

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ – LILLE 2

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ

DISCIPLINE : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

par

Laure DELESTRÉ

Régulation transcriptionnelle du gène *RHOH* et potentielles cibles de la protéine dans différents modèles hématopoïétiques normaux et leucémiques

Thèse dirigée par le **Dr Sylvie ZOUITINA-GALIEGUE**

Soutenue le **17 Décembre 2010** devant le Jury composé de :

Professeur	Bruno QUESNEL	Président
Docteur	Josiane PIERRE	Rapporteur
Docteur	Nadine VARIN-BLANK	Rapporteur
Professeur	Xavier TROUSSARD	Examineur
Docteur	Carl Simon SHELLEY	Examineur
Docteur	Sylvie ZOUITINA-GALIEGUE	Directeur de Thèse

Les cellules leucémiques persistent chez l'hôte malgré les traitements. Cette persistance des cellules tumorales, en particulier à long terme, constitue le facteur majeur d'échec des stratégies thérapeutiques mises en place. Notre équipe étudie les facteurs pouvant contribuer au phénomène de persistance des cellules leucémiques chez l'hôte, principalement au cours des hémopathies malignes de type leucémies aiguës et leucémies myéloïdes chroniques. Le Docteur Sylvie Zouitina-Galiègue en collaboration avec le Docteur Carl Simon Shelley ont mis en évidence la répression du gène *RHOH* dans deux hémopathies malignes : la leucémie T de l'adulte et la leucémie à tricholeucocytes, un facteur de progression tumorale dans cette dernière. Ces deux chercheurs sont tous deux les porteurs de mon projet de thèse. Le Docteur Sylvie Zouitina-Galiègue possède des connaissances pointues sur l'expression du gène *RHOH* et les méthodes pour étudier sa régulation, et le Docteur Carl Simon Shelley a des acquis aussi bien sur la régulation transcriptionnelle et les techniques associées, mais aussi sur les deux pathologies étudiées. Ils sont donc complémentaires sur ce projet. Même si officiellement, le Docteur Sylvie Zouitina-Galiègue est le directeur de cette thèse. Officieusement, ces deux personnes ont participé toutes deux à la gestion de ce projet. Le Docteur Carl Simon Shelley n'est membre du jury pas en tant qu'examinateur, mais en tant que co-directeur de thèse pour moi.

Tumor progression is characterized by the persistence of tumor cells in hosts, in spite of therapy. Recurrence from minimal residual disease is a major cause of cancer death. Thus, the understanding of how cancer cells become and remain persistent may lead to new strategies, to prevent relapse. In our team, we focused to identify new findings, which offer new opportunities to design specific treatments of hematological malignancies as acute or chronic leukemia, and to modify the balance in favor of the host immune response. Sylvie Zouitina-Galiègue, Ph.D., and Carl Simon Shelley, Ph.D., have collaborated with each other and have shown that the *RHOH* gene is abnormally underexpressed in Adult T cell Leukemia (ATL) and Hairy Cell Leukemia (HCL). This phenomenon contributes to tumor progression in HCL cells. The project aims at identifying molecular mechanisms in order to reconstitute *RHOH* gene expression in HCL and ATL, and develop novel treatments for these malignancies. Sylvie Zouitina-Galiègue is a specialist in *RHOH* gene expression in hematopoietic cells, and Carl Simon Shelley is an expert in transcriptional regulation and has already described the transcriptional deregulation of *CD11C* by JunD in HCL. So, officially, Sylvie Zouitina-Galiègue is the director of this thesis. In the reality, they contributed equally to the Ph.D. supervising. Consequently, Carl Simon Shelley will participate in this jury as a supervisor and not as an examiner.

Remerciement

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Merci au Professeur Bruno Quesnel, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier du Service des Maladies du Sang du Centre Hospitalier et Universitaire Huriez de Lille et Responsable de l'équipe 3 de l'unité U837 INSERM du Centre de Recherche Jean Pierre Aubert d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse et de m'avoir accueillie au sein de son équipe,

Merci à MMes les Docteurs Nadine Varin-Blank, Directeur de Recherches au sein de l'unité UMR U978 INSERM, à Bobigny et Josianne Pierre, Directeur de Recherches au sein de l'unité U749 INSERM, à Chatenay-Malabry, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit.

Merci également au Professeur Xavier Troussard, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Chef de Service du Laboratoire d'Hématologie Biologique du Centre Hospitalier et Universitaire de Caen, pour avoir accepté d'examiner mon mémoire et de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier plus particulièrement mes deux directeurs de thèse, le Docteur Sylvie Zouitina-Galiègue, Chargé de Recherches de l'équipe 3 de l'unité U837 INSERM du Centre de Recherches Jean Pierre Aubert, Lille, et le Docteur Carl Simon Shelley, Directeur du Laboratoire d'Hématologie/Oncologie du Centre Médical Gundersen Lutheran, La Crosse, Wisconsin, Etats-Unis. Leurs connaissances, leur logique et leur façon de penser ont été pour moi d'une grande valeur. Leur compréhension, leur encouragement et leurs conseils personnels ont été un enrichissement pour la réalisation de cette thèse. Je vous remercie tous deux pour vos commentaires précis et constructifs que vous avez apportés tout au long de ce travail.

Merci à toi Sylvie, tu as toujours été présente, à tous moments, dans les moments les plus forts et aussi les plus durs mais aussi au cours de nombreux week ends.

Merci à toi Simon, malgré la distance, tu as également été présent et tu as participé pleinement à nos réflexions. Merci également pour tes déplacements annuels au laboratoire.

Merci infiniment.

I would like to express my deep and sincere gratitude to my supervisors, Doctor Sylvie Zouitina-Galiègue, Researcher of Unity U837 INSERM of Jean Pierre Aubert Research Center, Lille, and Doctor Carl Simon Shelley, Ph.D., Director of Hematology/Oncology Research, Gundersen Lutheran Medical Center, La Crosse, Wisconsin USA. Their knowledge and their logical way of thinking have been of great value for me. Their understanding, encouraging and personal guidance have provided a good basis for the present thesis. Thank you very much for your detailed and constructive comments, and for your important support throughout this work.

Thank you Sylvie, you were really implicated in my work, all the time, at good and hard moments and during weekends too.

Thank you Simon, even if you were far away, you were really implicated too in this project and you participated every times in our reflections. Thank you too for your comings every year.

Thank you very much.

Un grand merci au Professeur Jean Krembel et au Conseil d'Administration de l'Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille, pour leur soutien financier. Sans eux, cette fin de thèse n'aurait pas été possible.

Merci au Docteur Maud Collyn d'Hooghe, Ex-Directeur Administratif de l'Institut Fédératif de Recherche 114 de l'Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, pour le maintien tout au long de cette thèse d'une plateforme de quantification de produits de PCR en temps réel toujours fonctionnelle et au personnel de l'IFR114 pour leur accueil chaleureux,

Je tiens à remercier aussi Claude Denis, dont l'aide sur le plan technique et les grandes qualités humaines m'ont beaucoup aidée lors de mes deux premières années de thèse,

Merci également à Nathalie Jouy, pour les tris cellulaires qu'elle a effectués pour ce travail, au Docteur Xavier Thuru, pour la mise en place d'un nouveau système de Western Blot qui m'a fait gagner beaucoup de temps et qui m'a réconciliée avec cette technique,

Merci à la Plateforme AGILENT-AFFYMETRIX, pour la réalisation des expériences de transcriptome, et surtout leur accueil chaleureux, leur disponibilité, et pour m'avoir laissée utiliser leurs bureaux lorsque j'en avais besoin, en particulier au Docteur Frédéric Leprêtre, mais aussi à MM les Docteurs Martin Figeac et Jean-Pierre Kerckaert et aux petites puces, Sabine Quief et Céline Villenet,

Merci également au Docteur Susanna Schraen, pour son aide pour la technique du Luminex,

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe, Sami, Isabelle, Dominique, Virginie, Carine, Emilie, Nicolas et aussi le personnel retraité, comme le Docteur Jean-Claude D'Halluin, pour leur gentillesse, leur aide et les discussions que j'ai pu avoir avec eux, et aussi le personnel administratif de l'Institut pour la Recherche sur le Cancer de Lille, Micheline et Mathias, pour leur disponibilité,

Je voudrais également remercier l'équipe 4 de l'unité U837 INSERM, notamment le Docteur Marie-Hélène David-Cordonnier, le Docteur Denise Bélaïche, Docteur Paul Peixoto, le futur Docteur Gaëlle Lenglet, Sabine Depauw, pour leur aide, leur gentillesse et leur nombreux échanges, merci de m'avoir accueillie au sein de votre équipe lors de ma formation pour la technique de retard en gel et pour la mise au point d'autres expériences,

Merci également aux nombreux volontaires sains qui m'ont donné plusieurs gouttes de leur sang en échange d'un bon petit déjeuner.

Un grand merci à mes amis: particulièrement à Barbara, pour sa présence et son soutien tout au long de cette thèse; à Louisa et Nathalie, pour les sorties piscines sportives mais aussi détendues, et aussi à tous les autres,

Finalement, j'adresse un grand merci à toute ma famille, qui a toujours été là lorsque j'en ai eu besoin, en particulier à ma sœur, à ma mère, à mon père et à mon beau-frère,

Et aussi, un remerciement particulier pour Benoit, merci pour ton soutien pour ces derniers mois, heureusement que tu étais là pour me rassurer et de m'avoir aidée à prendre du recul,

Résumé

RhoH est une petite protéine G de la famille Rho constitutivement activée. Cette protéine, exclusivement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, intervient dans le développement du système immunitaire, par exemple, lors de la différenciation des lymphocytes T et la signalisation des récepteurs TCR, BCR et FcεRI présents respectivement à la surface des cellules T, B et des mastocytes. Au laboratoire, et en collaboration avec le Dr Carl Simon Shelley, nos précédents travaux ont montré que la répression du gène *RHOH* mise en évidence dans la leucémie à tricholeucocytes (HCL) est un facteur de progression tumorale. Cette expression faible est le résultat d'une diminution des transcrits *RHOH* initiés en amont de l'exon 4. Le même phénomène a également été observé dans certaines lignées cellulaires de la leucémie T de l'adulte (ATL). Ces deux pathologies sont caractérisées par une prolifération anormale de lymphocytes matures activés de type B (HCL) ou de type T (ATL). Nous avons donc projeté de comprendre les mécanismes moléculaires intervenant dans la régulation du gène *RHOH* au cours de l'activation lymphocytaire B et T, afin de mettre en évidence des événements impliqués dans la répression de *RHOH* dans l'HCL et l'ATL. Notre objectif serait d'y restaurer cette expression et ainsi d'essayer de contrecarrer le phénotype leucémique, les traitements étant soit inefficaces (ATL), soit satisfaisants mais associés à des taux de rechutes assez élevés (HCL).

Dans les lymphocytes B et T, l'expression du gène *RHOH* est principalement due à l'activité du promoteur P3, situé en amont de l'exon 4. Le promoteur P3 minimal a été caractérisé dans les cellules B et correspond à la séquence [-236/+67], en regard du site d'initiation de la transcription (+1). Nos travaux ont montré que P3 est régulé par le complexe AP1 dans la lignée lymphoïde B Raji : positivement par les facteurs de transcription JunB et c-Fos, et au contraire, négativement par la protéine JunD. De plus, le facteur NFκB contrôlerait lui aussi positivement l'activité du promoteur P3 dans ces mêmes cellules. Dans les lignées modèles de la leucémie à tricholeucocytes, nous avons mis en évidence une répression du promoteur P3 minimal, à l'origine de la diminution du taux des transcrits *RHOH*. Cependant, l'implication du complexe AP1 dans la dérégulation de P3 dans les cellules HCL n'a pas été établie. En revanche, nos données préliminaires montrent que l'inhibition du facteur de transcription NFκB pourrait permettre de lever la répression du promoteur, ceci dans plusieurs lignées cellulaires HCL. La validation des résultats dans une majorité de lignées HCL et la confirmation de l'augmentation

du taux de transcrits *RHOH* après inhibition de NFκB pourrait nous permettre de proposer ce facteur comme cible pour lever la répression de *RHOH* dans l'HCL.

Au cours de l'activation lymphocytaire T, l'expression des transcrits *RHOH* initiés en amont de l'exon 4 est biphasique : une forte augmentation du taux des ARN messagers est observée, reproduite par l'utilisation d'un ionophore pour le calcium (ionomycine), suivie d'une répression, mimée par un analogue du diacylglycérol ou DAG (PMA ou Phorbol-12-Myristate-13-Acétate). L'étude préliminaire de la régulation du promoteur P3 dans les cellules T a permis de montrer la présence de sites de fixation pour des facteurs de transcription régulés par la voie calcique et impliqués dans l'augmentation de l'expression de *RHOH* (entre les positions -236 et -201) et pour des facteurs de transcription régulés par la voie du DAG et entraînant la répression du gène (entre les positions -583 et -380). La nature des facteurs de transcription impliqués n'a pas encore pu être déterminée. Compte tenu de l'état de nos avancées sur ce sujet, nous n'avons pas encore montré la répression du promoteur P3 (en terme d'activité promotrice) dans les lignées modèles de la leucémie T de l'adulte.

En parallèle, ce projet a été axé sur l'identification de nouvelles cibles potentielles de RhoH dans les lymphocytes B et T. En définissant ces effecteurs, nous pourrions ainsi mieux comprendre le rôle de la protéine RhoH dans ces cellules mais aussi les conséquences de la répression du gène dans les leucémies HCL et ATL. Dans les lymphocytes B, l'expression de *RHOH* semble réguler positivement l'expression des gènes *RAMPI* et *PRKCA*, codant deux protéines impliquées dans l'inhibition de la prolifération et de la survie cellulaire. RhoH semble donc importante dans le contrôle de la croissance cellulaire dans les cellules B. Dans les lymphocytes T, l'expression de *RHOH* semble favoriser l'expression de gènes codant la protéine SLA, un inhibiteur de la voie du TCR, ou encore de l'interleukine 16, un chémoattractant des monocytes et des lymphocytes T CD4⁺. L'expression de l'ensemble de ces protéines tendrait à diminuer les processus d'activation cellulaire T et au contraire à favoriser les réactions immunitaires inflammatoires à l'encontre des lymphocytes T. Compte tenu de nos objectifs visant à contrecarrer les phénotypes leucémiques de l'HCL et l'ATL par la levée de la répression du gène *RHOH*, il serait important de valider ces résultats dans des modèles respectifs et d'étudier la conséquence des variations d'expression de ces gènes sur le phénotype cellulaire *in vitro* et *in vivo*.

De manière intéressante, nous avons montré dans des cellules mononucléées isolées de patients atteints de leucémie aigue myéloïde (LAM), que l'expression du gène *RHOH* est réprimée par le facteur de transcription JunD, comme décrit dans les cellules lymphoïdes B. De plus, l'augmentation de la quantité de *RHOH* observée est associée à une induction du gène *PRKCA*, une cible potentielle mise en évidence dans les cellules B. Ces résultats tendent à montrer qu'une forte expression de *RHOH* pourrait entraîner une réduction de la prolifération des cellules LAM. La modulation de l'expression de JunD pourrait donc être un moyen d'induire l'expression du gène *RHOH* dans les cellules LAM afin de peut être réduire la progression tumorale.

Nos travaux ont ainsi apporté de nouvelles informations sur la régulation du gène *RHOH* dans les lymphocytes B et T, mais aussi dans les cellules myéloïdes. Nos résultats ont également permis de mettre en évidence des facteurs de transcription dont l'inhibition entraînerait une augmentation de l'expression du gène *RHOH* dans l'HCL et dans les cellules LAM. Ces résultats prometteurs nécessiteraient d'être approfondis afin de pouvoir identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie aigue myéloïde.

Mots clés : *RHOH*, Régulation Transcriptionnelle, Leucémies.

Abstract

The hematopoietic GTPase RhoH is an atypical family member of the Rho GTPases as it is constitutively active and not regulated through the classical cycling between GTP- and GDP-bound state. A number of studies investigated the role of RhoH in hematopoietic cells. This protein exhibits essential functions in thymocyte development and TCR, BCR, FcεRI signaling in T, B and mast cells, respectively. Previous experiments from our laboratory reported that HCL is characterized by abnormal underexpression of RhoH, corresponding to a decreased level of *RHOH* mRNA initiated upstream of exon 4. Reconstitution of RhoH expression reduced proliferation, adhesion and migration that is central in HCL pathogenesis. Transcriptional repression of this gene was also observed in another leukemia, Adult T cell Leukemia (ATL). Aimed at identifying new therapeutic targets to combat HCL and ATL, we wanted to examine molecular mechanisms implicated in RhoH underexpression in both diseases. HCL and ATL are chronic lymphoproliferative disorders characterized by proliferation of mature cells with memory B cell or T-helper cell phenotype, respectively. In the first part of our work, we wanted to investigate molecular mechanisms mediating normal RhoH expression in activated B and T cells, then we tempted to identify transcription factors implicated in RhoH repression in HCL and ATL.

Firstly, we showed that *RHOH* gene expression observed in B and T cells was mostly due to transcriptional activity of P3 promoter, upstream of *RHOH* exon 4. The promoter was isolated in B cells, spanning nucleotides [-236/+67] relative to the transcription start site. We reported that AP1 transcription factor regulated *RHOH* expression in a B cell line, Raji. The Jun family member JunD was able to bind to endogenous P3 promoter and could act as a repressor of *RHOH* gene expression. In contrast, JunB and c-Fos seemed to act as activators of *RHOH* expression. Our results suggested also that the transcription factor NFκB could positively regulate this process in B cells. In HCL, we found that the underexpression of *RHOH* mRNA observed in these cells is mediated by repression of P3 promoter. By investigating AP1 implication in this event, we provided no evidence of *RHOH* expression control by this transcription factor in this disease. However, inhibition of NFκB elicited *RHOH* expression reconstitution in some HCL cell lines.

T cell activation induced a biphasic kinetics of expression of *RHOH* mRNA initiated upstream of exon 4. We observed a high increase of *RHOH* transcript level in activated T cells, mimicked by use of ionomycin, and followed by an important decrease, mimicked by use of PMA or Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (an analog of DiAcylGlycerol, DAG). *RHOH* P3 promoter was isolated in a T cell line, Jurkat, then we investigated putative binding sites for transcription factors, which could be implicated in this biphasic event in T cells. Our preliminary results have shown that some potential binding sites for transcription factors related to calcium pathway and inducing *RHOH* expression are present between nucleotides -236 and -201; also, sites for transcription factors induced by DAG pathway and repressing this gene are present between nucleotides -583 and -380. However, transcription factors have not yet been identified. In addition, we investigated signaling pathways mediated by increased *RHOH* gene expression induced during T cell activation. In ATL, we could not correlate *RHOH* repression to P3 promoter deregulation. Because all promoter regions have not been studied up to now, our work needs to be completed by additional investigation.

Secondly, our work has focused onto identification of potential RhoH targets in B and T cells, which could help in understanding molecular signaling of RhoH and consequences of its repression in HCL and ATL cells. We identified *RAMP1* and *PRKCA* as potential RhoH effectors in B cells, since an increase in *RHOH* transcripts induced their expression. These proteins are implicated in the reduction of cellular proliferation and survival. So RhoH seemed to be related to B cells growth. In T cells, *RHOH* expression is associated to increased mRNA levels of *SLA*, encoding an inhibitor of TCR signaling, and of *IL16*, a monocytic and lymphocytic chemoattractant cytokine. All together, these proteins tend to inhibit the TCR pathway or to enhance inflammation. It could be interesting to study consequences of these expressions upon T cells phenotype. In Acute Myeloid Leukemia, we showed that the low level of *RHOH* expression could be increased by *JUND* invalidation, and that this induction is associated to higher quantities of *PRKCA* mRNA. These results are similar to those described in B cells, suggesting common RhoH signaling pathways in B and myeloid cells.

Finally, we have described in this work new molecular mechanisms involved in normal *RHOH* expression in B and T lymphocytes. We also are the first team having reported promising results showing that inhibition of *NFκB* or *JUND* transcription factors expression

could reconstitute *RHOH* expression in HCL and AML, respectively. We also presented a new RhoH target, common in B and myeloid cells, *PRKCA*. It will therefore be of interest to study consequences of its expression in these cells and to validate its function in reducing tumoral progression.

Key words : *RHOH*, Transcriptional Regulation, Leukemia.

