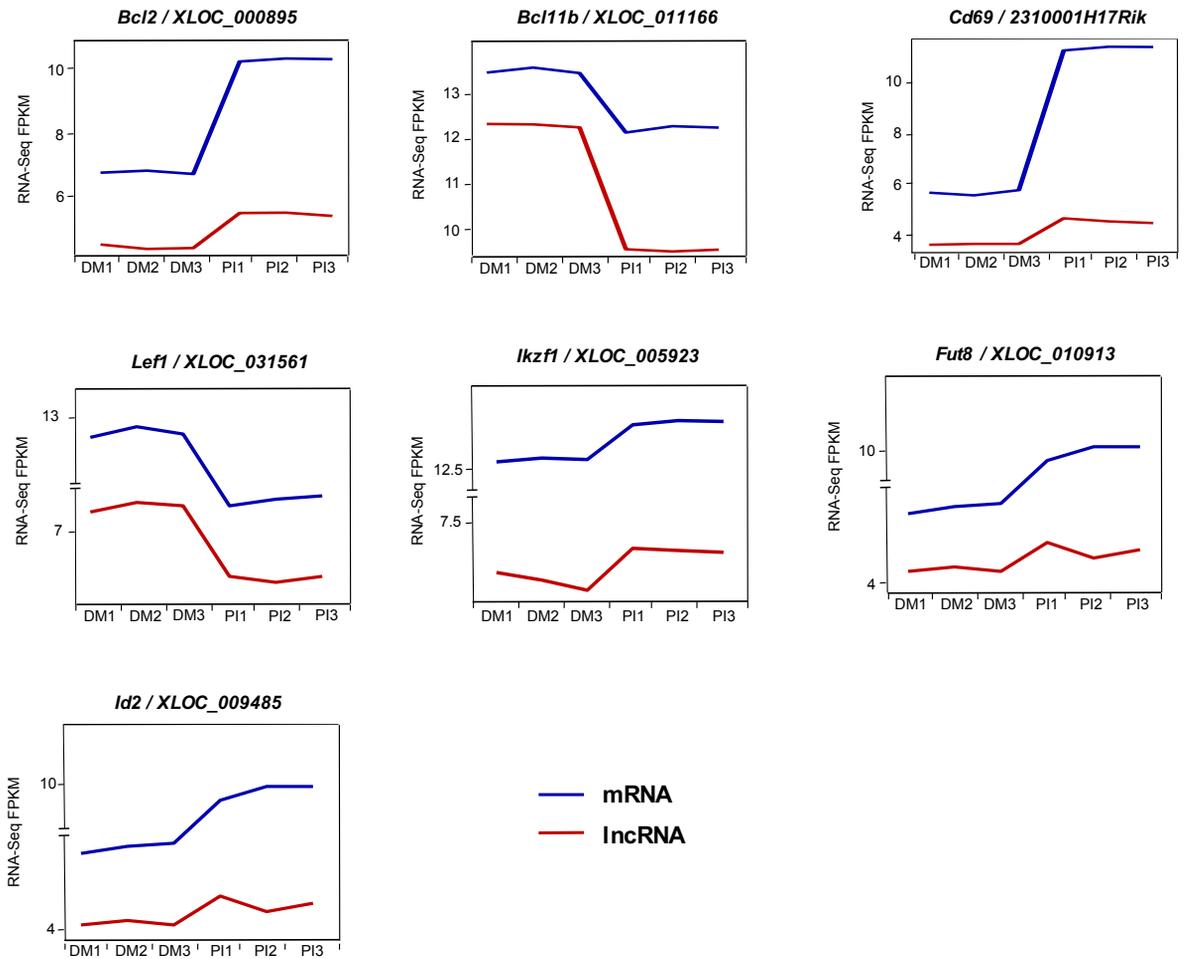
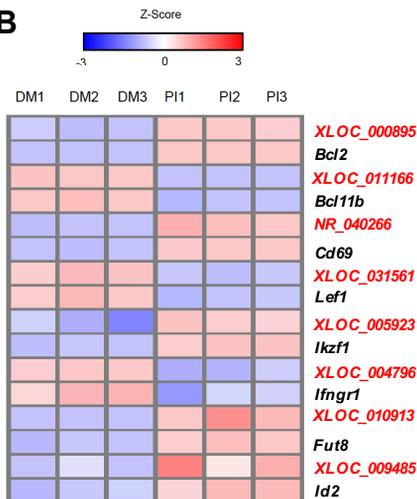
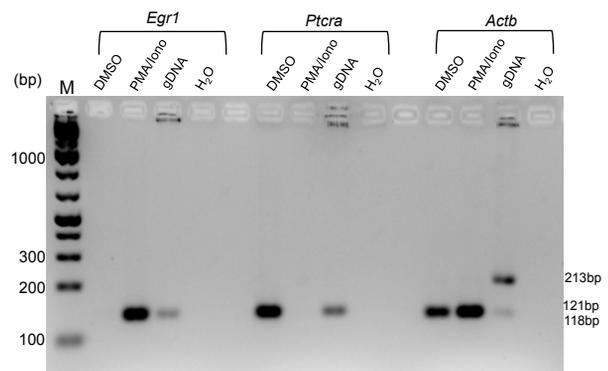
Figures supplémentaires