Sommaire

Sommaire.....	1
Abréviations	5
1 Introduction	7
1.1 La famille des Rho GTPases.....	7
1.1.1 La superfamille Ras	7
1.1.2 La famille Rho	13
1.2 RhoH, un membre atypique de la famille Rho	34
1.2.1 Le gène RHOH.....	34
1.2.2 La protéine RhoH	43
1.3 Rôles physiologiques et pathologiques de RhoH dans le système hématopoïétique.....	48
1.3.1 Rôle de RhoH dans les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques.....	48
1.3.2 RhoH dans l'immunité innée	50
1.3.3 RhoH et l'immunité acquise.....	55
1.4 Tableau récapitulatif des fonctions de RhoH et des protéines Rho dans le système hématopoïétique.....	68
2 Objectifs.....	71
3 Matériel et Méthodes	74
3.1 Méthode de culture cellulaire	74
3.1.1 Les lignées cellulaires.....	74
3.1.2 Isolement et purification des lymphocytes T	76
3.1.3 Isolement des cellules mononucléées provenant du sang périphérique de patients atteints de leucémie aigue.....	77
3.1.4 Culture cellulaire	78
3.1.5 Autres réactifs pour la culture	79
3.2 Méthode d'analyse de l'expression de protéines membranaires par cytométrie en flux.....	79
3.2.1 Matériel	79

3.2.2	Marquage membranaire.....	80
3.2.3	Tri cellulaire.....	80
3.3	Méthode d'analyse du niveau d'expression des gènes.....	80
3.3.1	Extraction des ARN totaux.....	80
3.3.2	Synthèse des ADNc.....	81
3.3.3	Réactions de RT-PCR.....	81
3.4	Méthode de clonage des fragments du promoteur P3.....	84
3.4.1	Matériel.....	84
3.4.2	Obtention des fragments du promoteur P3 du gène RHOH.....	85
3.5	Méthode de préparation des stocks d'ADN plasmidique.....	88
3.5.1	Matériel plasmidique.....	88
3.5.2	Amplification de l'ADN plasmidique.....	89
3.6	Méthode d'analyse de l'activité du promoteur P3 du gène RHOH.....	90
3.6.1	Transfections transitoires.....	90
3.6.2	Transfections stables.....	92
3.7	Méthode de quantification des cytokines sécrétées par les techniques ELISA et Luminex.....	93
3.7.1	Dosage des cytokines par la méthode ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay).....	93
3.7.2	Dosage des cytokines par la méthode Luminex™.....	95
3.8	Méthode d'analyse des interactions facteurs de transcription-ADN.....	96
3.8.1	Technique de retard en gel.....	96
3.8.2	Technique d'Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP).....	97
3.9	Méthode d'analyse de l'expression des protéines par électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE.....	100
3.9.1	Matériel.....	100
3.9.2	Préparation des échantillons.....	100
3.9.3	Préparation des gels et conditions de migration.....	101
3.9.4	Transfert sur membrane et immunodétection des protéines.....	101

3.10 Méthode d'analyse bioinformatique	102
3.10.1 Identification de sites consensus pour des facteurs de transcription sur P3	102
3.10.2 Identification de régions conservées entre espèces dans la région du promoteur P3 102	
4 Résultats	103
4.1 Mise en évidence de l'activité prédominante du promoteur P3 dans les lymphocytes B et T	103
4.1.1 Etude de l'activité des promoteurs P1, P2 et P3 du gène RHOH dans les lymphocytes B et T.....	103
4.1.2 Conclusion – Mise en évidence de l'activité prédominante du promoteur P3 dans les lymphocytes B et T	109
4.2 Etude des mécanismes moléculaires contrôlant l'activité du promoteur P3 du gène RHOH dans les lymphocytes B et T	110
4.2.1 Analyse in silico de la région promotrice P3	110
4.2.2 Etude de la régulation du promoteur P3 du gène RHOH dans les cellules lymphoïdes B et de sa répression dans la leucémie à tricholeucocytes	116
4.2.3 Etude de la régulation du gène RHOH dans les lymphocytes T et de sa répression dans la leucémie T de l'adulte.....	152
4.3 Identification de potentielles nouvelles cibles de RhoH dans les cellules lymphoïdes B et T	168
4.3.1 Recherche de nouvelles cibles potentielles de la protéine RhoH dans les cellules lymphoïdes B.....	168
4.3.2 Recherche d'effecteurs protéiques de RhoH dans les lymphocytes T.....	172
4.4 Induction du gène RHOH et de sa cible potentielle, PRKCA, par invalidation de la protéine JunD dans les leucémies aiguës myéloïdes	184
4.4.1 Etude du rôle de JunD dans la faible expression de RHOH dans les LAM.....	185
4.4.2 PRKCA, une nouvelle cible potentielle de RHOH dans les LAM	188
5 Discussion	190
5.1 P3 est le promoteur gouvernant majoritairement l'expression du gène RHOH dans les lymphocytes	190
5.1.1 L'activité T ou B-spécifique de P1 et P2 est une particularité du gène RHOH.....	190
5.1.2 Facteurs pouvant influencer l'expression tissus-spécifique des transcrits RHOH ..	191

5.2	L'inhibition de NFκB permettrait une levée de la répression du promoteur P3 dans des lignées de la leucémie à tricholeucocytes.....	194
5.3	RAMP1 et PRKCA, nouveaux effecteurs possibles de RhoH dans les cellules lymphoïdes B.....	198
5.4	MAGEA9, MAGEB2, PASD1, SLA, CCRL2 et IL16, nouveaux effecteurs potentiels de RhoH dans les lymphocytes T.....	200
5.4.1	MAGEA9, MAGEB2 et PASD1, gènes codant des antigènes tumoraux	200
5.4.2	SLA, gène codant un inhibiteur de la voie du TCR.....	201
5.4.3	CCRL2 et IL16, protéines impliquées dans l'inflammation.....	202
5.5	Induction du gène RHOH et de sa cible potentielle, PRKCA, par invalidation de JunD dans des cellules de LAM	203
5.5.1	Induction du gène RHOH par invalidation de JunD dans les cellules de LAM.....	204
5.5.2	Induction de PRKCA, une cible potentielle de RhoH, après invalidation de JunD dans les cellules de LAM.....	205
6	Conclusion générale et Perspectives	207
	Références bibliographiques.....	210
7	Annexe 1	230
8	Annexe 2	231
	Tableau 1.....	231
	Tableau 2.....	232
	Tableau 3.....	233
	Tableau 4.....	235
	Tableau 5.....	236
	Tableau 6.....	237
	Tableau 7.....	238
9	Annexe 3	239

Abréviations

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AP1 : Activating protein 1

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ASHM : Hypermutation somatique aberrante (*Aberrant Somatic Hypermutation*)

ATL : Leucémie T de l'adulte (*Adult T cell Leukemia*)

BCR : Récepteur des cellules B (*B cell Receptor*)

BET : Bromure d'éthydiuim

Bp : Paire de bases

BSA : Sérumalbumine bovine (*Bovin Serum Albumin*)

CH : domaine homologue à la Calponine (*Calponin Homology domain*)

ChIP : Immunoprécipitation de la chromatine (*Chromatin ImmunoPrecipitation*)

CLP : Progéniteur lymphoïde commun (*Common Lymphoid Progenitor*)

CMP : Progéniteur myéloïde commun (*Common Myeloid Progenitor*)

CPM : Coup par minute

DAG : Diacylglycérol

DH : domaine homologue à Dbl (*Dbl Homology domain*)

DLBCL : Lymphome diffus à grosses cellules (*Diffuse Large B Cell Lymphoma*)

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DN : Double négatif

dNTP : Désoxynucléotide triphosphate

DP : Double positif

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique

EGTA : Acide éthylène glycol tétra acétique

EMSA : Gel retard (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

GAP : *GTPase Activating Protein*

G-CSF : Facteur de croissance granulocytaire (*Granulocyte - Colony Stimulating Factor*)

GDI : *GTPase Dissociation Inhibitor*

GDP : Guanosine diphosphate

GEF : *Guanine nucleotide Exchange Factor*

GM-CSF : Facteur de croissance des granulocytes et macrophages (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*)

GMP : Progéniteur polynucléaire / monocytique (*Granulocyte Macrophage Progenitor*)

GTP : Guanosine triphosphate

H : Heure

HCL : Leucémie à tricholeucocytes (*Hairy Cell Leukemia*)

HPs : Progéniteurs hématopoïétiques

HSCs : Cellules souches hématopoïétiques

HSC/Ps : Cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques

Ig : Immunoglobuline	QSP : Quantité suffisante pour
IKK : IκB Kinase	RACE-PCR : Amplification rapide d'extrémités d'ADNc par réaction de polymérisation en chaîne
Kb : Kilobases	RPM : Tour par minute (<i>Revolution Per Minute</i>)
LLC : Leucémie lymphoïde chronique	RT-PCR : Réaction de polymérisation en Chaîne précédée d'une transcription inverse (<i>Retro Transcription - Polymerase Chain Reaction</i>)
LNH : Lymphome non-Hodgkinien	SCF : Facteur des cellules souches (<i>Stem Cell Factor</i>)
LTB4 : Leucotriène B4	SDF1α : Facteur dérivé des cellules stromales (<i>Stromal cell Derived Factor 1α</i>)
MAPK : <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>	Sec : Seconde
MDGF : Facteur de croissance dérivé des macrophages (<i>Macrophage Derived Growth Factor</i>)	SH : domaine homologue à Src (<i>Src Homology domain</i>)
MEP : Progéniteur mégacaryocytiques / érythroïdes (<i>Megakaryocyte Erythroid Progenitor</i>)	siRNA : Petit ARN interférent (<i>Small Interfering RNA</i>)
Min : Minute	SP : Simple positif
M-MLV : <i>Moloney Murin Leukemia Virus</i>	SVF_d : Sérum de veau fœtal décomplémenté
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	TCR : Récepteur des cellules T (<i>T cell Receptor</i>)
NFκB : Nuclear Factor kappa B	TNF : <i>Tumor Necrosis Factor</i>
NK : <i>Natural Killer</i>	uORF : Courte phase ouverte de lecture située en amont de l'ORF (<i>upstream Open Reading Frame</i>)
ORF : Phase ouverte de lecture (<i>Open Reading Frame</i>)	UTR : Région non traduite (<i>UnTranslated Region</i>)
PBS : <i>Phosphate Buffer Saline</i>	
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	
PH : domaine homologue à la Pleckstrine (<i>Pleckstrin Homology domain</i>)	
PMA : Phorbol-12-Myristate-13-Acétate	
PMSF : Phénylméthanesulfonylfluoride	

1 Introduction

1.1 *La famille des Rho GTPases*

Les Rho GTPases constituent une famille de petites protéines associées au GTP comprenant 25 membres impliqués dans de nombreuses et importantes fonctions cellulaires. Ces protéines présentent une grande similarité de structure et de fonction avec les protéines Ras. Ces homologies ont permis d'inclure ces protéines dans la superfamille Ras.

1.1.1 *La superfamille Ras*

La superfamille Ras comprend plus de 150 membres chez les mammifères. Ces protéines ont été identifiées de la levure jusqu'à l'homme, ce qui souligne leur importante conservation. Elles ont été regroupées en 5 familles : Ras, Rab, Arf, Ran et Rho. Bien que présentant une structure et une activité enzymatique comparable, ces protéines présentent des rôles bien spécifiques dans la signalisation cellulaire : la famille Ras, comprenant 36 membres, module la prolifération par son action sur l'expression des gènes ; la famille Rho régule la morphologie en modifiant l'expression génique et l'organisation du cytosquelette ; les protéines Rab (au nombre de 61) et la famille Arf interviennent dans le trafic vésiculaire ; l'unique protéine Ran contrôle le transport nucléocytoplasmique durant les phases G1, S et G2 du cycle cellulaire et l'organisation des microtubules au cours de la phase M [19-22]. Le nombre et les fonctions de ces protéines nécessitent la compréhension de leurs rôles spécifiques dans les voies de signalisation, de leurs effecteurs directs et de leurs mécanismes de régulation. Les protéines de la superfamille Ras sont des GTPases qui font partie de la famille des protéines G monomériques et ont la particularité de fixer le GTP et d'hydrolyser ce dernier en GDP [8]. Ces protéines sont impliquées dans le contrôle des voies de signalisation responsables notamment de la division cellulaire, de l'apoptose, de l'adhérence à la matrice extracellulaire, des interactions cellule-cellule et de la migration [5, 19, 23, 24]. Le rôle de ces protéines est d'assembler des complexes signalétiques transitoires à la membrane cellulaire, capables d'activer les voies de signalisation impliquées dans ces processus biologiques.

Les gènes de la famille Ras ont été les premiers à être mis en évidence par leur découverte en 1981 dans les virus du sarcome de Harvey et Kirsten chez le Rat et leur

identification dans de nombreuses tumeurs humaines touchant des organes tels que la vessie ou les poumons [5, 25-28]. Les autres membres de cette superfamille ont été découverts par la recherche d'autres gènes de la famille Ras. Par exemple, RhoA, le premier membre de la famille Rho, a été isolé et identifié en 1985 chez l'aplysie ou lièvre de mer par l'équipe de recherche du Dr Richard Axel [29]. Environ 15% des tumeurs humaines présentent une mutation génétique dans un des gènes de la famille Ras conduisant à un état constitutivement actif de la protéine et à l'induction des voies de signalisation associées [28]. Il a ainsi été montré un rôle de ces protéines Ras dans la tumorigenèse suscitant un grand intérêt pour les thérapies ciblant les protéines Ras et leurs partenaires protéiques. Il a donc été nécessaire d'identifier les mécanismes de régulation de ces petites protéines G, leurs cascades de signalisation et leurs rôles dans les processus cellulaires.

1.1.1.1 Structure des petites protéines G

Ces petites protéines G ont une taille de 20 à 29 Kda, présentant des homologies de séquence et des motifs communs. Des études de cristallographie et de résonance magnétique nucléaire ont permis de décrire la structure tridimensionnelle des petites protéines G (par exemple : H-Ras en 1989 ; Rac1, protéine de la famille Rho, en 1997) et de mettre en évidence un domaine catalytique pour tous les membres de cette superfamille [30, 31]. Ces GTPases sont constituées d'un corps hydrophobe composé de 6 feuillets β et de 5 hélices α reliés entre eux par une série de 10 boucles [32]. Cinq de ces boucles sont situées sur une même face de la protéine et ont un rôle crucial dans l'affinité des interactions des protéines Ras, entre elles ou avec leurs effecteurs, et dans la régulation de l'hydrolyse du GTP (**Figure 1** page 9) [33-37].

1.1.1.1.1 Association des GTPases au GTP

La boucle P est positionnée entre le feuillet $\beta 1$ et l'hélice $\alpha 1$ et est constituée des acides aminés 10 à 17 (numérotation de la protéine H-Ras). Elle est responsable des interactions avec les groupements α - et β - phosphate du nucléotide GTP ou GDP par la séquence conservée GXXXXGKS/T (**Figure 1**, page suivante). Le domaine Switch I, comportant les acides aminés 30 à 37, comprend les résidus impliqués dans l'association au groupement γ -phosphate du GTP, dont une tyrosine très conservée (XTX). Les acides aminés Lys16, Tyr32, Thr35, Gly60 et Gln61 stabilisent l'interaction avec le γ -phosphate du GTP. Le

résidu Gln61, certainement le plus important, assure notamment la stabilisation de l'état de transition de l'hydrolyse du GTP en GDP et participe à l'attaque nucléophile nécessaire à cette réaction [38]. Deux boucles, entre le feuillet $\beta 5$ et l'hélice $\alpha 4$ et entre le feuillet $\beta 6$ et l'hélice $\alpha 5$, reconnaissent la guanine. La séquence consensus N/TK/QXD de la boucle ($\beta 5$ - $\alpha 4$) contient une Lys et un Asp qui interagissent directement avec la base [39].

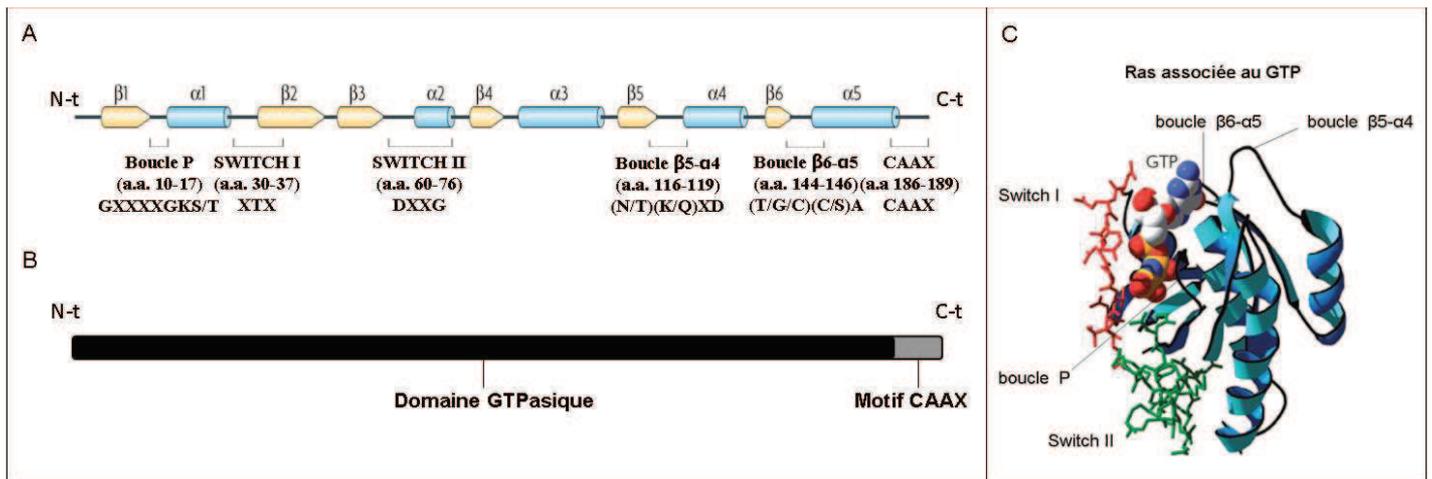


Figure 1 : Structure des protéines Ras. A. Structure secondaire de la protéine H-Ras isoforme 1 d'après Karnoub et Weinberg [5]. Les feuilletts β sont représentés par des flèches jaunes et les hélices α par des cylindres bleus. Les différentes régions et leurs résidus d'acides aminés les plus conservés correspondants sont nommés en dessous de la représentation en feuillet et hélice ; d'après Bourne et collaborateurs [8, 9]. GXXXXGKS/T : G glycine, K lysine, S sérine, T thréonine, X= Val, Gly, Ala... ; XTX : X= Pro, Iso, T thréonine ; DXXG : D acide aspartique, G glycine, X= Ala, Thr... ; (N/T)(K/Q)XD : N asparagine, T thréonine, K lysine, Q Glutamine, D acide aspartique, X= Cys, Iso, Leu... ; (T/G/C)(C/S)A : T thréonine, G glycine, C cystéine, S sérine, A alanine; CAAX : C cystéine, A acide aminé aliphatique, X= Met, Ser, Ala, Gln. B. Représentation schématique du domaine GTPasique et du motif CAAX des protéines Ras. C. Structure cristallographique de Ras dans sa forme activée, c'est-à-dire associée au GTP, d'après Karnoub et Weinberg [5]. Les domaines Switch I et II ont été représentés respectivement en rouge et en vert, en structure éclatée et les boucles P, $\beta 5$ - $\alpha 4$ et $\beta 6$ - $\alpha 5$ positionnées par des lignes. Les atomes du nucléotide GTP ont été symbolisés par des sphères.

1.1.1.1.2 Ancrage membranaire des petites protéines G

La région C terminale hypervariable des petites protéines G fait l'objet de remaniements posttraductionnels déterminant leur localisation et leurs propriétés biologiques. Le motif CAAX est hautement conservé dans toutes les petites GTPases (**Figure 1**, ci-dessus). Ce site comprend une cystéine sur laquelle est ajouté un groupement soit géranylgeranyl soit farnésyle, réaction catalysée par une prényltransférase (**Figure 2**, page suivante). Ces modifications permettent un ancrage de la protéine à la membrane du réticulum

endoplasmique, du golgi ou à la membrane plasmique [32, 40]. Deux seconds signaux présents en amont du motif CAAX sont également impliqués dans l'association des petites GTPases à la membrane et pour leur pleine fonction : une séquence riche en acides aminés basiques et un résidu cystéine, sur lequel peut être ajouté un groupement lipidique de type palmitoyle lors de la maturation de la protéine [41]. Cette palmitoylation est une modification qui a été décrite chez certaines protéines Ras et pour des protéines Rho comme ChP et Wrch1 [6, 42, 43]. D'autres modifications de la région C terminale ont également été décrites notamment pour les protéines Rab et Ras. Des endoprotéases spécifiques interagissent avec les petites protéines G et clivent la séquence AAX du motif Cys-AAX (CAAX) (**Figure 2**, ci-dessous). Ce clivage est suivi d'une carboxyméthylation, ajout d'un groupement méthyle sur la cystéine restante, par une méthyltransférase spécifique des protéines prénylées [6, 44]. Les protéines possédant un motif précis, tel CXC pour les Rab, peuvent également être carboxyméthylées.