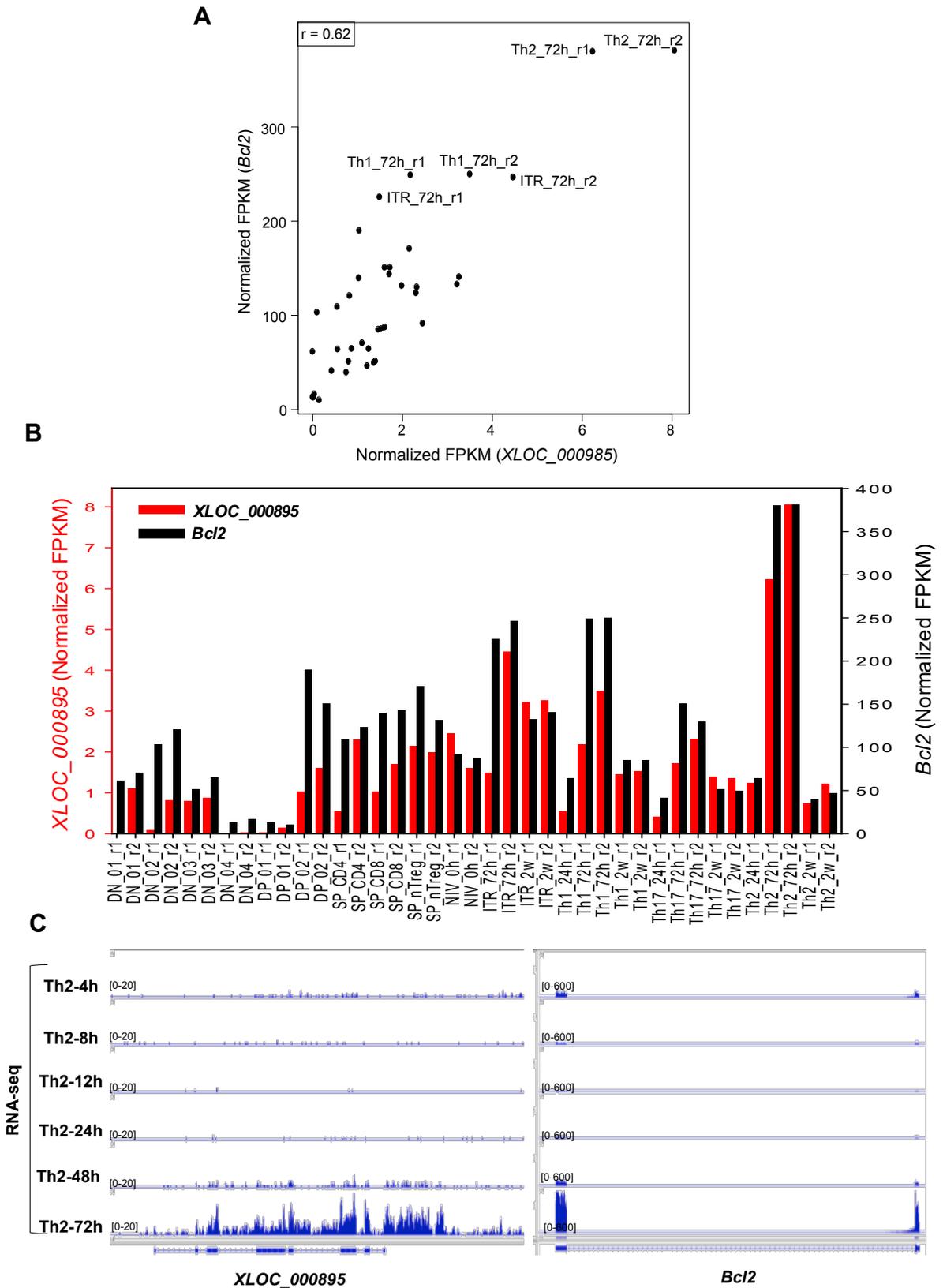
Supplementary Figure 1. A) Incubation time and dose dependent effects of the PMA/ionomycin treatment on the *Tcra* expression in P5424 cells. *Tcra* expression levels were measured by qPCR. **B)** Barplots of RT-qPCR analysis showing an induction of *Tcra* and *Egr1*, as well as a repression of *Ptcra* and *Hes1* in P5424 cells upon PMA/ionomycin stimulation. **C)** Schematic representation of the P5424 reporter cell line expressing the hCD25 surface marker via the *Ptcra* promoter. **D)** Cytometry analysis histograms showing the reduction of the hCD25 at the cell surface in presence of PMA/ionomycin. **E)** Proliferation curve of P5424 cells treated with DMSO or PMA/ionomycin for 4h. Cells were counted at the indicated time points. **F)** Histogram showing the percentage of apoptotic P5424 cells (Annexin-V and Propidium iodide double positive cells) after PMA/ionomycin treatment in two independent experiments (rep). **G)** Representative cytometry analysis of P5424 cells stained with propidium iodide and Annexin-V after 48 hours of PMA/ionomycin treatment. **H-I)** Gene set enrichment analysis (GSEA) of repressed (**H**) and induced (**I**) genes between DN4 and DN3a thymocytes in DMSO versus PMA/ionomycin treated P5424 cells. Heat maps showing the relative gene expression of the top 50 genes of each gene set (red = high, blue = low) in DMSO (DM, 3 replicates) and PMA/ionomycin (PI, 3 replicates)-treated P5424 cells.

A**B**

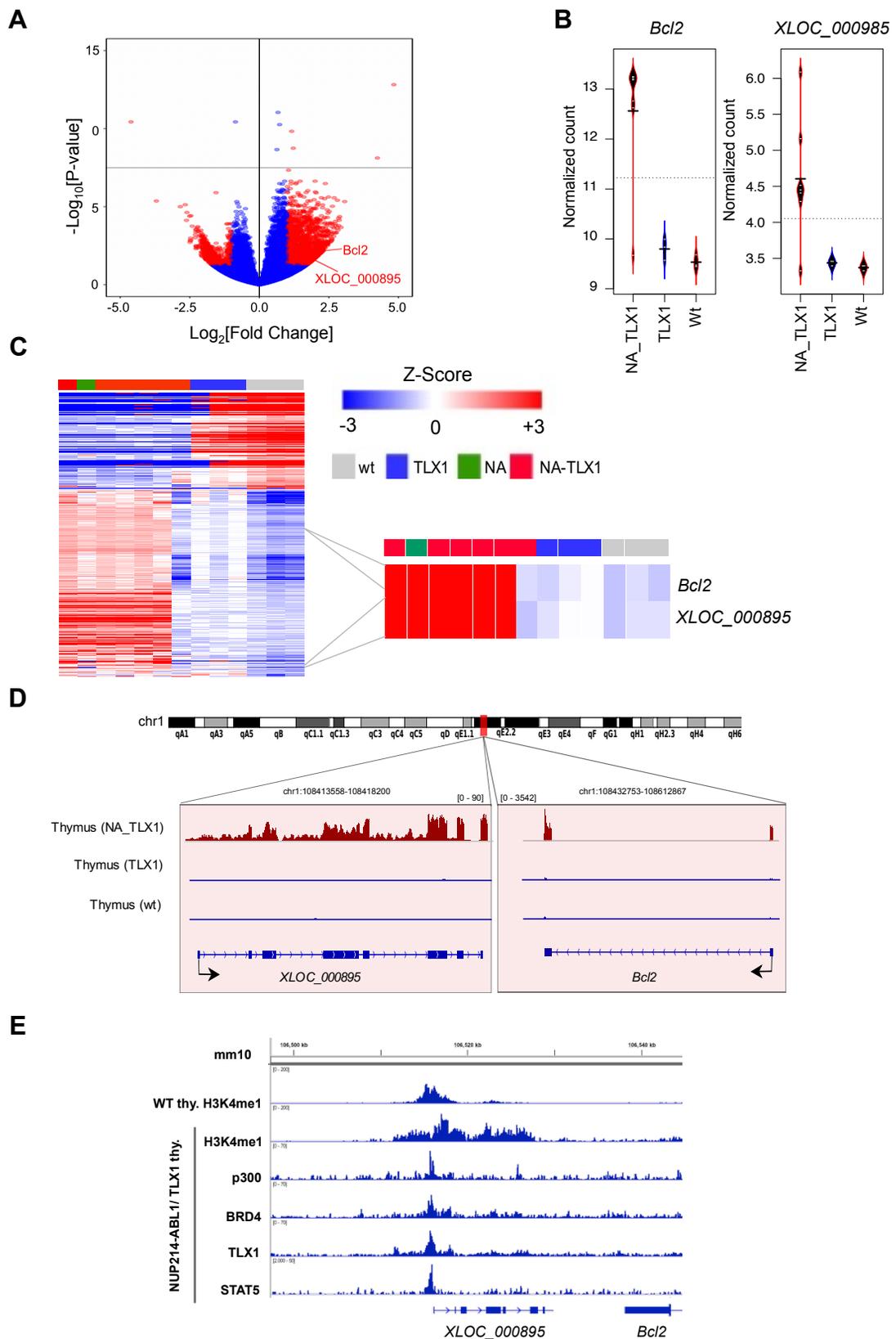
Supplementary Figure 2. A) Density plots showing the tissue-specificity scores distribution for each transcript class. Vertical lines indicate the mean tissue-specificity score of the corresponding class. **B)** Distance of the induced and the repressed lncRNAs relative to the TSS of associated coding genes using the GREAT tool.

A**B****C**

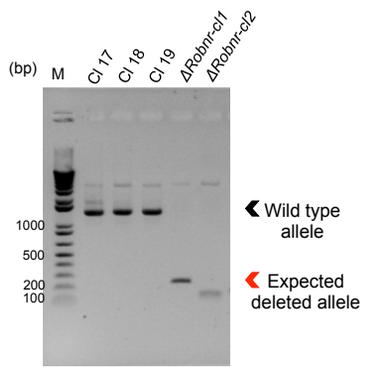
Supplementary Figure 3. A) Line plots showing the expression levels of co-regulated pairs across samples. **B)** Heat maps of co-regulated pairs showing their co-repression or their co-induction across two conditions (DMSO (DM), PMA/ionomycin (PI)). **C)** Conventional PCR amplification of *Egr1* and *PtcrA* genes. *Actb* is an internal control gene and the genomic DNA (gDNA) is an experimental control.



Supplementary Figure 4. **A)** Scatter plot showing the correlation between *Xloc_000895* and *Bcl2* expressions in mouse T-cell populations using RNA-seq data from Hu et al. 2013. **B)** Bar plots showing the expression levels of *Bcl2* and *XLOC_000895* in each mouse T-cell differentiation stage. **C)** IGV genome browser screenshots displaying tracks for RNA-seq data at the *XLOC_000895* and *Bcl2* loci during the in vitro Th2 differentiation.