Protéine	Extrémité C terminale	Transférase
H-Ras	L ₁₇₁ NPPDESGPGC(Pal)MSC(Pal)KC(Far,OMe) ⁺ VLS	FTase
N-Ras	L ₁₇₁ NSSDDGTQGC(Pal)MGLPC(Far,OMe) ⁺ VVM	FTase
K-Ras2A	I ₁₇₁ SKEEKTPGC(Pal)VKIKKC(Far,OMe) ⁺ IIM	FTase
K-Ras2B	S ₁₇₁ KDGKKKKKKSKTKC(Far,OMe) ⁺ VIM	FTase
Cdc42	E ₁₇₁ AILAALEPP ETQPKRKC(GerGer,OMe) ⁺ CIF	GGTase I
RhoB	K ₁₈₁ RYGSQNGCINCC(Far/GerGer,OMe) ⁺ KVL	FTase/ GGTase
Rab1A	I ₁₉₁ QSTPVKQSGGGC(GerGer)C(GerGer)	GGTase II
Rab6A	K ₁₉₁ LEKPQEQPVSEGGC(GerGer)SC(GerGer,OMe)	GGTase II
Rab23	K ₂₂₁ QRTKKNRNPFSSC(GerGer)SIP	GGTase II

Figure 2 : Modifications posttraductionnelles dans la région C terminale des petites GTPases (d'après Pechlivanis et Kuhlmann, [6]). Les extrémités C terminales de membres des familles Ras, Rho et Rab sont représentées dans ce tableau. Ces protéines font l'objet d'ajout de groupements lipidiques géranylegéranyle (GerGer), farnésyle (Far) catalysé par des géranylegéranyltransférase (GGTase I ou II), farnésyltransférase (FTase) ou d'un groupement palmitoyle (Pal). Elles peuvent également être clivées, symbolisé par le signe ✂ et carboxyméthylées sur une cystéine (OMe).

1.1.1.1.3 Interactions protéiques des petites protéines G

Le domaine Switch I des protéines R-Ras et Rap1A/1B, localisé entre les résidus 30 et 37, présente une complète homologie de séquence entre ces protéines. En plus de son interaction avec le γ -phosphate du GTP, ce domaine est impliqué dans l'interaction des petites protéines G avec leurs partenaires protéiques. Il en est de même pour le domaine Switch II, localisé entre les résidus 60 et 76, qui présente une forte homologie de séquence parmi les membres de la Superfamille Ras. Des études structurales des protéines Ras associées à leurs

régulateurs protéiques, les protéines GDI (*GTPase Dissociation Inhibitor*), les protéines GEF (*Guanine Exchange Factor*) et les protéines GAP (*Guanine Activating Protein*), décrites dans le paragraphe 1.1.2.3 page 18, ont permis de mettre en évidence et de façon précise les domaines et sites d'interaction. Les expériences menées pour la protéine H-Ras associée au domaine GAP de la protéine p120GAP, un de ces partenaires régulateurs, ont montré une interaction entre la région Switch I de Ras et le domaine GAP de p120GAP [45, 46]. Cette association fait intervenir un motif Phe-Leu-Arg (boucle en doigt d'arginine) qui en stabilisant les deux domaines Switch provoque une accélération de l'hydrolyse du GTP. Un mécanisme similaire a été décrit lors de l'activation de Ras par SOS, une protéine GEF [47]. L'interaction d'une hélice α de SOS entraîne une modification de la conformation de la petite protéine G à travers les domaines Switch I et II. Ces perturbations structurales induisent un relargage du GDP et son remplacement par le GTP. D'autres séquences influençant l'interaction avec des effecteurs ont été identifiées dans la région 92-106 et la région C terminale [48]. Cette dernière intervient notamment dans l'interaction directe et spécifique de Rac1 avec le domaine SH3 de β -PIX, une protéine GEF de la protéine Rac1 [48].

La fonction biologique des petites protéines G dépend fortement des modifications post-traductionnelles influençant leur localisation cellulaire et des interactions avec leurs partenaires protéiques.

1.1.1.2 Cycle d'activation-inactivation des GTPases

Les petites GTPases ont été décrites comme des protéines clés dans la régulation de nombreux processus cellulaires dans les cellules eucaryotes. Les voies de signalisation sont activées par des signaux extracellulaires et la stimulation des récepteurs présents à la membrane plasmique tels que les protéines G hétérotrimériques, les intégrines, des récepteurs de type tyrosine-kinase et des récepteurs associés aux tyrosine kinases ; ceci entraînant l'activation des petites GTPases [18, 49, 50] [51]. Ces dernières passent alors d'un état inactif associé au GDP à une conformation active associée au GTP, forme interagissant avec des kinases effectrices intracellulaires, menant à l'activation de nombreuses cascades de phosphorylation dans la cellule et induisant les réponses biologiques [52]. Ces protéines alternent donc entre les deux formes (liées au GTP ou au GDP) au cours d'un cycle d'activation et inactivation (GTP/GDP) (**Figure 3**, page suivante).

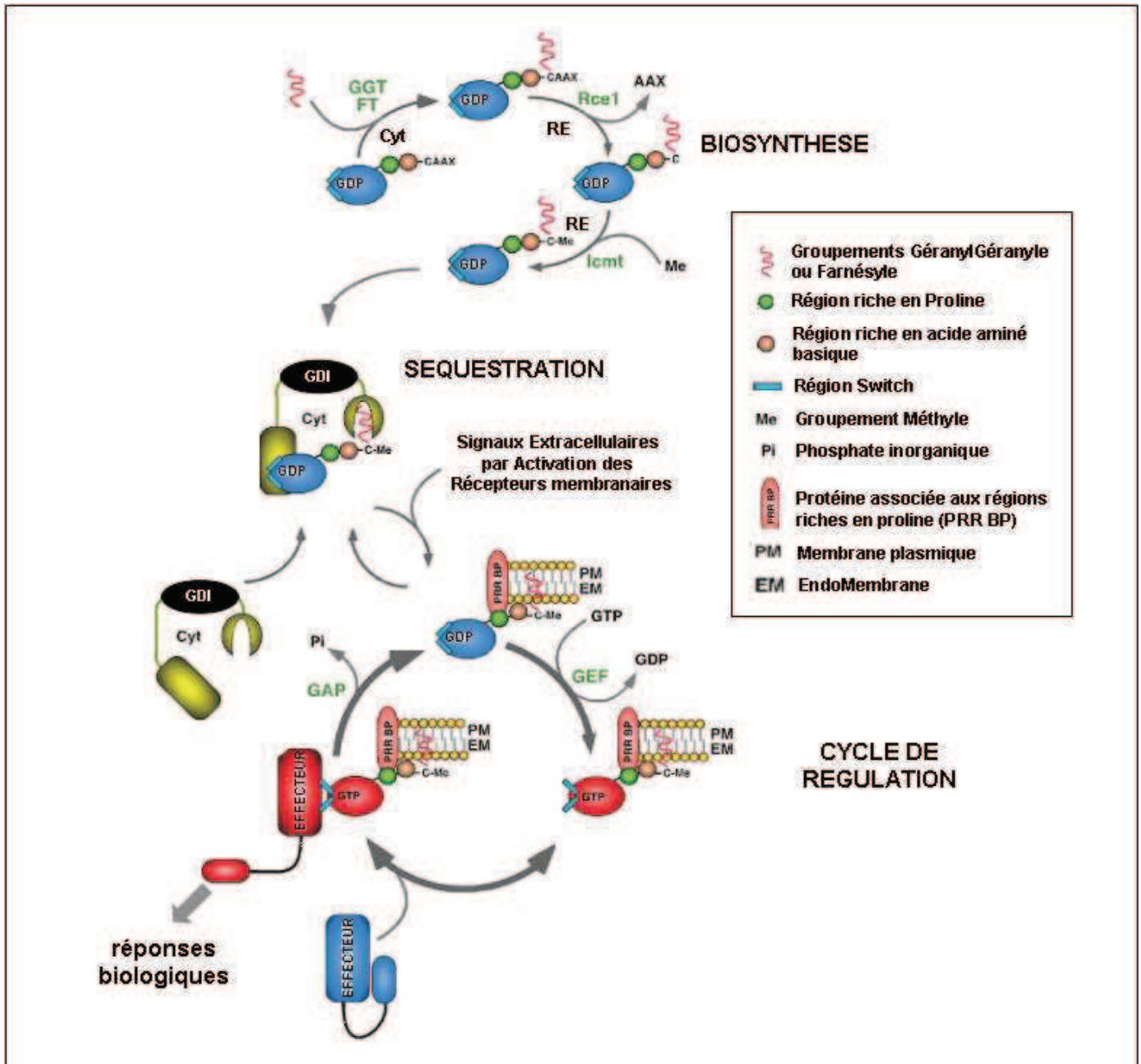


Figure 3 : Représentation schématique de la maturation protéique et du cycle de régulation des petites protéines G (d'après Bustelo et collaborateurs [15]). La GTPase, associée au GDP, subit des modifications posttraductionnelles lors de sa biosynthèse : dans le cytoplasme (Cyt) une prénylation catalysée par une géranylgeranyltransférase (GGT) ou une farnésyltransférase (FT) ; dans le réticulum endoplasmique (RE), un clivage du motif AAX catalysé par Rce1 (*Ras converting enzyme 1*) suivi d'une carboxyméthylation par une Icmt (Isoprénylcarboxyméthyltransférase). La GTPase, ainsi maturée, est ensuite associée à une protéine GDI, *GTPase Dissociation Inhibitor*, qui bloque le cycle de régulation. Suite à des stimuli extracellulaires, les voies de signalisation de récepteurs membranaires vont permettre la libération de la GTPase-GDP par GDI et permettre son ancrage membranaire par son groupement lipidique présent à son extrémité C terminale. La petite protéine G interagit alors avec une protéine GEF, *Guanine nucleotide Exchange Factor* qui favorise l'échange du GDP par le GTP. La GTPase alors associée au GTP est active. Cette localisation et cet état activé vont induire l'activation des effecteurs à proximité par la modification de leur conformation, et des cascades des voies de signalisation. La régulation de ce mécanisme est complexe et fait intervenir de plus une protéine GAP, *GTPase Activating Protein*, qui stimule l'activité GTPasique, menant à nouveau à l'état inactif, associé au GDP, de la petite protéine G.

Les protéines Ras opèrent comme des interrupteurs moléculaires contrôlant les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. La régulation de ces processus cellulaires s'effectue donc à travers ce cycle d'activation et d'inactivation, contrôlé par les activités antagonistes 1) des protéines GDI qui en s'associant aux GTPases à l'état inactif empêchent leur activation, 2) des protéines GEF qui catalysent l'échange du GDP par le GTP et activent les GTPases et 3) des protéines GAP qui augmentent l'activité GTPasique intrinsèque (donc l'hydrolyse du GTP en GDP) et induisent l'inactivation des GTPases. L'association des petites protéines G au GTP va entraîner une relocalisation des effecteurs à la membrane plasmique. L'interaction des deux partenaires induit alors une modification de la conformation de l'effecteur menant *i)* soit à son activation indépendamment ou non de signaux intracellulaires, comme il a été décrit pour les protéines Pak, Rock et Was, *ii)* soit à son inactivation, comme c'est le cas pour Cdc42Eps, un effecteur de Cdc42. L'effecteur protéique peut également être activé suite au détachement de ses partenaires protéiques inhibiteurs et son association à la petite protéine G, comme par exemple Cyfip2 [15, 53, 54]. Des études de cristallographie de la protéine H-Ras complexée à certains domaines de ses partenaires ont permis de mettre en évidence et de décrire les paramètres structuraux de la régulation des petites protéines G par les protéines GEFs et GAPs [5, 45, 47].

Dans la superfamille Ras, les protéines Rho, au nombre de 25, semblent très bien régulées : le génome humain contient plus de 60 RhoGEFs, plus de 70 RhoGAPs et 3 RhoGDIs [15]. Les effecteurs des Rho GTPases n'ont pas de domaines ou de séquences permettant de les reconnaître facilement, seules des études expérimentales ont permis de caractériser plus de 60 cibles pour les trois principaux membres de la famille Rho : Rho, Rac et Cdc42.

1.1.2 La famille Rho

La famille Rho est très importante au sein de la superfamille des petites GTPases. Les RhoGTPases ont été initialement décrites comme impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine mais il a aussi été prouvé qu'elles participent à bien d'autres voies de signalisation modulant la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'adhérence, la migration, la différenciation, l'expression génique et le trafic vésiculaire [55, 56]. A ce jour, il a été décrit 23 gènes Rho, qui génèrent au moins 25 protéines grâce à des mécanismes d'épissage

alternatif. Sur la base des homologies de séquences, des motifs structuraux et des fonctions biologiques, la famille Rho a été subdivisée en 6 sous-groupes contenant des protéines ayant des propriétés similaires : les Rhos similaires à RhoA [RhoA, RhoB, RhoC], les Racs similaires à Rac1 [Rac1, Rac1b, Rac2, Rac3 et RhoG], le groupe Cdc42 [Cdc42, G25K, TC10, TCL, Chp/Wrch-2, Wrch-1], les Rnd [Rnd1, Rnd2, RhoE/Rnd3], les RhoBTB [RhoBTB1, RhoBTB2, RhoBTB3], les Miro [Miro-1, Miro-2], et les protéines RhoD, Rif et RhoH/TTF qui n'ont pas pu être intégrées au sein de ces groupes (**Figure 4**, ci-dessous) [18]. Il est à noter que les protéines Miro-1, Miro-2 et RhoBTB3 ne possèdent pas de domaine d'insertion Rho et sont phylogénétiquement plus proches de la famille Rab que des protéines Rho. Ces caractéristiques remettent donc en cause leur appartenance à la famille Rho des petites protéines G [57].

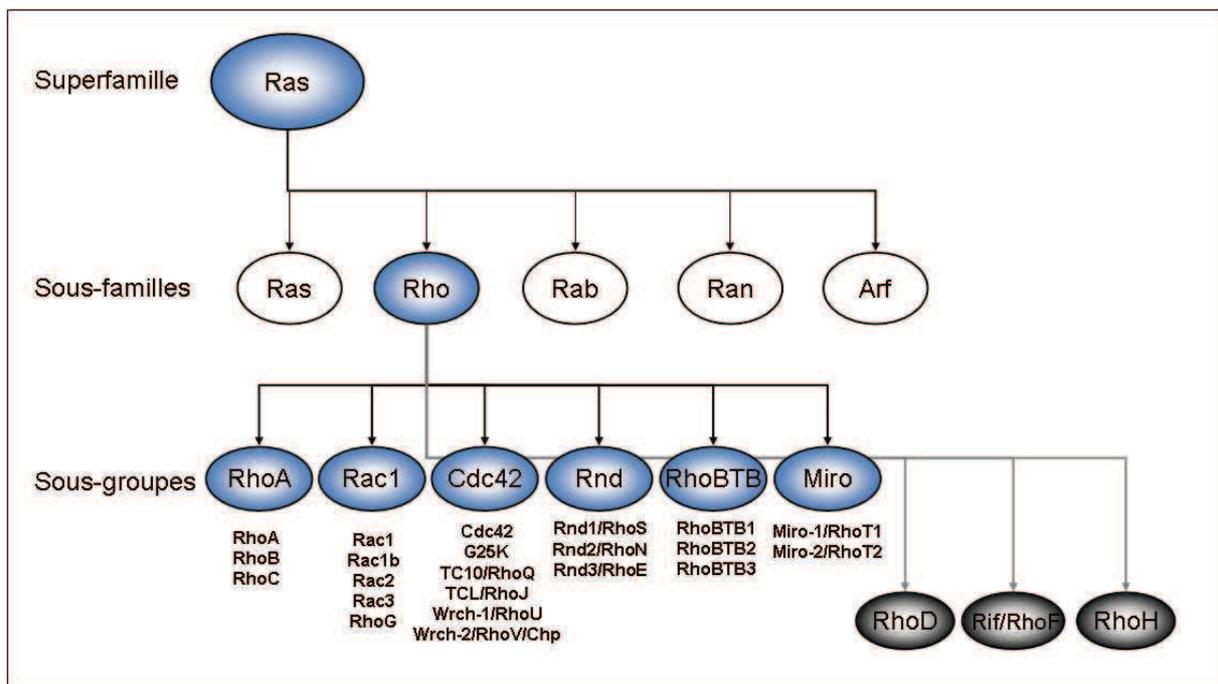


Figure 4 : Représentation des sous-groupes de la famille Rho et des membres les composants. La famille Rho est composée des sous-groupes RhoA, Rac1, Cdc42, Rnd, RhoBTB et Miro et des protéines RhoD, Rif et RhoH.

1.1.2.1 Spécificité structurale des membres de la famille Rho

Les membres de la famille Rho sont de petites protéines de 190 à 250 résidus d'acides aminés, qui consistent en un petit domaine GTPasique et des extensions N et C terminales (**Figure 5**, ci-dessous).

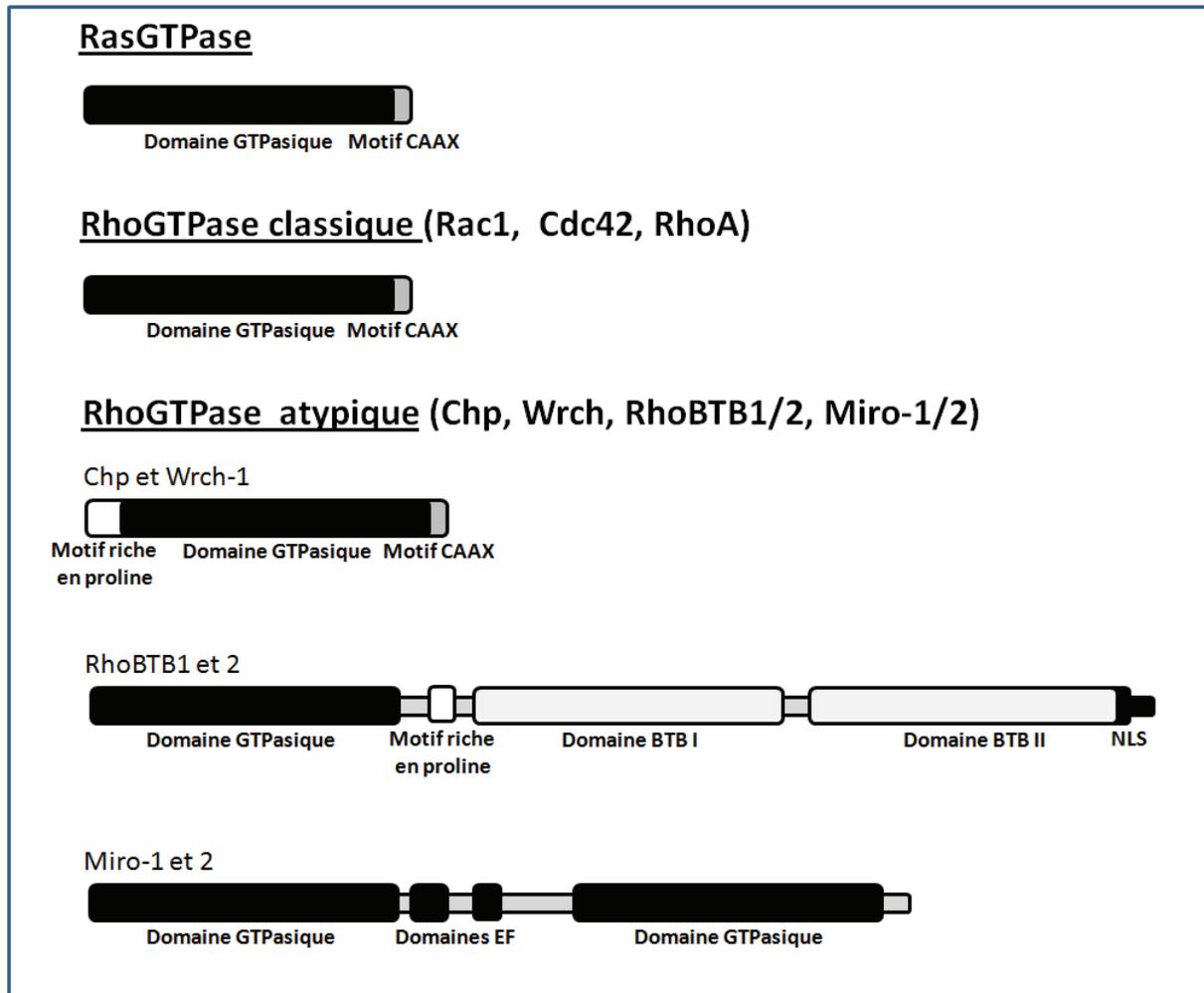


Figure 5 : Représentation schématique de la structure des protéines Rho (d'après Aspenström et collaborateurs [16]). Les protéines Rho classiques (Rac, Rho, Cdc42...) présentent une structure similaire aux protéines Ras. Elles sont constituées d'un domaine GTPasique (pour l'hydrolyse du GTP en GDP) et d'un motif CAAX en C terminal. Les autres RhoGTPases plus atypiques ont une structure plus complexe avec la présence d'autres domaines comme des motifs riches en proline, des domaines BTB (*Broad complex/Tramback/Bric à brac* ou encore appelé POZ) pour les interactions protéine-protéine, d'une séquence de localisation nucléaire (NLS) ou de domaines EF ou EF-hand (domaines de liaison au calcium).

Bien que certains membres atypiques de la famille contiennent des domaines supplémentaires et peuvent avoir une séquence plus longue, les domaines GTPasiques des protéines Rho présentent 30% d'identité avec ceux des protéines Ras et de 40 à 95% entre les GTPases Rho elles-mêmes. Les membres de la famille Rho contiennent les motifs caractéristiques pour l'association au GTP et au GDP, avec une très forte affinité pour ce dernier, et présentent un domaine en C terminal contenant une cystéine sur laquelle un groupement lipidique prényle peut être ajouté, soit géranylgeranyle, soit farnésyle (**Figure 2**, page 10). Ces protéines peuvent également être carboxyméthylées [6]. Une représentation schématique de la structure des différentes petites protéines Rho est représentée sur la **Figure 5**, page 15 d'après Aspenström et ses collaborateurs [16]. Les RhoGTPases sont également caractérisées par la présence d'un domaine GTPase en hélice, de type α Rho [7]. De plus, une structure spécifique des petites protéines Rho, appelée « insertion Rho », est localisée entre le feuillet $\beta 5$ et l'hélice $\alpha 4$ dans le domaine GTPasique (**Figure 1**, page 9) [37]. Cette insertion très particulière est impliquée dans les événements signalétiques spécifiques des protéines Rho.

1.1.2.2 L'insertion Rho, spécifique des RhoGTPases

L'insertion Rho est localisée entre le feuillet $\beta 5$ et l'hélice $\alpha 4$. Dans la majorité des protéines Rho, cette insertion est composée de 13 acides aminés qui s'organisent eux aussi en hélice (**Figure 6**, ci-dessous) [7, 37, 58]. Des études ont montré que l'insertion des protéines Rho ne modifie pas leur structure tridimensionnelle mais intervient dans certaines de leurs fonctions, particulièrement pour RhoA, Rac1, Rac2 et Cdc42.

H-Ras	122-	A-----R
Rac1	120-	RDDKDTIEKLKEKKL
Cdc42	120-	RDDPSTIEKLAKNKQ
RhoA	122-	RNDEHTRRELAKMKQ

Figure 6 : L'insertion Rho (d'après Karnoub et collaborateurs [1]). Alignement des séquences correspondantes à l'insertion Rho de RhoA, Rac1 et CDC42 avec la séquence de H-Ras.

Par l'utilisation d'une chimère Cdc42Hs/Ha-Ras, où la boucle comprenant l'insertion Rho de Cdc42Hs a été remplacée par celle de H-Ras qui n'en contient pas, Wu et ses collaborateurs ont montré que cette séquence spécifique de Cdc42Hs n'est pas essentielle pour l'interaction de cette dernière avec Dbl, une protéine GEF, ou Cdc42GAP, une protéine GAP de Cdc42. En revanche, elle est importante dans l'inhibition du cycle de régulation (GTP/GDP) de Cdc42Hs par une RhoGDI, et cela, sans modifier leur interaction, ni l'extraction de l'ancre lipidique de Cdc42 [59]. La délétion de cette insertion Rho dans Cdc42 ne modifie pas également l'interaction entre Cdc42Hs-GTP et un de ses effecteurs, PLD1, mais inhibe l'activité de cette dernière [60]. Walker et Brown ont mis en évidence l'importance de la Ser124 présente dans l'insertion Rho de Cdc42Hs dans ce mécanisme de régulation (**Figure 6**, page précédente) [61]. De même pour la protéine RhoA, l'absence de cette insertion n'affecte pas son interaction avec l'effecteur ROCK (une Rho kinase) mais diminue l'activation de cette dernière lors de l'apoptose dans des fibroblastes NIH-3T3 [62]. En ce qui concerne Rac1, son insertion Rho est importante pour la formation de lamellipodes lors de la migration cellulaire mais aussi pour les phénomènes anti-apoptotiques induits par cette protéine dans des fibroblastes NIH-3T3 et ne dépendant pas de l'activation de NFκB (*Nuclear Factor kappa B*) [1, 63]. Cette insertion est donc très importante pour l'activation de voies de signalisation et certains processus, tels que le remodelage du cytosquelette d'actine ou la survie cellulaire.

Un autre rôle de l'insertion Rho de Rac1 est de moduler l'immunité innée à travers l'activation de la NADPH oxydase. Cette insertion n'est pas essentielle pour l'interaction entre Rac1 et la sous-unité p67 de la NADPH oxydase mais est très importante pour l'activation de cette dernière dans les neutrophiles. De même, l'activation de la NADPH oxydase par Rac2 dans les phagocytes nécessite une interaction entre le cytochrome B et Rac2 dépendante de son insertion Rho [64]. Il est cependant intéressant de noter que bien que l'insertion Rho soit importante dans l'activation de la NADPH oxydase, elle n'est pas essentielle pour la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Les ROS interviennent notamment dans la transduction du signal des intégrines et dans les dommages oxydatifs observés lors de la réaction immunitaire innée [64]. Les études structurales et biochimiques ont ainsi montré que la région de l'insertion Rho se trouve à l'interface entre les petites protéines G et leurs effecteurs, sans modifier leurs interactions mais plutôt l'activation des effecteurs et des voies de signalisation associées.

1.1.2.3 Les protéines régulatrices de la famille Rho

Comme nous l'avons décrit précédemment, les RhoGTPases sont régulées par un cycle d'activation/inactivation impliquant des protéines GEFs, GAPs et GDIs (**Figure 3**, page 12).

1.1.2.3.1 Les RhoGDIs

Les protéines GDIs sont connues pour s'associer à de nombreuses protéines ayant subi une modification posttraductionnelle par addition d'un groupement isoprényle. Les GDIs sont capables d'extraire ces protéines de la membrane et d'en faire des protéines cytosoliques. Les petites protéines G sont dans les cellules le plus souvent sous cette forme cytosolique, c'est-à-dire associée aux GDIs. En isolant les petites protéines G de la membrane plasmique, les GDIs ont un rôle physiologique très important dans la régulation des voies de signalisation des petites GTPases [32]. Deux types de GDIs ont été décrits à ce jour : les RabGDIs et les RhoGDIs. Bien qu'elles ne présentent aucune similarité structurale, ces deux types de protéines ont la même fonction dans des sous-familles de petites protéines G différentes [65, 66].

Seulement trois protéines RhoGDIs ont été décrites à ce jour. RhoGDI α est exprimée dans tous les tissus et sa localisation est cytosolique. Elle présente une grande affinité pour RhoA, Cdc42 et Rac1 [7]. RhoGDI β est exprimée dans les cellules hématopoïétiques et dans d'autres compartiments épithéliaux. Elle se situe également dans le cytosol et se lie faiblement à RhoA, Rac1 et Cdc42 [7]. RhoGDI γ est exprimée principalement dans les poumons, le pancréas, les reins, le cerveau et les testicules [67, 68]. Elle est associée aux membranes des vésicules intracellulaires et se lie spécifiquement à RhoB et RhoG [67, 69]. Les Rho-GDI ont un motif caractéristique, *immunoglobulin like*, en feuillet β qui contient une poche hydrophobe permettant l'interaction avec le groupement isoprényle présent dans la région C terminale des protéines RhoGTPases [69]. L'interaction des GTPases avec les protéines RhoGDI entraîne l'inhibition de la dissociation du GDP par les RhoGTPases et empêche ainsi leur activation par les protéines GEF [70]. Cette association permet de contrôler également la localisation subcellulaire des RhoGTPases en masquant leur extrémité C terminale nécessaire à leur ancrage membranaire, les maintenant ainsi dans le cytosol et à distance des protéines GEFs et de leurs effecteurs [20]. Il a aussi été mis en évidence que les RhoGDI protègent les RhoGTPases de la dégradation protéolytique par les caspases [71].

La dissociation du complexe RhoGDI/GTPase est régulée par l'activation des intégrines qui stimulent le recrutement du groupement isoprényle des GTPases vers la bicouche lipidique membranaire [72]. Les phospholipides, les membres de la famille ERM (*Ezrin/Radixin/Meosin*, protéines interagissant avec les filaments d'actine de la membrane plasmique) et la tyrosine kinase cytoplasmique Etk/BMX favorisent la dissociation du complexe en interagissant avec les RhoGDI et en déstabilisant les complexes [73, 74]. Ceci entraîne la translocation des RhoGTPases à la membrane. L'affinité des RhoGDIs pour les RhoGTPases peut également être modulée par des modifications posttraductionnelles. D'une part, la phosphorylation des RhoGDI au site d'interaction entre ces dernières et la GTPase, par la PKC (Protéine Kinase C) ou par Pak1, déstabilise le complexe RhoGDI/RhoGTPase et permet ainsi l'activation de la GTPase [67, 75]. D'autre part, la phosphorylation des RhoGTPases régule également cette interaction. En effet, il a été montré que la modification post-traductionnelle de RhoA par la PKA (Protéine Kinase A), au niveau de l'acide aminé Ser188, favorisait son interaction avec les protéines RhoGDI [67, 76] [77].

1.1.2.3.2 Les RhoGEFs

En réponse à un stimulus extracellulaire, l'association de protéines GEFs aux GTPases accélère la dissociation du GDP et modifie la structure des petites protéines G favorisant ainsi leur association au GTP. Dans la formation du complexe entre la petite protéine G et la protéine GEF SOS, la boucle P, les domaines SWITCH I et II interviennent (**Figure 1**, page 9) [78, 79]. Le site d'interaction principal est localisé dans la région SWITCH II. La protéine G est alors capable de fixer une molécule de GTP puis de se dissocier de la protéine GEF.

Les GEFs sont des protéines à multidomaines comprenant un domaine catalytique et d'autres domaines responsables des interactions protéine-protéine et protéine-lipide. Les domaines protéiques s'associant aux GEFs sont SH2, SH3 (*Src Homology 2, 3*), SAM, (*Sterile Alpha Motif*), DH-PH (*Dbl Homology – Pleckstrin Homology*) [80, 81]. Parmi les GEFs déjà découvertes et décrites, nous retrouvons Dbl, Vav1, Vav2, Tiam1 et SOS [81]. Certaines GEFs sont spécifiques d'une GTPase, comme par exemple FGD1 de Cdc42 ou UNC-73B de Rac ; ou régulent plusieurs GTPases, par exemple Dbl et Ost agissent toutes deux sur Cdc42 et RhoA [82, 83]. Dans cette famille, plus de 70 protéines spécifiques des Rho ont été identifiées. Il existe deux familles de RhoGEFs : celles comportant un domaine

DH-PH (*Dbl Homology-Pleckstrin Homology*) et celles possédant un domaine CZH (*CDM and Zizimin Homology* ou *Dock 180 related proteins*) [50]. Les protéines CZH possèdent deux régions homologues catalysant l'échange des nucléotides des RhoGTPases. Les RhoGEFs DH-PH sont constituées d'un domaine DH responsable de l'activité catalytique et d'un domaine PH situé à leur extrémité C terminale et pouvant moduler l'activité d'échange ou interagir avec des protéines ou des phospholipides. Le domaine PH est également impliqué dans la régulation négative des GEFs par association de leur région PH avec soit leur extrémité N terminale, comme pour la protéine Dbl, soit leur domaine DH, comme c'est le cas de la protéine Vav (**Figure 7**, page suivante).

Cette inhibition peut être levée par plusieurs mécanismes. La phosphorylation de résidus de tyrosine des RhoGEFs entraîne une activation de la protéine, dépendant de sa région C terminale [84, 85]. Cette phosphorylation est effectuée par les tyrosines kinases de la famille Src, comme Lck, Fyn ou les tyrosines kinases Syk et ZAP70 [86-90]. L'interaction des RhoGEFs avec les sous-unités α ou $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques, ou avec des protéines elles-même phosphorylées sur des résidus de tyrosine induit l'activation des GEFs. Par exemple, par leur domaine SH2, les protéines Vavs s'associent aux tyrosines phosphorylées des récepteurs TCR ou BCR, de récepteurs de cytokines ou de protéines adaptatrices, ce qui permet leur recrutement à la membrane plasmique et favorise leur activation. La présence de phospholipides modifie également l'état conformationnel des protéines RhoGEFs. Le phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate lève l'inhibition et permet la phosphorylation et l'activation de RhoGEFs, comme Vav1. A l'inverse, certains lipides tel le phosphatidylinositol-(4,5)-diphosphate favorisent une interaction entre les domaines PH et DH et l'extrémité N terminale des protéines RhoGEFs, inhibant ainsi l'activation [50].

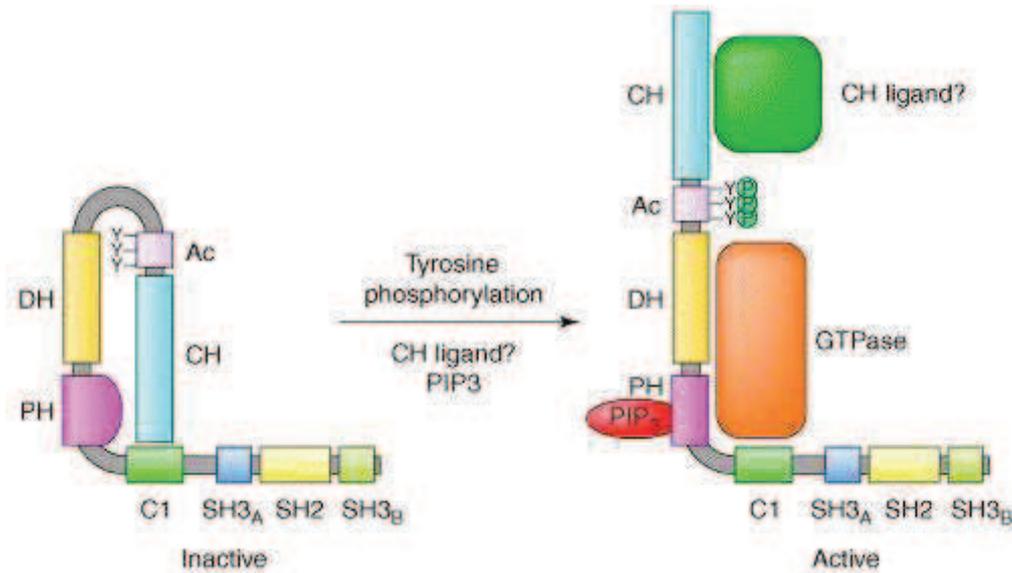


Figure 7 : Mécanisme d'activation des protéines GEFs à domaines DH-PH (d'après Tybulewicz et ses collaborateurs [14]). Les protéines GEFs, dans un état inactif, se présentent sous une forme refermée sur elle-même. Les domaines DH (*Dbl Homology*) et PH (*Pleckstrin Homology*) interagissent avec l'extrémité N-Terminale de la protéine, inhibant ainsi leur activité de facteur d'échange. En présence de certains phospholipides (phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate ou PIP3), de modifications posttraductionnelles (phosphorylation de tyrosines) ou par interaction des GEFs avec des protéines, la conformation des GEFs est modifiée et ces dernières sont activées. Elles s'associent alors aux Rho-GTPases par leur domaines DH, PH et C1. SH : domaine *Src Homology* ; CH : domaine *Calponin Homology*, séquence de 100 acides aminés impliqués dans la mobilisation du calcium régulation des GEFs; C1 ou domaine ZF (*Zinc Finger*) : motif riche en cystéines ; Ac : motif acide de 50 acides aminés contenant les tyrosines hautement conservées et sujet à la phosphorylation.

1.1.2.3.3 Les RhoGAPs

Au cours du cycle de régulation des petites protéines G, l'activité d'hydrolyse du GTP en GDP par ces dernières est augmentée en présence de protéines GAPs et par l'interaction de ces deux protéines. Des analyses de mutagenèse des domaines associés au GTP de la protéine Ras ont permis de montrer que les GAPs s'associent à celle-ci par les régions SWITCH I et II (**Figure 1** page 9) [45, 46]. Un mécanisme d'action a été proposé, basé sur les données structurales des petites protéines G complexées à leurs régulateurs. Un résidu Arg, situé dans une des boucles du domaine de la protéine GAP, aide à l'attaque nucléophile du GTP par la GTPase, renforçant l'action du résidu Gln61 dans l'action catalytique des petites protéines G (*paragraphe 1.1.1.1.3 page 10*) [45, 91]. L'orientation de ces résidus est stabilisée pour accélérer l'hydrolyse du GTP [92].

Les RhoGAPs sont au nombre de 80 chez l'homme, et présentent une région commune de 170 acides aminés nommée domaine GAP ou BH (*Breakpoint cluster region-Homology*) suffisante pour l'activité catalytique [93]. Elles possèdent d'autres domaines protéiques : PH,

SH2, SH3 et des régions riches en proline intervenant dans la régulation des protéines RhoGAP et leur localisation subcellulaire [94]. L'activité des GAPs est modulée soit négativement par des interactions avec d'autres protéines, soit positivement, par la phosphorylation. Cette phosphorylation modifie la conformation du site catalytique et ainsi l'activité des GAPs. Elle peut également affecter leur localisation, leur dégradation et leur interaction avec d'autres protéines ou phospholipides [94, 95].

1.1.2.3.4 Les RhoGTPases atypiques

Certaines RhoGTPases ne suivent pas le schéma classique de régulation avec échange nucléotidique. Ces RhoGTPases atypiques sont les protéines Rnd (1, 2 et 3), Wrch1, Chp/Wrch2, RhoH et RhoBTB (1 et 2). Ces protéines comportent, au niveau du site de liaison aux nucléotides, des séquences en acides aminés différentes des RhoGTPases classiques, ce qui, soit leur fait perdre leur activité GTPasique et entraîne leur liaison permanente au GTP (RhoH, Rnd, RhoBTB), soit augmente leur capacité d'échange nucléotidique (Wrch) [96, 97]. L'isoforme de Rac1, Rac1b, obtenue par épissage alternatif se caractérise par une activité d'échange élevée [98]. Ces protéines atypiques ne sont pas régulées par les GEFs et les GAPs mais plutôt par leur niveau d'expression, de phosphorylation, par leur compartimentation intracellulaire ou par leur vitesse de dégradation.

1.1.2.4 Localisation subcellulaire des petites protéines Rho

L'étude des fonctions biologiques des protéines Rho a surtout été réalisée par l'utilisation de mutants : un acide aminé précis a été remplacé par un autre. Cette mutation entraîne l'activation constitutive de ces petites protéines Rho. L'expression ectopique de ces mutants dans des cellules endothéliales de porc (*Porcine Aortic Endothelial*) transfectées stablement par le récepteur humain du facteur de croissance des plaquettes (le PDGFR β) a permis de déterminer leur localisation subcellulaire [16]. RhoA (par l'utilisation du mutant constitutivement actif RhoAL63), RhoC (RhoCV14), Rac1 (Rac1L61), Rac2 (Rac2L61), Rac3 (Rac3V12) et Cdc42 (Cdc42L61), sous leur forme activée, ont toutes été localisées à la membrane plasmique et pour les protéines Rac et Cdc42 également dans la zone périnucléaire, probablement au niveau de l'appareil de Golgi [16]. TC10 (TC10L75) et Chp/Wrch2 (ChpL89) sont concentrées au niveau des zones d'adhésion focale et RhoB (RhoBL63) dans les endosomes tardifs, résultats concordant avec ceux de Gampel et de ses

collaborateurs [99]. Les RhoBTB sont caractérisées par une activité GTPasique nulle et sont constitutivement associées au GTP, ce qui leur confère un état toujours actif (*paragraphe 1.1.2.3.4 page 22*). L'expression ectopique des protéines RhoBTB1 et RhoBTB2 a ainsi permis de les localiser dans des structures vésiculaires dans le cytoplasme. Les protéines Miro (Miro-1V13 et Miro-2V13) et RhoG (RhoGV12) ont été retrouvées au niveau des mitochondries [16].

Les modifications posttraductionnelles jouent un rôle très important dans la localisation de ces GTPases. Comme toutes les petites protéines G, les Rho présentent à leur extrémité C terminale un domaine CAAX, sujet à une prénylation. La nature du groupement prényle attaché à la cystéine du domaine CAAX peut modifier la localisation cellulaire des protéines Rho. Certaines peuvent être géranylgeranylées ou farnésylées. Par exemple, quand la protéine RhoB est géranylgeranylée, elle se localise dans les endomembranes. Lorsqu'elle est farnésylée, elle se trouve alors au niveau de la membrane plasmique. Une seconde modification, une palmitoylation, possible en amont du domaine CAAX, est également impliquée dans la localisation cellulaire. L'ajout d'un groupement palmitoyle positionne les protéines Rac1 dans les radeaux lipidiques, Rac2 dans les endosomes et RhoG dans les cavéoles. Dans le cas de Rac1, le domaine riche en proline près de la séquence CAAX contribue à la localisation de cette GTPase au sein des complexes d'adhésion focale, par des interactions avec des protéines comme β -PIX, une protéine GEF de Rac1 [48].