Supplementary Figure 5. **A**) Volcano plot depicting genes differentially expressed genes between leukemia and wildtype samples (red dots). The *Bcl2* and *XLOC_000895* are highlighted. **B**) Bean plots illustrating the expression distribution of *Bcl2* (left panel) and *XLOC_000895* (right panel) in different transgenic mouse models (NA = NUP214/ABL1). **C**) Heat maps of differentially expressed genes between wildtype and leukemic models. **D-E**) Genome browser screenshots displaying the RNA-seq signal in leukemic and normal thymocytes on the *XLOC_000895* and *Bcl2* loci (the scales are indicated on the top of each panel). **D**) and the genomic coverage of epigenetic marks and transcription factors near the *XLOC_000895* promoter (**E**).



Supplementary Figure 6. Assessment of successful *Robnr* deletion by classic PCR validation in corresponding P5424 clones.

Résumé

Introduction : La transcription omniprésente dans notre organisme génère des milliers d'ARN non codants (ARNnc) pouvant réguler l'expression des gènes et jouer un rôle important dans divers processus biologiques tel que le développement. Parmi ces ARN, les long ARN non codants (lncARN) qui restent jusqu'à présent mal caractérisés malgré leurs rôles importants dans la régulation génique.

Objectifs : L'objectif principale a été d'identifier et de caractériser les lncARN impliqués dans le développement des lymphocytes T. La présente étude a été menée en se servant des données de séquençage à haut débit de la lignée cellulaire P5424 stimulée par le PMA/ionomycin, générées par le laboratoire de Théories et approches de la complexité génomique (TAGC) à Luminy (Université Aix-Marseille, AMU).

Résultats : L'analyse des données de séquençage à haut débit de l'ARN (ARN-seq), nous a permis de sélectionner huit paires de lncARN et gènes codants, voisins co-régulés par la stimulation au PMA/ionomycin, dont trois réprimés et cinq induits. Aussi, l'expression différentielle de ces candidats a été validée par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) classique et par la PCR quantitative en temps réel (qPCR). L'étude de la cinétique d'expression des paires lncARN/gènes codants, après la stimulation au PMA/ionomycin, nous a permis de sélectionner des couples lncARN/gènes codants voisins, avec des profils d'expression hautement corrélés, ce qui suggère une régulation par les lncARN. Parmi ces paires, nous avons constaté que XLOC_000895/*Bcl2* (B-cell lymphoma 2) présentait une cinétique d'activation très similaire, suggérant un lien fonctionnel de régulation en cis. La délétion de XLOC-000895 (*Robnr*) par la technique CRISPR-Cas9 affecte l'expression de son gène codant voisin *Bcl2*. Par ailleurs, l'analyse de ChIP (chromatine immunoprécipitation) pour étudier l'enrichissement H3K4me3 (La tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3) a révélé que la délétion de *Robnr* affecte également l'enrichissement en H3K4me3 du locus *Bcl2*.

Conclusions : Nos résultats constituent une première étape dans la caractérisation des lncARN, qui peuvent être impliqués dans la différenciation et l'activation des cellules T. Ils méritent d'être enrichi à l'aide d'études complémentaires, afin de confirmer la contribution spécifique du locus de *Robnr* au développement des cellules T, et son rôle critique dans la régulation de l'expression du gène *Bcl2*.

Mots clés : lncARN ; ARN-seq ; lymphocytes T ; CRISPR-Cas9.

Abstract

Introduction : The ubiquitous transcription in our body generates thousands of non-coding RNAs (ncRNAs) that can regulate gene expression, and plays an important role in various biological processes, like development. Among this RNAs, long non coding RNAs (lncRNAs), are still poorly characterized despite the importance of their regulatory roles.

Objectives : We tried to identified and characterize lncRNAs that could be involved in the development of T lymphocytes. The study was conducted by using the high throughput sequencing data, generated by the TAGC laboratory in MARSEILLE, of the P5424 cell line stimulated with PMA/ionomycin.

Results : Analysis of the RNA-seq data allowed us to select eight pairs of lncRNAs and neighboring coding genes, co-regulated by PMA/ionomycin stimulation, of which three where repressed and five where induced. The differential expression of these candidates was validated by conventional polymerase chain reaction (PCR) and by quantitative real-time PCR (qPCR). The gene expression kinetics after the PMA/ionomycin stimulation led to the selection of lncRNA/coding gene pairs with markedly well correlated expression profiles. Among this gene pairs, we found that the XLOC_000895/*Bcl2* pair display a highly similar kinetic of activation, hence strongly supporting a functional cis-regulatory link. The deletion of XLOC-000895 (*Robnr*) by the CRISPR-Cas9 method affects the expression of its neighbor coding gene, *Bcl2*. In addition, H3K4me3 (*histone H3 tri-methylation at lysin 4*) ChIP (Chromatin immunoprecipitation) analysis revealed that the *Robnr* deletion decreases H3K4me3 levels in the *Bcl2* locus.

Conclusions : Our findings are very promising given that they can constitute a first step in the characterization of lncRNAs, which may be involved in the differentiation and activation of the T-cells. The current study deserves to be pursued in order to confirm the specific implication of *Robnr*'s in T-cell development through the regulation of *Bcl2* gene.

Keywords : lncRNAs ; RNA-seq ; T lymphocytes ; CRISPR-Cas9.

ملخص

مقدمة: عملية النسخ المستمرة في اجسامنا تولد الاف النسخ من الحمض النووي الريبوزي أو الذي لا يحول الى بروتين ncrRNA ولكن ينظم التعبير الجيني ويلعب دورا هاما في الوظائف الحيوية وفي العمليات البيولوجية المختلفة. من بينها، الحمض النووي الريبوزي الطويل او lncRNA الذي لا يزال الى الوقت الحالي غير معروف بشكل جيد على الرغم من أهمية أدواره التنظيمية.

الهدف: الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو معرفة و تحديد lncRNA المشاركة في تطوير الخلايا المفاوية التائية (T-cell) أجريت الدراسة باستخدام بيانات تحليل التسلسل الوراثي باستخدام أدوات المعلوماتية الحيوية التي تم إنشاؤها في مختبر (TAGC) بمارسيليا، للخلية التائية P5424 المحفزة ب PMA/ionomycin.

النتائج: تحليل بيانات (RNA-seq) سمح لنا اختيار ثمانية (08) أزواج متجاورة و بنفس التنظيم من lncRNA و الجينات التي تحول الى بروتين بعد التحفيز ب PMA/ionomycin منها ثلاثة (03) مكبوتة وخمس (05) مستحثة. أيضا، تم التحقق من صحة التعبير النفاضلي للأزواج المختارة عن طريق PCR الكلاسيكي و PCR بالزمن الحقيقي. سمحت لنا دراسة حركية التعبير للأزواج المختارة بعد تحفيزها ب PMA/ionomycin، لاختيار أزواج lncRNA و الجينات التي تحول الى بروتين التي تتميز ببيروفايلات تعبير مترابطة تشير إلى تنظيم محتمل بواسطة lncRNA. من بين الأزواج المترابطة بشكل جيد، وجدنا أن الزوج XLOC_000895/*Bcl2* أظهر حركية تشبيعية متشابهة جدًا، مما يشير إلى احتمال وجود ارتباط تنظيمي وظيفي. يؤثر حذف XLOC_000895 (*Robnr*) بواسطة تقنية CRISPR-Cas9 على تعبير الجين المجاور *Bcl2*. بالإضافة إلى ذلك، تحليل ChIP الرامي لمعرفة مدى وفرة H3K4me3، كشف أن حذف *Robnr* يؤثر على مدى وفرة H3K4me3 في الجين المجاور *Bcl2*. كل هذه النتائج تدل على انه من المحتمل ان يمثل *Robnr* منظم حاسم لتعبير الجين *Bcl2*.

الاستنتاجات: النتائج التي تم الحصول عليها واعدة للغاية وتشكل خطوة أولى في وصف lncRNA التي قد يكون لها دور مهم في تمايز وتفعيل الخلايا المفاوية التائية. يستحق العمل الحالي المتابعة بتحقيق دراسات تكميلية أخرى، من أجل تأكيد المساهمة الخاصة ل *Robnr* في تطوير الخلايا التائية من خلال تنظيم *Bcl2*.

الكلمات المفتاحية: lncRNA؛ RNA-seq؛ الخلايا المفاوية التائية؛ CRISPR-Cas9.