1.1.2.5 Rôle général des petites protéines G de la famille Rho

La majorité des informations sur les protéines de la famille Rho provient de travaux réalisés sur RhoA, Rac1/Rac2 et Cdc42 par l'utilisation de mutants constitutivement actifs (*décrits au paragraphe 1.1.2.4 page 22*) ou l'utilisation de dominants négatifs. Ces derniers ont été obtenus par mutation d'un acide aminé empêchant leur activation et inhibant leurs effets. Les mutants dominant négatifs utilisés sont par exemple Rac1T17N, Rac2D57N, Cdc42T17N, RhoAT19N et RhoGT17N [100].

Les premières études de fonctions cellulaires ont été réalisées en 1992 [55]. Des mutants constitutivement actifs des protéines Rho, Rac et Cdc42 introduits dans des

fibroblastes ont montré un rôle commun dans la réorganisation du cytosquelette d'actine mais avec des effets distincts sur la forme et le mouvement cellulaires [101]. RhoA induit la contraction actine-myosine, la formation de fibres de stress et de complexes d'adhésion focale régulant la forme, l'adhérence et la motilité cellulaires [55]. Rac1 induit la polymérisation de l'actine et la formation de lamellipodes, extensions cytoplasmiques constituées d'allongements d'actine fins et proéminents intervenant lors de la migration cellulaire [55]. Cdc42 induit la formation de filopodes, fines extensions cytoplasmiques digitiformes. Ces filopodes sont impliqués dans la reconnaissance de l'environnement extracellulaire [102, 103]. Ces différentes fonctions dans l'organisation du cytosquelette d'actine ont été confirmées dans plusieurs types cellulaires et retrouvées pour d'autres petites protéines Rho telles RhoB, RhoC, Rac2, Rac3, TC10, TCL, RhoG, Chp, Rnd1, Rnd2, Rnd3, RhoBTB1 et RhoBTB2 ; cependant, l'expression ectopique d'un mutant RhoH (RhoHL62) et de mutants constitutivement actifs de Miro-1 et Miro-2 n'a pas permis d'observer d'effet de ces protéines sur l'organisation de l'actine, et ce, dans des cellules de porc (PAE/PDGFR β) et de chien (MDCK, *Madin-Darby Canine Kidney*) [16, 104-106]. Rappelons que bien qu'agissant de manière similaire sur l'organisation de l'actine suite à leur surexpression dans les cellules, les protéines Rho ont des localisations cellulaires et des partenaires précis, paramètres importants pour leur spécificité de fonction [16, 53, 107]. D'autres études ont montré que ces petites GTPases contrôlent la polarité cellulaire et les voies de signalisation mises en jeu lors des transports vésiculaires [108-111]. Elles sont également impliquées dans la croissance cellulaire, les fonctions de survie et dans la régulation de l'expression de gènes, à travers l'activation de facteurs de transcription, de protéines kinases, ainsi que dans la régulation de l'immunité innée, par le contrôle de l'activité enzymatique de la NADPH oxydase dans les phagocytes et les neutrophiles [64, 70, 112, 113].

Les protéines Rho interviennent dans de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la survie, la prolifération, l'adhérence et la migration et dans des réactions enzymatiques. Ces processus cellulaires sont très importants pour le développement et la mise en place du système hématopoïétique, notamment pour la différenciation et l'activation des cellules lors des réactions immunitaires. Ceci suggère que les protéines Rho sont fortement impliquées dans l'hématopoïèse.

1.1.2.6 Rôle des RhoGTPases dans l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes qui initient la production et le remplacement continu et régulé des cellules du sang. Toutes les cellules sont produites à partir d'une même cellule : la cellule souche multipotente dite primitive. En présence de facteurs stimulants, cette cellule va s'engager dans la différenciation d'une lignée cellulaire. Elle devient alors un progéniteur. Après plusieurs divisions et une potentialisation de la différenciation, les progéniteurs deviennent spécifiques d'une seule lignée. Le maintien des cellules dans la moelle osseuse, leur engagement dans un lignage hématopoïétique et leur progression dans la différenciation sont régulés par des processus cellulaires tels que les réarrangements du cytosquelette, la migration et l'activité transcriptionnelle, fonctions régulées par les Rho GTPases.

1.1.2.6.1 Rôle des RhoGTPases dans les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques

Des expériences utilisant des mutants dominants négatifs ou constitutivement actifs des Rho GTPases ont permis d'observer leur implication dans de nombreuses lignées hématopoïétiques (**Figure 8**, ci-dessous) [100].

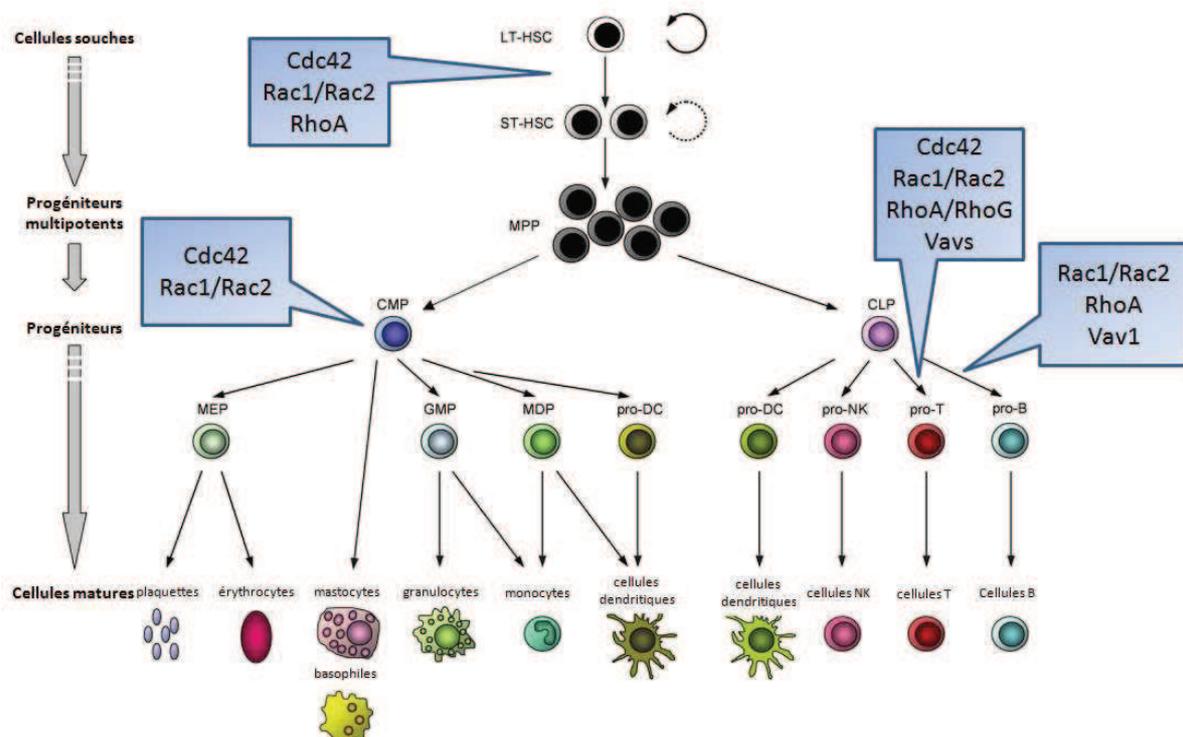


Figure 8 : Représentation du système hématopoïétique et implication des petites GTPases et RhoGEFs aux différents stades du développement [16]). Les cellules souches hématopoïétiques de long terme (LT-HSC) se développent en cellules souches hématopoïétiques de court terme (ST-HSC) puis en progéniteurs multipotents (MPP) qui génèrent des progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP). Les CMPs se différencient en granulocytes, monocytes, cellules dendritiques (DCs), mastocytes, érythrocytes et en plaquettes. Les CLPs se différencient en cellules B, T, natural killer (NK) et DCs. MEP : progéniteurs érythro-mégacaryocytaires ; GMP : progéniteurs granulo-monocytaires communs ; MDP : progéniteurs dendro-monocytaires.

Des expériences d'inactivation génique dans des souris ont permis de confirmer ces résultats et de montrer la contribution des protéines Rho dans l'hématopoïèse. Deux groupes de protéines ont été définis selon leur fonction : les protéines Rho impliquées dans le contrôle positif et la mise en place de l'hématopoïèse et celles, au contraire, qui répriment ces processus cellulaires. Il a été décrit que Rac1, Rac2 et Cdc42 régulent positivement le développement du système hématopoïétique. L'inactivation des homologues Rac1 et Rac2 a permis de montrer des fonctions bien distinctes de ces deux protéines dans les cellules souches et les progéniteurs murins. Rac1 est nécessaire à leur localisation et leur migration dans la moelle osseuse alors que Rac2 est impliquée plutôt dans le maintien de ces cellules dans ce même organe [114-116]. Ces protéines sont également impliquées dans la prolifération et la survie des cellules souches et des progéniteurs. Une inactivation de Rac1 induit un défaut dans les voies de signalisation du récepteur tyrosine kinase c-Kit, impliqué dans la régulation, la survie et la prolifération des cellules hématopoïétiques. L'inactivation de Rac2 conduit plutôt à un phénotype pro-apoptotique [115]. La GTPase Cdc42 régule le trafic et le maintien des cellules dans la moelle osseuse par le contrôle du cytosquelette d'actine, de l'adhérence et de la migration [117]. Une inactivation de Cdc42 conduit à une augmentation de l'activité du cycle cellulaire, à une perte de quiescence des cellules souches et à l'accumulation et la mobilisation des cellules progénitrices, par des modifications transcriptionnelles de l'intégrine $\beta 1$, de p21cip et du facteur de transcription cMyc [117]. Au contraire, RhoA, beaucoup moins étudiée que Rac1, Rac2 et Cdc42, réprime les fonctions de Rac1 et Rac2. L'inhibition de RhoA par l'utilisation d'un dominant négatif dans de la moelle osseuse de souris a permis d'y observer un meilleur maintien des cellules souches et des progéniteurs dans cet organe [118]. Ces données montrent donc que les Rho GTPases RhoA, Rac1/2 et Cdc42 ont un rôle important pour la régulation des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques mais avec des fonctions antagonistes.

1.1.2.6.2 Rôle des RhoGTPases dans la myélopoïèse

La production de cellules matures du sang requiert la différenciation des cellules souches en progéniteurs : le CMP (*Common Myeloid Progenitor*) à l'origine des lignages myéloïdes et le CLP (*Common Lymphoid Progenitor*) à l'origine des lignages lymphoïdes. Les progéniteurs myéloïdes (CMPs) permettent la production des granulocytes, macrophages, mégacaryocytes et des érythrocytes. Il a été montré que la Rho GTPase Cdc42 intervient dans ce processus biologique : des souris invalidées de façon conditionnelle pour le gène Cdc42

présentent un nombre diminué de progéniteurs primitifs conduisant à une augmentation de la population des progéniteurs polynucléaires/monocytyques (GMP) et une diminution des progéniteurs mégacaryocytiques/érythroïdes (MEP) et des progéniteurs myéloïdes communs (CMP). L'inactivation de Cdc42 chez les souris provoque une altération du système hématopoïétique : monocytose, neutropénie et éosinopénie. Cette absence de CDC42 entraîne également le développement d'un syndrome myeloprolifératif fatal avec une prolifération anormale des progéniteurs myéloïdes GMPs, des cellules immatures telles que les myélocytes et les métamyélocytes, et des cellules matures comme les monocytes et les neutrophiles dans la moelle osseuse et la rate, et avec une infiltration des cellules myéloïdes dans d'autres organes tels le foie et les poumons [119]. L'implication des protéines Rac dans la myélopoïèse a été observée *in vitro* dans des cellules souches et des progéniteurs isolés de souris dans lesquelles les gènes codant ces RhoGTPases ont été invalidés de façon conditionnelle. L'inactivation de Rac1 induit une diminution de la prolifération des progéniteurs myéloïdes en réponse au facteur des cellules souches (SCF), associée à un taux diminué de cycline D1 et de la phosphorylation de Erk1/2 (p42/p44) [115]. L'inactivation de Rac2 induit une augmentation de l'apoptose de ces progéniteurs suite à la stimulation par le SCF, caractérisée par une diminution de l'activation d'AKT [115]. Ces résultats nous démontrent que les protéines Rho ont des fonctions régulatrices importantes dans la différenciation myéloïde ; plus particulièrement Rac1, Rac2 et Cdc42 contrôlent positivement les processus cellulaires associés (**Figure 8**, page 25).

1.1.2.6.3 Rôle des RhoGTPases dans la lymphopoïèse

Le rôle des Rho GTPases dans les lymphocytes a tout d'abord été observé par la surexpression de dominants négatifs ou de mutants constitutivement actifs. Les Rho sont impliquées dans les voies de signalisation du TCR et du BCR, la migration, la réponse cytotoxique, la sécrétion de cytokines [18, 120-124].

1.1.2.6.3.1 Rôle des RhoGTPases dans les lymphocytes B

Le développement des lymphocytes B débute dans la moelle osseuse et suite à de nombreuses étapes de maturation, résulte en la présence de cellules B exprimant des immunoglobulines M (IgM), qui migrent vers la rate, où elles finiront leur maturation (stades T0 à T2) pour donner des cellules B folliculaires et des cellules B de la zone marginale. Les

cellules B folliculaires circulent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires, par la voie sanguine. Suite à l'engagement du récepteur des cellules B (BCR), les cellules sont activées, migrent dans les tissus lymphoïdes et en présence des lymphocytes T se différencient, soit en cellules plasmatiques qui sécrètent des anticorps, soit en cellules B mémoires (**Figure 9**, ci-dessous) [18].

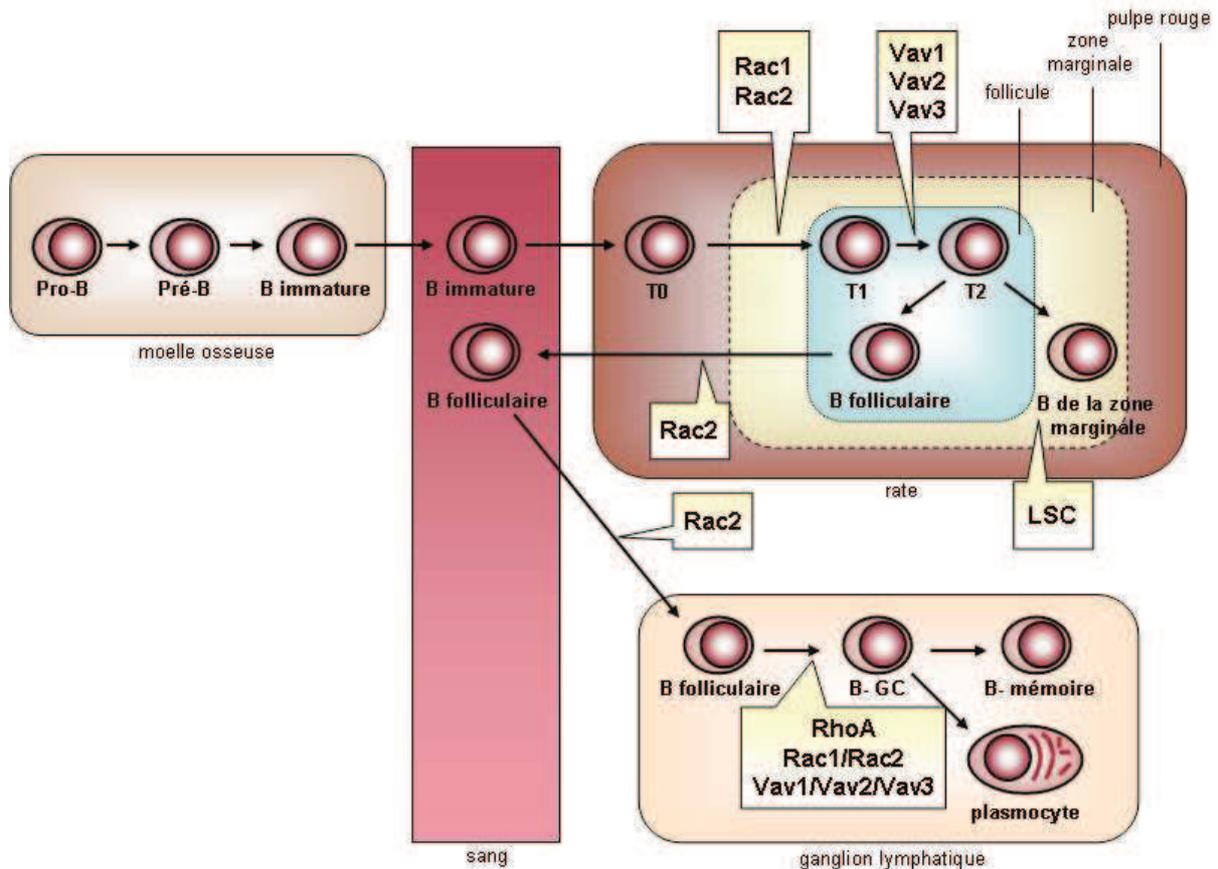


Figure 9 : Rôle des RhoGTPases et de leur régulateurs dans le développement et la fonction des lymphocytes B (d'après Tybulewicz et Henderson [18]). Les progéniteurs B de la moelle osseuse, appelés Pro-B, subissent un réarrangement des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines. Cet assemblage terminé, les cellules sont alors appelées Pré-B pour pre-B Cell Receptor (BCR), dans lesquelles des réarrangements des chaînes légères des immunoglobulines sont effectués. Ces cellules B, présentant le BCR, sont encore immatures et migrent alors par la voie du sang de la moelle osseuse vers la pulpe rouge de la rate, où elles seront maturées en cellules B à l'état transitionnel de type 0 (T0), puis T1 et T2, et finalement en lymphocytes B folliculaires ou de la zone marginale. Les cellules B folliculaires circulent alors par voie sanguine jusque dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, moelle osseuse, ganglion lymphatique). Leur migration dans le centre germinatif (GC, *Germinal Centre*) les active alors en cellules B-GC. En présence de lymphocytes T, elles se différencient soit en cellules B mémoires soit en cellules B sécrétrices d'anticorps (plasmocytes).

Le rôle des protéines Rac, Rac1 et Rac2, dans les cellules B a été observé grâce à des souris dans lesquelles les gènes codant les RhoGTPases ont été invalidés. Alors que l'invalidation de Rac1 seule n'altère pas la différenciation des lymphocytes B, la perte simultanée de Rac1 et Rac2 conduit à un blocage complet du développement de tous les lignages B avec un arrêt de la maturation des cellules B dans la rate [125, 126]. L'invalidation de Rac2 seule résulte en une perte des cellules B de la zone marginale sans affecter les cellules B folliculaires. L'invalidation de Rac2 dans les lymphocytes B affecte la formation de la synapse immunologique par un défaut d'adhérence, impliquant l'intégrine LFA1 et de la réponse des cellules B indépendantes des lymphocytes T [125, 127]. En l'absence de Rac2, la prolifération des cellules B induite par l'activation du BCR est réduite, phénomène associé à la diminution des flux calciques, de l'activation d'AKT et à l'augmentation d'expression de BCL-XL et de la cycline D2 [126]. Les protéines RhoG et RhoA sont également impliquées dans la différenciation des cellules B. RhoG en est un régulateur négatif ; en effet, son invalidation induit une augmentation modérée de la réponse immunitaire humorale, de la prolifération des cellules B et de l'activation du BCR [128]. Au contraire, RhoA est un régulateur positif : l'absence de RhoA conduit à une diminution de la production de InsP3 (Inositol-1.4.5-triphosphate) induite par l'activation du BCR, à une altération des flux calciques et de la prolifération des cellules B. Seule l'invalidation de RhoC n'induit pas d'altération dans le développement, l'activation et la migration des lymphocytes B [129, 130].

Le développement des cellules B est également perturbé en l'absence des protéines régulatrices des RhoGTPases, telles les GEFs Vav et Lsc [125]. Vav1 est une protéine régulatrice de Rac1, Rac2 et RhoG ; Vav2 et Vav3 modulent l'activation de RhoA, RhoB et RhoG et Lsc régule RhoA. En l'absence de Vav1, le nombre de cellules B T1 est fortement diminué mais peu d'effets sont observés sur le développement des cellules B folliculaires ou de la zone marginale, en dépit d'une signalisation BCR défectueuse ; de même en absence de Vav2 [131]. Une invalidation simultanée de l'expression de Vav1 et Vav2 permet d'observer un blocage du développement qui résulte en une diminution du nombre de cellules B folliculaires et de la zone marginale et en un défaut de la réponse humorale dépendante et indépendante des lymphocytes T [132-134]. Alors que l'invalidation des protéines Rac résulte en un blocage de la maturation au stade T0 avant la migration dans la pulpe blanche de la rate, l'absence des protéines Vav bloque le développement au stade T1 mais ne produit pas d'effets sur la migration vers la pulpe blanche ni sur la réponse aux chimiokines [130].

1.1.2.6.3.2 Rôle des RhoGTPases dans les lymphocytes T

Le développement des lymphocytes T commence dans le thymus, les cellules $CD4^-/CD8^-$ appelées « double négatifs » ou DN se différencient en double positifs (DP) puis en simple positif (SP) $CD4^+CD8^-$ et $CD4^-CD8^+$. Ces cellules naïves circulent ensuite vers les organes lymphoïdes secondaires. Le contact du récepteur des cellules T (TCR) avec un antigène induit l'activation des cellules T et conduit à leur différenciation en effecteurs et cellules T mémoires (**Figure 10** ci-dessous) [18].

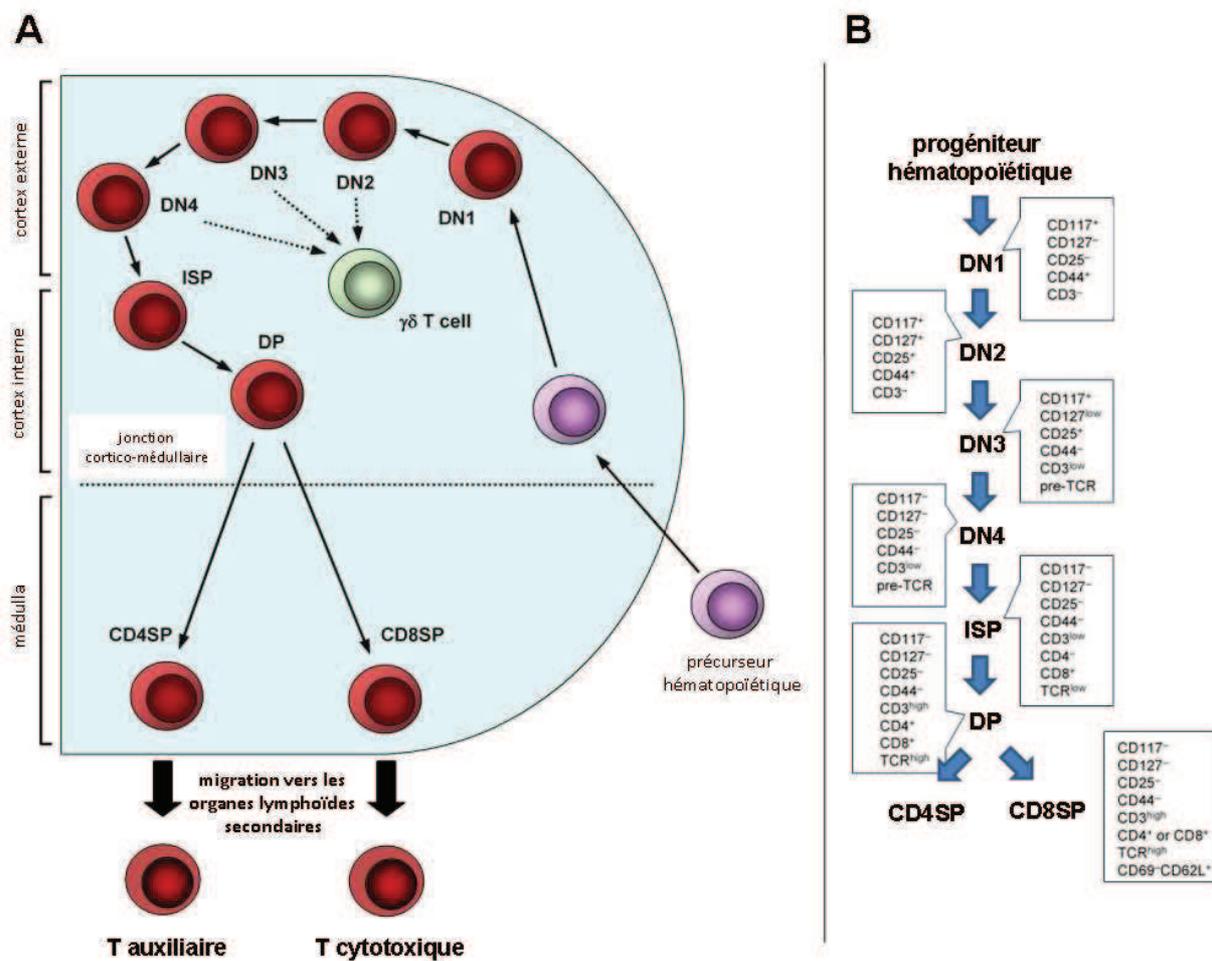


Figure 10 : Différenciation et migration des lymphocytes T dans le thymus et expression des marqueurs de surface [9]. A. Différenciation des lymphocytes T. Les lymphocytes T se différencient dans le thymus. Un progéniteur hématopoïétique migre dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire et subit plusieurs étapes de différenciation DN ou doublement négatifs pour CD4 et CD8 dans la zone externe du cortex. Les cellules migrent ensuite dans la zone interne du cortex du thymus et deviennent doublement positives pour CD4 et CD8. Par une interaction de leur TCR avec les cellules épithéliales du cortex, les thymocytes positifs soit pour CD4, soit pour CD8 (CD4SP ou CD8SP) sont alors sélectionnés. Ces cellules sont également appelées ISP ou *Immature Single Positive*. Les cellules positivement sélectionnées migrent dans la médulla où les cellules autoréactives sont éliminées par sélection négative. Les thymocytes CD4SP ou CD8SP migrent alors vers les ganglions lymphatiques et sont alors activés en cellules T auxiliaires ou T cytotoxiques en présence de cellules présentatrices d'antigène. B. Expression des marqueurs de surface. La différenciation des thymocytes est caractérisée par l'expression de marqueurs à la surface des cellules, tels que CD3, CD4, CD8, CD25, CD44, CD62L, CD69, CD117, CD127 et TCR.

L'invalidation de RhoC chez des souris n'entraîne pas d'altérations dans le développement, l'activation et la migration des cellules T comme il l'a été observé dans les lymphocytes B [129]. Rac1, Rac2 et RhoA sont cependant impliquées dans la différenciation des lymphocytes T. L'expression d'un mutant constitutivement actif de Rac1 résulte en une diminution du nombre des thymocytes DP présents dans le thymus [124, 135]. L'activation constitutive de RhoA, quant à elle, conduit à une sélection positive plus efficace des thymocytes CD8⁺/CD4⁻ [136]. L'expression de Rac2 constitutivement activée augmente l'apoptose des thymocytes SP ou DP et son invalidation induit un défaut de la différenciation T, à des stades beaucoup plus tardifs, en *T Helper 1* [137, 138]. Ces protéines Rho interviennent dans le développement des lymphocytes T également à travers l'activation du récepteur des cellules T ou TCR et des processus cellulaires associés. En effet, il a été décrit que RhoA est un régulateur positif de la signalisation du TCR des lymphocytes T et de l'adhérence des thymocytes et des lymphocytes T par l'intermédiaire des intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$ [136, 139]. De même l'étude de Rac2 a montré un rôle important de cette dernière dans la maturation des cellules T. Les lymphocytes T dans lesquels Rac2 a été invalidée, présentent un défaut partiel de l'activation induite par le TCR et de leur prolifération. Ces événements sont associés à une diminution des flux calciques et de l'activation de Erk1/2 et p38, à une production fortement diminuée d'interféron gamma ainsi qu'à une altération du chimiotactisme par les chimiokines CCL19 et CCL21, impliquées dans la migration des cellules T vers les ganglions lymphatiques [140, 141].

Les GEFs interviennent également dans le développement des lymphocytes T. Des souris déficientes pour Vav1 présentent un blocage du pré-TCR avec un défaut de la sélection positive et négative des thymocytes. Leurs cellules T prolifèrent moins bien et sécrètent moins d'interleukines 2 et 4 et d'interféron gamma en réponse à la stimulation du TCR, suggérant que Vav1 est impliquée aussi bien dans la différenciation des *T Helper 1* et des *T Helper 2* [142, 143]. Les thymocytes déficients pour Vav1 présentent aussi une déficience dans les voies de signalisation induites par le TCR : diminution des flux calciques et de l'activation des voies de signalisation de Erk1/2 et PI3K [135, 144-148]. Vav1 est également requis pour la transduction des signaux conduisant à l'activation de LFA1 et la formation de la synapse immunologique. Son invalidation induit une diminution de la polymérisation de l'actine, avec pour conséquence l'absence de formation de la synapse immunologique [149, 150]. Il a également été décrit que les protéines régulatrices des RhoGTPases (GEFs : α PIX, DOCK2 et

IBP, et les RhoGDI α et β) sont également importants dans la transduction du signal durant l'activation et le développement lymphocytaire T [18].

Toutes ces données montrent bien que les Rho GTPases sont des protéines ayant un rôle très important dans le développement hématopoïétique du fait de leurs différentes fonctions dans le cycle cellulaire, l'adhésion, la migration et la transcription génique. Récemment, il a également été montré que RhoH, un membre atypique de la famille Rho, joue un rôle dans l'hématopoïèse et plus particulièrement dans le développement et l'activation des lymphocytes T.

1.1.2.7 Tableau récapitulatif des fonctions des protéines Rho dans l'hématopoïèse

(Tableau 1, page suivante)

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des fonctions des protéines Rho dans l'hématopoïèse

RhoGTPase	Invalidation (Knock-Down, Dominant Négatif...)	Expression (mutant constitutivement actif...)
Rac1	<ul style="list-style-type: none"> ↓ régulation, survie, prolifération de HSC/Ps (cKit) ↓ localisation des HSC/Ps dans la moelle osseuse in vivo ↓ migration des HSCs dans la moelle osseuse ↓ migration des HPs (+SCF) <p>pas d'altération du développement des LB</p>	<ul style="list-style-type: none"> ↓ nombre de thymocytes DP dans le thymus
Rac2	<ul style="list-style-type: none"> ↓ maintien des HSC/Ps dans la moelle osseuse ↓ prolifération des HSC/Ps ↑ proapoptose des HSC/Ps <p>↑ apoptose dans progéniteurs myéloïdes (+SCF)</p> <ul style="list-style-type: none"> ↓ nombre de LB dans la zone marginale de la rate présence de LB folliculaires dans la rate ↓ formation de synapse immunologique des LB (intégrines β) ↓ réponse immunologique lymphoïde B indépendante des LT <p>Arrêt de la différenciation lymphoïde T (<i>T Helper 1</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> ↓ partielle de l'activation du TCR dans LT ↓ prolifération lymphoïde T ↓ flux calciques dans LT ↓ activation Erk1/2 et p38 dans LT ↓ production INFγ dans LT ↓ production de CCL19 et CCL21 dans LT ↑ apoptose des thymocytes SP ou DP 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ apoptose des thymocytes SP ou DP
Rac1, Rac2	<ul style="list-style-type: none"> Arrêt du développement des LB dans la rate 	
Cdc42	<ul style="list-style-type: none"> ↓ trafic, maintien, adhésion et migration HSC/Ps dans la moelle osseuse ↑ activité du cycle cellulaire dans HSC/Ps ↓ quiescence des HSCs ↑ nombre et mobilisation des HPs <p><i>in vivo</i> : monocytose, neutrophilie, éosinophilie, développement d'un syndrome myéloprolifératif fatal</p> <ul style="list-style-type: none"> ↑ GMP, myélocytes, métamyélocytes, monocytes, neutrophiles dans la moelle osseuse et la rate infiltration des cellules myéloïdes dans le foie et les poumons 	
RhoA	<ul style="list-style-type: none"> ↑ maintien des HSC/Ps dans la moelle osseuse <ul style="list-style-type: none"> ↓ production de InsP3 suite à l'activation du BCR dans LB ↓ flux calciques dans LB ↓ prolifération des LB 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ sélection des thymocytes CD8⁺/CD4⁻ ↑ signalisation du TCR dans LT ↑ adhérence des thymocytes et LT
RhoG	<ul style="list-style-type: none"> ↑ modérée de la réponse immunitaire humorale ↑ prolifération des LB ↑ activation du BCR dans LB 	
RhoC	<ul style="list-style-type: none"> pas d'altération du développement, ni activation, ni migration des LB <p>pas d'altération du développement, ni activation, ni migration des LT</p>	

1.2 *RhoH, un membre atypique de la famille Rho*

RhoH est un membre de la famille des RhoGTPases spécifiquement exprimé dans les leucocytes. Cette protéine ne possède pas d'activité GTPasique, ce qui la place parmi les protéines Rho atypiques. Elle présente de plus les caractéristiques suivantes : elle est codée par un gène ayant une structure très complexe, lui conférant un profil d'expression transcriptionnelle particulier. L'originalité du gène *RHOH* sera détaillée ci-après dans cette introduction. Nous présenterons ensuite les particularités de la protéine au sein de cette famille des Rho GTPases.

1.2.1 *Le gène RHOH*

1.2.1.1 *Découverte du gène RHOH*

Le gène *RHOH*, initialement appelé *TTF* pour *Translocation Three Four*, puis *RHOH/ARHH* pour *Ras Homolog gene family member H/Analog of Ras Homologous member H*, a été cloné puis identifié au laboratoire suite à son réarrangement avec le gène *LAZ3/BCL6* dans une translocation chromosomique impliquant les chromosomes 3 et 4. Dans cette translocation (3;4)(q27;p13), observée de manière récurrente chez des patients atteints de lymphome B non-Hodgkinien (B-LNH) de type folliculaire, la partie télomérique du chromosome 3 (3q27) est échangée avec celle du chromosome 4 (4p13), aboutissant à la formation de deux nouveaux chromosomes 3 et 4, dérivés de la translocation : der. 3 et der. 4 [151, 152]. Le gène *BCL6*, situé en 3q27, code un facteur de transcription à doigts de zinc impliqué dans la différenciation des lymphocytes B et le contrôle de la réponse immune par les cellules T [153-156]. Des études de la région 5' génomique du gène *BCL6*, impliqué dans la translocation (3;4) (q27;p13) et dans une monosomie du chromosome 3 avec des microdélétions du gène *BCL6* chez des patients atteints de LNH, ont montré la présence de deux sites de fixation de facteurs de transcription en aval de l'exon 1a du gène *BCL6* et dont le rôle dans la physiopathologie a été fortement suspecté [157, 158]. Pour le gène *RHOH* situé en 4p13, deux sites de point de cassure de la translocation t(3;4) ont été localisés distants de 1 000 bases l'un de l'autre, l'un majoritaire situé à environ 800 nucléotides en aval du 4^{ème} exon non codant [152, 159]. La cassure chromosomique a pour conséquence la perte de la région 5' non codante contenant les 4 premiers exons ainsi que des régions promotrices du gène *RHOH* [152]. Par échange des régions régulatrices des gènes *RHOH* et *BCL6*, la

t(3;4)(q27;p13) pourrait induire une modification du profil d'expression de ces deux gènes, ce qui serait un facteur favorisant la tumorigénèse et/ou modulant la réponse aux agents thérapeutiques [152, 160].

Il est important de noter qu'aucun autre membre de la famille Rho n'a été associé à une translocation chromosomique. Cependant, les gènes *LARG* (*Leukemia Associated Rho GEF*), une protéine RhoGEF, *ARHGAP20* et *GRAF* (*GTPase Regulator Associated with the Focal adhesion kinase pp125*), deux membres des RhoGAPs, ont été décrits comme étant impliqués dans ce type d'anomalies, respectivement, chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigue de type myélomonocytaire (FAB-M4), de leucémie lymphoïde chronique et de leucémie myélo-monocytaire juvénile [161-163].

1.2.1.2 Structure du gène *RHOH*

En déterminant la structure des ARN messagers du gène *RHOH* par des techniques de *RACE*-PCR, RT-PCR et de séquençage, notre équipe au laboratoire a mis en évidence une importante hétérogénéité des extrémités 5' des transcrits *RHOH*, due à la présence de plusieurs sites d'initiation de la transcription et de sites d'épissage alternatif. Ces résultats ont permis en 2004 de préciser l'enchaînement des introns et des exons et de décrire la structure complète du gène *RHOH* [2].

Le locus du gène *RHOH* est situé en 4p13 et présente une orientation 5'-3' du télomère vers le centromère. Il s'étend sur une séquence nucléotidique de 55 000 bases (55 Kb), la partie 5' seule sur environ 50 Kb, et comporte un intron de 37.9 Kb entre les exons 4 et 5 (**Figure 11**, page 36) [2]. Le gène *RHOH* est constitué de 7 exons : les exons non codants 1 à 6 situés dans la région 5' génomique et l'exon 7, unique exon codant la protéine RhoH. Les jonctions exon/intron ont été déterminées respectant pour la plupart la séquence consensus 5'gu et 3'ag au niveau des extrémités d'un intron situé entre deux exons (**Figure 12**, page 36) [2]. Il est également important de noter la présence de deux sites d'épissage alternatif dans l'exon 4 (ag/cc ; ag/tt) situés aux nucléotides 51 et 71 en regard de l'extrémité 5' de l'exon (**Figure 13**, page 37) [2].

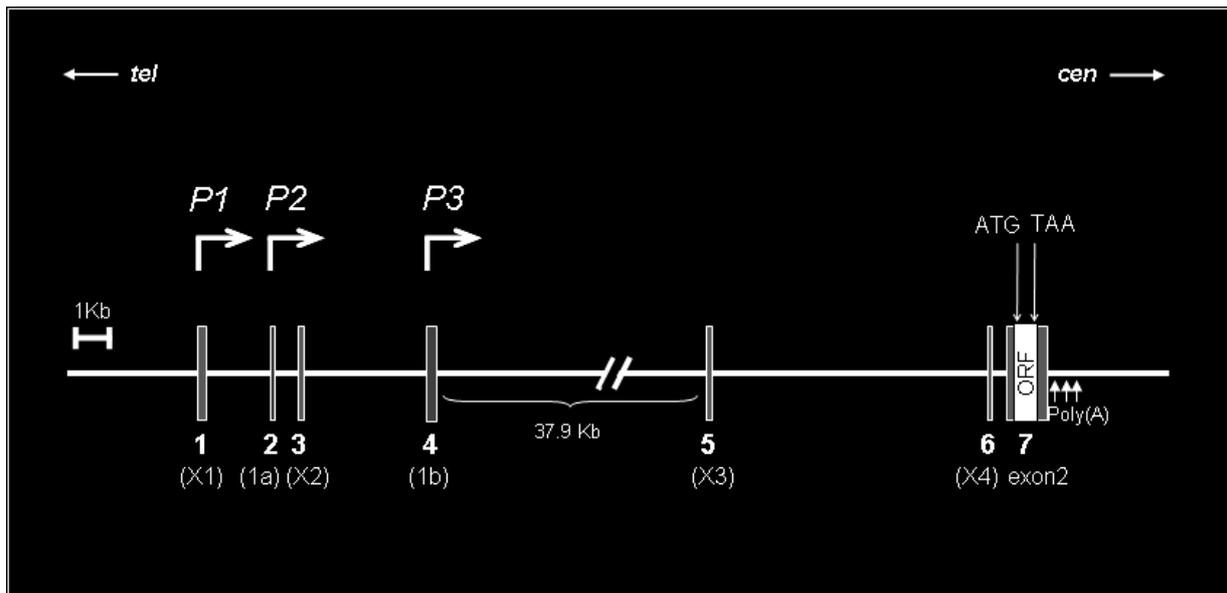


Figure 11 : Structure du gène *RHOH* (d'après Lahousse et collaborateurs [2]). Le gène *RhoH* s'oriente du télomère (tel) vers le centromère (cen). Il contient 6 exons non codants tout d'abord appelés exons X1, 1a, X2, 1b, X3 et X4 et précédant le seul exon codant pour la protéine RhoH, l'exon 2. Ces exons ont ensuite été renommés respectivement exons 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 [11]. Le gène *RHOH* s'étend sur 55 Kb et comporte un intron de 37.9 Kb entre les exons 4 et 5. 3 sites d'initiation de la transcription ont été décrits en amont de l'exon 1, 2 et 4 et représentés ici par des flèches ; les promoteurs putatifs P1, P2 et P3 correspondent à ces sites d'initiation de la transcription. De plus, des sites de polyadénylation ou poly(A) ont également été observés en aval de l'exon 7 [2].

Exon	3' Intron/	EXON	5' Intron	Taille de	
				exon (bp)	intron (kbp)
1	** <u>C</u> ATCACTGTGCATGTC.....GTGAATA <u>A</u> AG/gtgggtaa			~210	~1.65
2	** <u>T</u> AAAGGGCAGCTGT <u>G</u> A.....GGCCATTT <u>G</u> /gtgagtgtct			140	0.520
3	ctgagattaa* <u>A</u> CTGTGTG.....CGCAGCC <u>A</u> AG/gtatgacaa			~160	4.20
4	gattgct <u>C</u> CTGCTGCCCC.....CTGCAAC <u>A</u> AG/gtaaggatt			253	37.88
5	gaag/ <u>T</u> TTTATCTATACATAC <u>A</u> AG/ <u>G</u> AAA.....GAGGCCA <u>A</u> AG/gtgggtgg			182	7.34
6	tgttctgca <u>g</u> / <u>T</u> TTCCAAC.ACACACC <u>A</u> AG/gttgctactg			120	0.343
7	tttctgtccag/ <u>T</u> TGAAGAC.ATGCTTGTA			1060	

Figure 12 : Séquences nucléotidiques encadrant les jonctions exon/intron du gène *RHOH* (d'après Lahousse et collaborateurs [2]). La taille des exons et des introns est respectivement donnée en paires de bases (pb) et en milliers de paires de bases (Kpb). Les séquences exoniques sont en majuscules et les séquences introniques en minuscules. Les nucléotides de chaque jonction exon/intron sont indiqués en gras et soulignés. Les flèches noires localisées aux extrémités 5' des exons 1, 2 et 4 correspondent aux sites potentiels d'initiation de la transcription. * présente à l'extrémité 5' de l'exon 3 indique que l'extrémité de l'intron correspondant n'a pas pu être identifiée précisément. ** signifie que les extrémités 3' des introns situés en amont des exons 1 et 2 n'ont pas été déterminées dû à la position *leader* de ces exons au sein des transcrits RHOH.

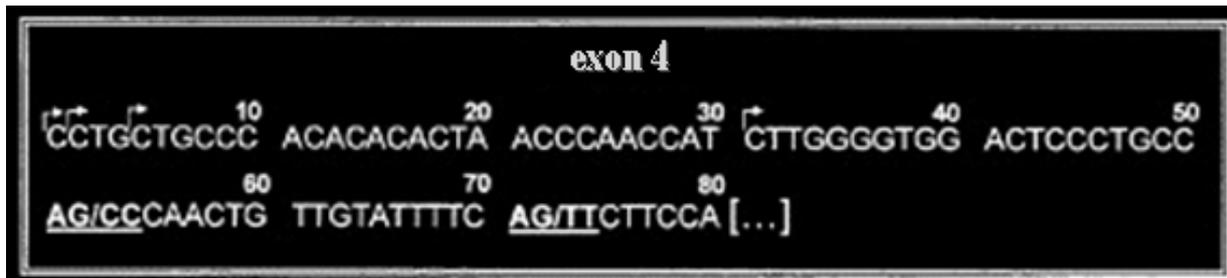


Figure 13 : Sites d'épissage alternatif internes de l'exon 4 du gène *RHOH* (d'après Lahousse et collaborateurs [2]). Les deux sites sont signalés par une écriture en gras et soulignée. Ils ont été localisés aux nucléotides 51-54 et 71-74 par rapport au début de l'exon 4. Les flèches correspondent aux sites d'initiation de la transcription observés pour cet exon.

L'étude de la région 5' a permis de décrire plusieurs sites d'initiation de la transcription situés en amont des exons 1, 2 et 4. Des promoteurs putatifs pour ces régions ont été nommés P1, P2 et P3 correspondant respectivement aux régions en amont de ces exons 1, 2 et 4 [11]. Plus précisément, la technique d'extension d'amorce réalisée sur cette région 5' a permis de mettre en évidence deux sites potentiels pour l'initiation de la transcription à partir de l'exon 2, en position (+1) et (+14) en regard de son extrémité 5' et pour l'exon 4, une région majeure encadrant la position (+1) et un site mineur présent à la position (+31) en regard de l'extrémité 5' (**Figure 12**, page 36 et **Figure 13**, page 37). Plusieurs sites ATG ont été observés : un situé à 210 nucléotides de l'extrémité 5' de l'exon 7 et responsable de l'initiation traductionnelle de la protéine RhoH et quatre autres, en amont, gouvernant quatre courtes phases ouvertes de lecture (uORF, *upstream Open Reading Frame*) situées dans les exons 1, 2, 4 et 6 de la région 5' non traduite du gène *RHOH*. La présence de ces uORFs renforce la complexité du gène et renvoie au rôle des régions non traduites dans la régulation de la traduction de la protéine RhoH (*paragraphe 1.2.1.4 page 39*). L'analyse de la région 3' génomique a révélé trois sites de polyadénylation de séquences consensus imparfaites CATAAA, TATAAA, GATAAA situées respectivement à 409, 601 et 675 bp du codon stop de l'exon 7 et des sites de fixation des queues polyA situées respectivement à 25, 15 et 21 nucléotides en aval de ces séquences. La région 3' présente de nombreux motifs riches en séquences AU, qui pourraient être impliqués dans la stabilité des transcrits [2].

1.2.1.3 Structure des transcrits *RHOH*

Parallèlement à l'organisation génomique, Sylvie Zouitina-Galiègue et son équipe ont étudié la présence et la position des différents exons du gène *RHOH* au sein de ses transcrits [2]. Des expériences d'amplification génique et de séquençage de la région 5' des transcrits ont mis en évidence la grande hétérogénéité de ces séquences. En effet, bien que l'exon 7 (exon codant la protéine RhoH) et l'exon 6 soient toujours présents, de grandes différences ont été observées dans la taille et la composition de la région 5' des transcrits *RHOH*. L'équipe a ainsi identifié dix transcrits dont la structure et le niveau d'expression varie d'un type cellulaire hématopoïétique à un autre : en effet, ces dix transcrits sont exprimés dans les lignées lymphoïdes B, 6 dans les T alors que seules 2 isoformes sont retrouvées dans les lignées myéloïdes (**Figure 14**, page 39) [2].

Leurs résultats indiquent que les exons 2, 4, 6 et 7 sont majoritairement présents dans les transcrits des cellules hématopoïétiques étudiées, contrairement aux exons 1, 3 et 5. Ces derniers sont plutôt associés aux formes mineures des transcrits *RHOH*. Dans les transcrits où l'exon 4 est inséré entre deux autres exons, celui-ci présente deux tailles différentes (180 et 200 bp), inférieures à celle observée lorsqu'il est l'exon *leader* dans la transcription (253 bp). Ceci suggère que les 73 premiers nucléotides de l'exon 4 sont importants pour la transcription du gène *RHOH*. En clonant les différentes formes de transcrits *RHOH* dans la lignée lymphoïde B Raji, Sylvie Zouitina-Galiègue et ses collaborateurs ont mis en évidence un profil d'expression pour les différents ARN messagers. Les trois transcrits majeurs retrouvés dans les cellules B sont les isoformes constituées des exons « 4-6-7 » ; « 2-4-6-7 » ; « 2-6-7 » (**Figure 14**, page 39) [2].

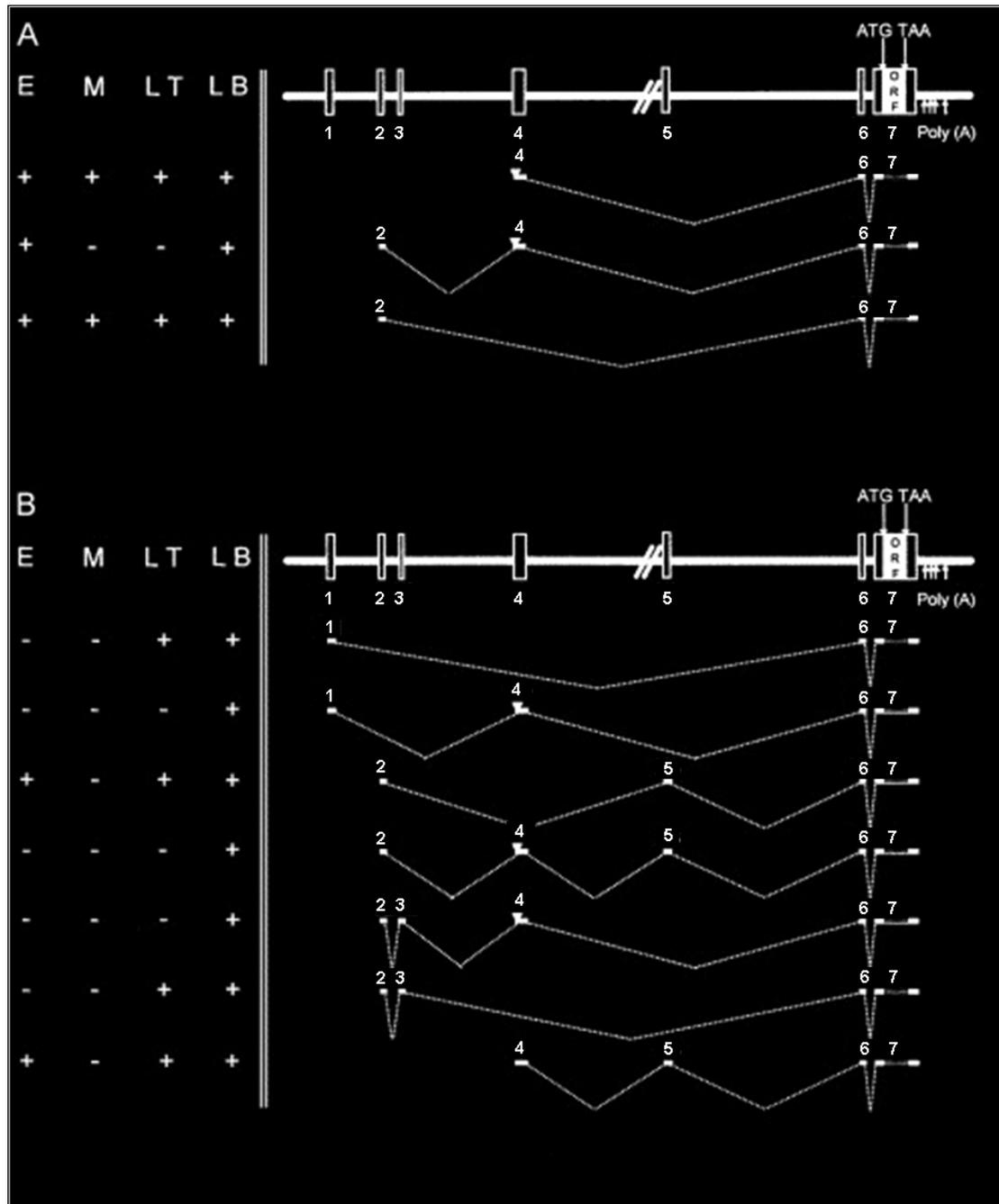


Figure 14 : Structure des transcrits *RHOH* et leur expression dans différentes lignées cellulaires hématopoïétiques (d'après Lahousse et collaborateurs [2]). A. Représentation des transcrits majeurs et de leur profil d'expression dans des lignées hématopoïétiques. B. Représentation des transcrits mineurs et de leur profil d'expression dans des lignées hématopoïétiques. L'organisation génomique de *RHOH* est représentée au-dessus des isoformes de transcrits. La présence (+) ou non (-) de chaque transcrit *RHOH* dans les différentes lignées cellulaires hématopoïétiques a été détectée par RT-PCR. E : lignées érythroïdes, M : lignées myéloïdes, LT : lignées lymphoïdes T, LB : lignées lymphoïdes B.

1.2.1.4 Rôle des régions non traduites du gène *RHOH*

En plus de RhoH, deux autres membres de la famille Rho présentent également la particularité de posséder un unique exon codant : RhoB et RhoG, alors que la séquence

codante des autres membres de la famille Rho est répartie sur des régions comprenant de 3 à 18 exons [164-166]. Cette caractéristique des gènes *RHOH* et *RHOG* serait due à des événements de transfert de gène ou d'intégration rétrovirale [166]. Le gène *RHOG* comporte également un grand intron de plus de 20 Kb en amont de l'exon codant [167]. La comparaison de *RHOG* et *RHOH* semble mettre en évidence une similarité entre ces deux gènes ; cependant, seul le gène *RHOH* est caractérisé par une région 5' génomique très étendue ET très complexe avec de nombreux exons non codants contenant des uORFs. En revanche, il est à noter que même si le gène *RAB27A* de la famille Rab ne possède pas d'unique exon codant, il présente de nombreuses similitudes avec *RHOH*. *RAB27A* est situé en 15q21.3 et s'étend sur environ 85 Kb. Il comporte 9 exons dont deux (1a et 1b) non codants, séparés par un intron de 31 Kb. De plus, ce gène présente deux uORFs dans son exon 1a, précédant l'ATG initiant la traduction de la protéine Rab27A localisé dans le troisième exon [168]. Aucune information sur le rôle de cette région 5' génomique n'a été transmise à ce jour, cependant les auteurs ont émis l'hypothèse que la présence de ces uORFs dans les transcrits serait un facteur de régulation de la traduction. Des études in silico ont montré que seuls 9 % des transcrits de vertébrés présentent un seul et unique uORF. En revanche, deux tiers des transcrits de proto-oncogènes présentent au moins un uORF, notamment des oncogènes comme *BCL2* et *MYC* dont l'expression est modifiée lors de translocations chromosomiques impliquant les séquences promotrices des gènes partenaires [168, 169].

La plupart des gènes humains présentent une région 5' non traduite ou 5'-UTR (*UnTranslated Region*) d'environ 200 bp et une région 3' non traduite de 1 Kb [170]. En regard des nombreuses isoformes de transcrits *RHOH*, nous pouvons observer que la taille de leur région 5'-UTR varie de 470 à 906 bp et que leur région 3'-UTR mesure jusqu'à 1 Kb environ. Le gène *RHOH* présente donc une structure complexe, plus particulièrement dans sa région 5' génomique. Il est connu que de nombreux « éléments », présents dans les régions 5' des gènes, affectent la régulation transcriptionnelle et posttranscriptionnelle de l'expression des gènes, en modulant la transcription, le transport des transcrits hors du noyau, l'efficacité de traduction, la localisation subcellulaire et la stabilité. La grande complexité de ces mécanismes fait intervenir *i)* les structures primaires comme la présence d'introns, de sites d'initiation de la transcription, de sites d'épissage alternatif, de régions riches en G+C, de motifs de répétitions, *ii)* la présence d'uORFs et *iii)* les structures secondaires stables dont l'enthalpie libre (ΔG_0) est inférieure ou égale à -30 Kcal/mol [170]. *RHOH* présente de nombreux exons non codants dont les structures secondaires prédites sont très stables et sont précisées dans le **Tableau 2** (page suivante), un intron très grand et quatre uORFs dans la

région 5'-UTR. Ceci suggère un rôle de cette structure complexe dans l'expression spécifique tissulaire et cellulaire de *RHOH* et dans la régulation de l'expression protéique.

Exons	1	2	3	4	5	6
uORFs (taille en nucléotides)	OUI (24)	OUI (60)	NON	OUI (69)	NON	OUI (21)
Structure secondaire prédite (enthalpie libre ou ΔG_0 exprimée en KCal. Mol-1)	-40	-36.4	-35	-62.9	-45	-31

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des principales caractéristiques retrouvées au sein des exons non codants de *RHOH* : présence d'uORFs ou *upstream Open Reading Frame* et stabilité des structures secondaires prédites [10].

1.2.1.5 Expression tissulaire et cellulaire du gène *RHOH*

La spécificité de l'expression de *RHOH* a été mise en évidence par la technique de Northern Blot à partir de tissus humains, de populations cellulaires sanguines purifiées et de différentes lignées hématopoïétiques, en utilisant une sonde reconnaissant l'exon 7 présent dans tous les ARN messagers de *RHOH* [2]. L'expression de *RHOH* a ainsi été détectée dans les organes hématopoïétiques (thymus, rate) et dans les lymphocytes du sang périphérique (**Figure 15**, page 42) [2]. Plus précisément, l'expression était élevée dans les lymphocytes, faible dans les monocytes et pratiquement indétectable dans les polynucléaires. Ces résultats ont été confirmés dans des lignées cellulaires par RT-PCR quantitative : une expression transcriptionnelle de *RHOH* de 5 et 25 fois supérieure a été observée dans les lignées lymphoïdes comparativement aux lignées érythroïdes et myéloïdes, respectivement (**Figure 16**, page 42) [2].

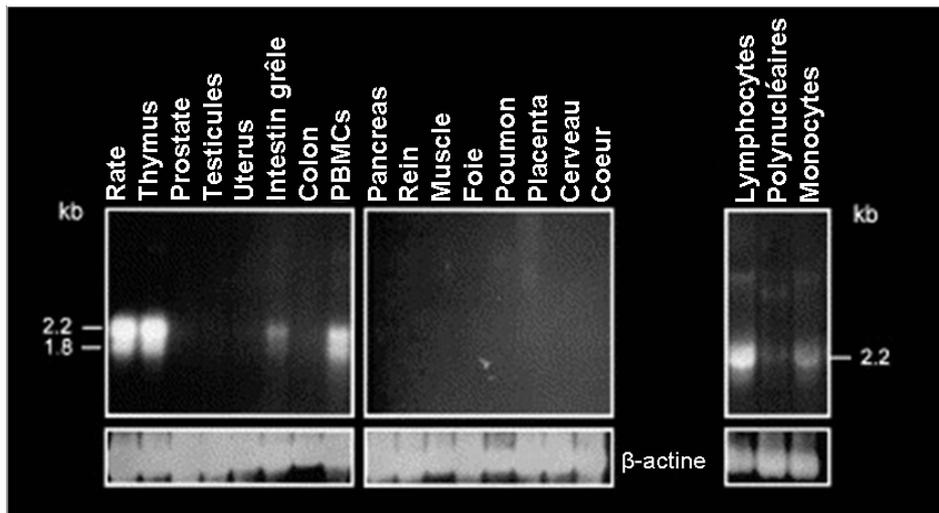


Figure 15 : Expression tissulaire des transcrits *RHOH* (d'après Lahousse et collaborateurs [2]). La technique de Northern Blot a permis d'observer l'expression de l'ensemble des ARN messagers de *RHOH* par la présence de bandes de 2.2 et 1.8 Kb dans la rate, le thymus, les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) et plus particulièrement dans les lymphocytes et faiblement dans les monocytes.

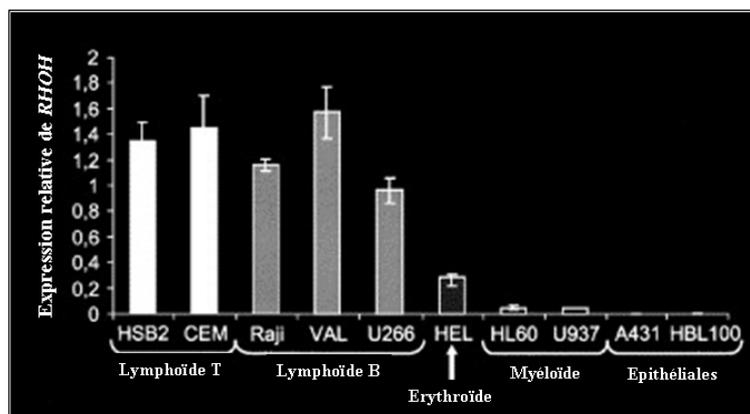


Figure 16 : Expression relative de la totalité des transcrits *RHOH* dans différentes lignées cellulaires (d'après Lahousse et collaborateurs [2]). Le taux de *RHOH* a été quantifié dans des lignées lymphoïdes T et B, une lignée érythroïde, des lignées myéloïdes et épithéliales par la technique de RT-PCR quantitative (chimie TaqMan). Les amorces et la sonde de PCR ont été positionnés dans les exons 6 et 7, présents dans tous les transcrits *RHOH* décrits.

Le gène *RHOH* est exprimé en une dizaine de transcrits, présentant une expression spécifique dans certains types cellulaires : c'est le cas par exemple des transcrits constitués des exons « 2-4-5-6-7 », « 2-3-4-6-7 » ou « 1-4-6-7 » spécifiquement exprimés dans ces mêmes lignées B ou du transcrit « 2-4-6-7 » retrouvé presque exclusivement dans les lymphocytes B (**Figure 14**, page 39) [2]. Nous noterons que ces transcrits spécifiques des cellules B sont caractérisés par l'insertion en leur sein de l'exon 4. Une différence d'expression est également observée pour certains transcrits : il a été ainsi montré que l'isoforme « 2-6-7 » est exprimée 20 à 30 fois plus dans les lignées B que dans les lignées T alors que l'isoforme « 4-6-7 » ne présente pas de spécificité puisqu'elle est retrouvée en grande quantité et à des niveaux comparables à la fois dans les lignées B et T (un facteur 2 est au maximum retrouvé). L'hypothèse suivante a été émise : l'isoforme « 4-6-7 » serait utilisée préférentiellement dans les cellules pour synthétiser la protéine RhoH. Les autres transcrits serviraient plutôt à moduler la quantité de protéine RhoH nécessaire selon le type cellulaire. L'activation cellulaire (par exemple, lymphocytes T activés comparés aux lymphocytes T matures) pourrait être également un facteur responsable des différences quantitatives et qualitatives caractérisant les transcrits *RHOH*.

1.2.2 La protéine RhoH

La protéine RhoH est une petite protéine G appartenant à la famille Rho et dont le profil transcriptionnel est restreint aux tissus hématopoïétiques et plus particulièrement aux leucocytes. La protéine RhoH présente de plus la particularité d'être dépourvue d'activité GTPasique et donc se trouve constitutivement associée au GTP.

1.2.2.1 Phylogénie des protéines Rho

23 gènes de la famille Rho ont été découverts chez les mammifères et codent des petites GTPases. Celles-ci peuvent être classées en 6 sous-groupes basés sur le pourcentage d'identité de la séquence primaire en acides aminés, sur les motifs structuraux et des fonctions biologiques similaires [7]. Une représentation schématique de leur arbre phylogénique permet de comparer l'éloignement des protéines Rho entre elles et avec les autres GTPases de la superfamille Ras (**Figure 17**, page suivante). La protéine RhoH présente une position particulière. La comparaison de ses domaines Rho la positionne plus proche des RhoBTB,

bien que la séquence de RhoH ne présente pas d'homologie marquée avec les RhoBTB, ni ne possède de domaines BTB ni les mêmes caractéristiques que ces dernières [7].

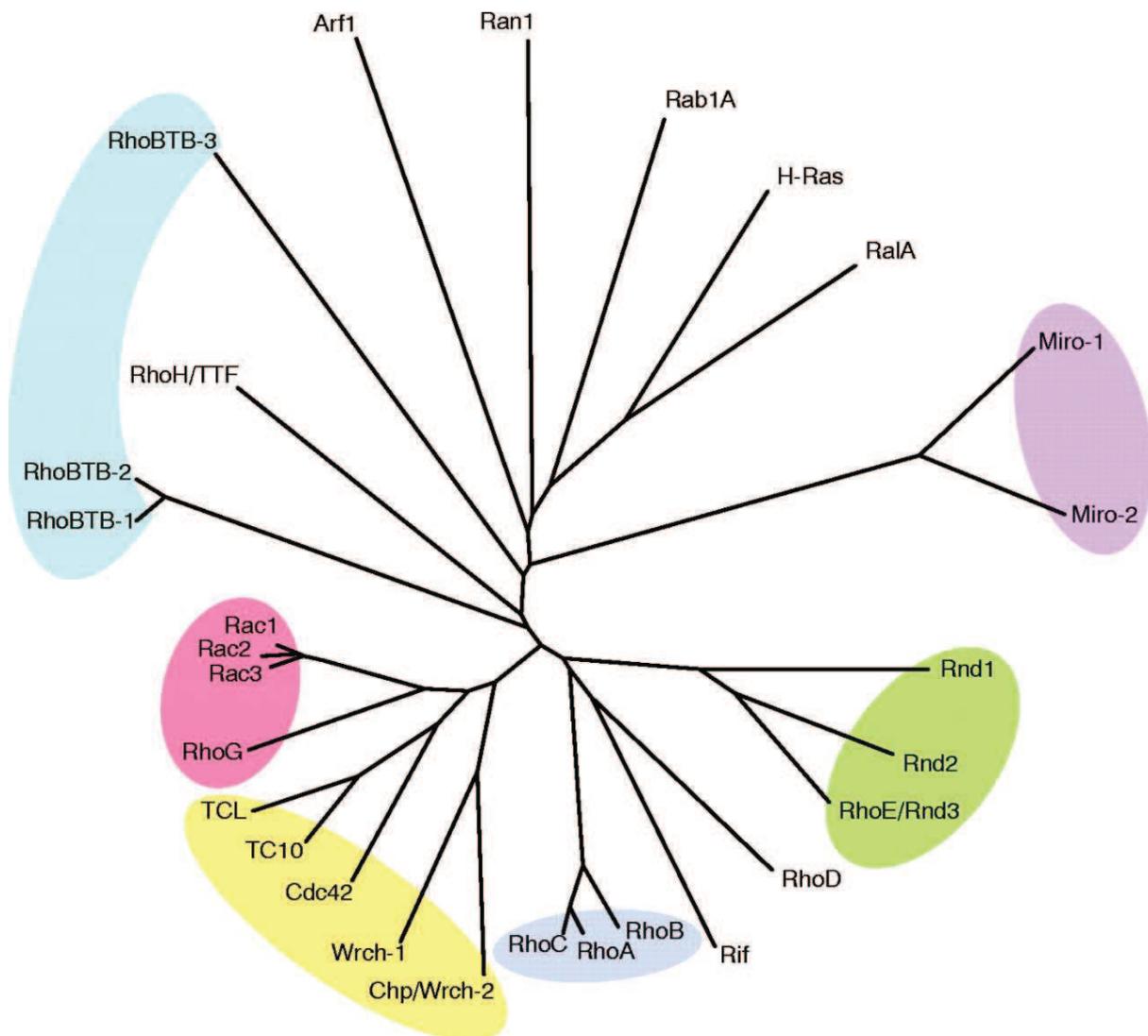


Figure 17 : Arbre phylogénétique de la famille des petites protéines Rho et des représentants des autres GTPases de la superfamille Ras (d'après Wennerberg et Der [7]). Une analyse phylogénétique des séquences en acides aminés des domaines Rho des membres des RhoGTPases a été faite grâce au programme ClustalW. Les résultats montrent que cette famille peut être divisée en 6 branches majeures : Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB et Miro ; les protéines RhoH, Rif et RhoD ne sont pas intégrées dans ces groupes.

1.2.2.2 Structure de la protéine RhoH

La protéine RhoH a une séquence de 191 acides aminés, qui présente 27% d'homologie avec la protéine H-Ras et 45% avec les membres de la famille Rho. L'alignement de la séquence en acides aminés de la protéine RhoH avec celles des membres : RhoA, Rac1 et Cdc42 a été représenté par Fueller et Kubatzky (**Figure 18**, ci-dessous) [12].

	Boucle P	Switch I	
Rac1	-MQAI--KCVVVG D AVGKTCLLISYTTNAFPGEYIPTVFDNYSANVMVDGKPVNLGLWD		57
Cdc42	-MQTI--KCVVVG D AVGKTCLLISYTTNKFSEYVPTVFDNYAVTVMIGGEPYTLGLFD		57
RhoA	-MAAIRKRLVIVGD G ACGKTCLLIVFSKQDFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWD		59
RhoH	MLSSI--KCVLVGD S AVGKTSLLVRFRTSETFPEAYKPTVYENTGVDVFMDDGIQISLGLWD		58
	Switch II		
Rac1	TAG Q EDYDRLRPLSY P QTDVFLICFSLVSPASFENVRAKWYPEVRHHCP-NTP I ILVGTK		116
Cdc42	TAG Q EDYDRLRPLSY P QTDVFLVCFVSVSPSSFENVKEKWWPEITHHCP-KTP F LLVGTQ		116
RhoA	TAG Q EDYDRLRPLSY P DTDVILMCFSIDSPDSENIPEKWTPEVKHFCP-NV P IILVGNK		118
RhoH	TAG N DAFRSIRPLSY Q Q A DVVLM C YSVANHNSFLNLKNKWIGEIRSNLP-CT P VLVVATQ		117
	Insertion Rho	ITAM-Like	
Rac1	LDLRD DKDTIEKLKEK KLTPITYPQGLAMAKEIGAVKYLECSALTQRGLKTVFDEAIRAV		176
Cdc42	IDLRD DPSTIEKLAKN QKPITPETAEKLRDLKAVKYVECSALTQRGLKNVFDEAILAA		176
RhoA	KDLR NDEHTRRELAKM QEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAA		178
RhoH	TDQR----- EMGPHRA SCVNAMEGKLAQDVRAKGYLECSALSNRQVQVFECAVRTA		170
	CAAX		
Rac1	LCPPPV KKR ----- KRK CLLL 192		
Cdc42	LEPPET Q P----- KRK CCIF 191		
RhoA	L QARRGK K----- KSG CLVL 193		
RhoH	V NQARRRNRRL FSINE CK IF 191		

Figure 18 : Alignement de la séquence en acide aminé de RhoH avec celle des principales Rho GTPases : RhoA, Rac1 et Cdc42 (d'après Fueller et Kubatzky [12]). Les séquences protéiques de RhoA, Rac1, Cdc42 et RhoH ont été alignées en utilisant le programme ClustalW. Les domaines des protéines Rho ont été positionnés : la Boucle P, les régions Switch I et Switch II, l'insertion Rho et le motif CAAX. Les résidus importants et conservés ont été indiqués en rouge et la région basique en gras, en amont du motif CAAX. Contrairement aux autres protéines de la famille Rho, RhoH présente de plus un motif ITAM-like comprenant la séquence YxxA(X)₆YxxA.

Ils ont ainsi positionné la boucle P et les domaines Switch I et II. Nous pouvons remarquer le remplacement d'un résidu d'acide aminé conservé dans la boucle P, gly12 ou G12 dans Ras, Rac1, Rac2 et Cdc42, par une sérine, en position 13 dans la séquence de RhoH. Pour RhoE, protéine constitutivement associée au GTP, cet même acide aminé est également remplacé par une sérine [12]. Un autre résidu important pour l'activité GTPasique intrinsèque des Rho (Gln61 ou Q61 pour Ras, Gln63 ou Q63 pour RhoA) est remplacé par une asparagine (N) dans le domaine Switch II de la séquence de RhoH, en position 62. Ces

deux modifications entraînent un défaut de l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine RhoH, décrit par Li et ses collaborateurs en 2002 [104]. Dallery et ses collaborateurs ont mis en évidence le domaine d'insertion Rho de la protéine RhoH, qui ne fait que 7 résidus d'acides aminés (alors que 13 résidus sont observés pour les autres RhoGTPases), la région riche en résidus basiques située à l'extrémité C terminale et le motif CAAX [12, 151]. Les résidus C terminaux de la protéine RhoH, CKIF, correspondent au motif CAAX classiquement retrouvé chez tous les membres de la superfamille Ras. Ce motif CKIF a la particularité d'être modifié *in vitro* par une farnésyltransférase et faiblement par une géranylgeranyltransférase, ceci influençant la localisation subcellulaire de RhoH [12]. Ces résultats sont en accord avec la relocalisation cytoplasmique de RhoH suite à l'utilisation d'inhibiteurs de farnésyl- et géranylgeranyl- transférase [171]. RhoH est donc localisée à la membrane grâce au groupement lipidique ajouté à son extrémité C terminale mais est également retrouvée de façon diffuse dans le cytoplasme [104, 172]. RhoH présente de plus un motif ITAM-like (*Immunoreceptor Tyrosine base Activation Motif*) comprenant la séquence YxxA(X)₆YxxA proche de celle du motif ITAM, caractérisé par deux tyrosines espacées par 9-11 acides aminés (YxxL/I(X)₆₋₈YxxL/I. Pour RhoH, les (iso)leucines sont remplacées par des résidus Alanine. Ce domaine ITAM-like est important pour les interactions protéine-protéine entre RhoH et ses partenaires lors de la stimulation des voies de signalisation, comme lors de son association aux domaines SH2 de ZAP70 observée au cours de l'activation du TCR [12, 173].

1.2.2.3 Expression de la protéine RhoH dans les cellules hématopoïétiques

Nous avons vu précédemment que les transcrits du gène RHOH ont été mis en évidence uniquement dans les tissus hématopoïétiques et plus particulièrement dans les leucocytes (*paragraphe 1.2.1.4 page 38*). Plus récemment, la mise au point d'anticorps a permis d'observer, par la technique de Western Blot, l'expression cellulaire de la protéine RhoH. Il a ainsi été mis en évidence que la protéine RhoH est fortement exprimée dans les cellules mononucléées du sang périphérique humain, plus particulièrement dans les lymphocytes T et B ; alors qu'une absence totale de la protéine a été notée dans les neutrophiles et les monocytes non activés quiescents (**Figure 19**, page suivante) [3].

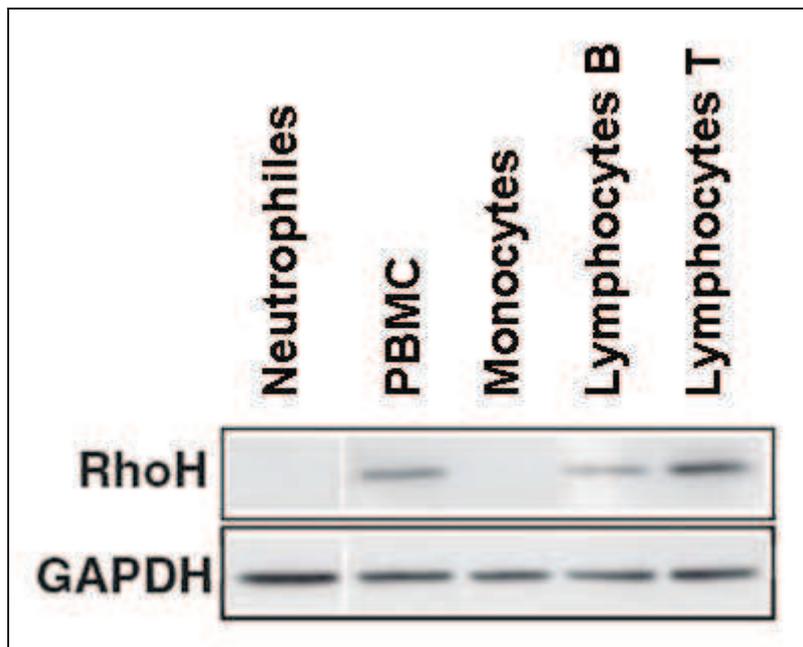


Figure 19 : Expression de la protéine RhoH dans différents lignages hématopoïétiques (d'après Schmidt-Mende [3]). L'expression de RhoH a été mise en évidence dans des préparations de neutrophiles, monocytes, lymphocytes T, lymphocytes B purifiés à partir de sang périphérique humain. Ces résultats ont été obtenus par Western Blot et utilisation d'un anticorps polyclonal ciblant RhoH. L'expression de la GAPDH sert ici de contrôle interne pour la quantité de protéines déposée sur le gel.

Ces résultats sont en accord avec le niveau d'expression des ARN messagers de *RHOH* décrite dans ces cellules dans la littérature [2, 104]. L'expression exclusive dans les tissus hématopoïétique n'est pas spécifique de RhoH puisque la protéine Rac2, un membre du sous-groupe Rac, est également spécifiquement exprimée dans les tissus hématopoïétiques, dans les lymphocytes sous certaines conditions d'activation, et contrairement à la protéine RhoH, dans les cellules myéloïdes et plus particulièrement dans les neutrophiles matures [12, 174, 175]. Cette expression particulière de Rac2 serait importante pour la différenciation des précurseurs myéloïdes et pour la fonction de Rac2 dans les neutrophiles matures, lors de l'activation de la NADPH oxydase [7]. RhoH pourrait donc être importante pour la différenciation des lymphocytes T et B.

La présence d'un motif ITAM-like et d'une courte insertion Rho dans la structure de la protéine RhoH associée à son expression spécifique dans les leucocytes suggèrent que RhoH aurait un rôle bien particulier dans les lymphocytes comparativement aux autres membres de la famille Rho. Plusieurs études ont permis de comprendre les fonctions physiologiques de RhoH et son rôle dans certaines pathologies.

1.3 Rôles physiologiques et pathologiques de RhoH dans le système hématopoïétique

L'expression de RhoH a été mise en évidence principalement dans les leucocytes mais également dans la moelle osseuse, le thymus et la rate suggérant que RhoH est exprimée très tôt lors de la différenciation hématopoïétique, et donc dans les cellules souches et les progéniteurs ou HSC/Ps (*Hematopoietic Stem Cells / Progenitors*).

1.3.1 Rôle de RhoH dans les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques

Les fonctions de RhoH dans ces cellules ont été mises en évidence grâce à des études faites chez la souris par les équipes de Gu et Dorn [176-178]. Deux approches ont été utilisées : soit par surexpression de la version murine de RhoH dans des cellules HSC/Ps de souris par transfert de gène rétroviral, soit par génération d'un modèle de souris dans lequel le gène *RHOH* a été invalidé par recombinaison homologue. Il a été ainsi mis en évidence que la présence de la protéine RhoH exogène dans les HSC/Ps induit un défaut dans la reconstitution du système hématopoïétique chez la souris âgée de 6 mois, résultats corrélés à la diminution de l'expansion cellulaire *in vitro* des HSC/Ps surexprimant RhoH en réponse au SCF (*Stem Cell Factor*). Plus précisément, RhoH induit une diminution *in vitro* du nombre des colonies des progéniteurs myéloïdes en présence de facteurs de croissance (G-CSF, MGDF, SCF)[176]. En revanche, l'invalidation de *RHOH* n'induit pas de modification du nombre de cellules myéloïdes, érythroïdes et B-lymphoïdes matures chez la souris âgée de 6 ou 12 mois, mais entraîne une augmentation des érythroblastes spléniques et une diminution des lymphocytes T dans la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques [173, 177]. Ces résultats montrent deux fonctions importantes de RhoH. D'une part, cette protéine inhibe la croissance des cellules souches, des progéniteurs hématopoïétiques et des cellules myéloïdes chez la souris ; d'autre part, elle semble essentielle au développement des lymphocytes T.

RhoH ne contrôle pas seulement la croissance des HSC/Ps, elle régule également d'autres processus cellulaires. En effet, cette protéine diminue la prolifération des HSC/Ps mais également leur migration en présence de SDF1 α (*Stromal cell Derived Factor 1 α*) par réorganisation du cytosquelette d'actine, et elle induit leur apoptose [176, 178]. Le rôle de RhoH dans la migration interfère avec celui de Rac1. La protéine Rac1 est associée à

la formation des lamellipodes riches en actine favorisant la migration. Ce phénomène est altéré en présence de RhoH, qui diminue l'activation de Rac1 et Rac2. Lorsque RhoH est invalidée, l'activation des protéines Rac1 et Rac2 est augmentée et Rac1 se trouve constitutivement associée à la membrane. Ces données soulignent donc l'existence d'un lien entre RhoH et Rac1 et mettent en évidence le rôle antagoniste de RhoH vis-à-vis de Rac1 dans les HSC/Ps murins (**Figure 20**, ci-dessous). Des études d'interactions protéiques de RhoH dans les lignées cellulaires HEK 293 et 293 T ont montré son association avec les protéines Pak, famille des p21-Activated Kinases et effecteurs communs à Rac1 et Cdc42 [179, 180]. A partir de ces informations, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une régulation de la migration des HSC/Ps par RhoH, par modification de l'activation de Rac1 et ce probablement par interaction de RhoH avec soit Rac1 directement, soit avec les partenaires directs de Rac1.

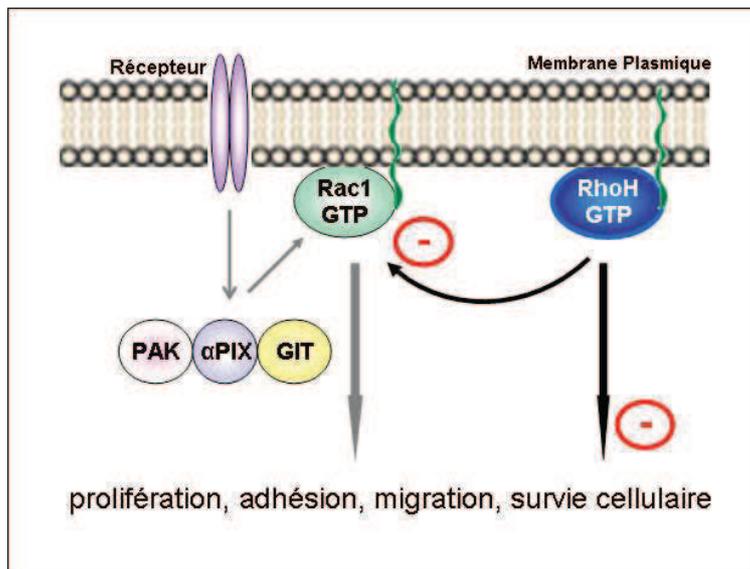


Figure 20 : Modèle de régulation des processus cellulaires dans les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques murins par la protéine RhoH. En présence de stimuli extracellulaires, la protéine Rac1 est activée ce qui induit l'activation de Pak. Dans ce système, RhoH régule négativement l'activation de Rac1 et les processus cellulaires impliqués dans la prolifération, l'adhésion, la migration et la survie des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques.

Les différentes fonctions de RhoH dépendent des interactions avec ses effecteurs. Gu et ses collaborateurs ont utilisé plusieurs mutants de RhoH afin de mettre en évidence les domaines protéiques impliqués [178]. La version mutante de RhoH (T36A), où la thréonine en position 36 présente dans le domaine Switch I a été remplacée par un résidu Alanine (**Figure 18**, page 45), leur a permis de montrer l'importance de cet acide aminé pour les fonctions de RhoH dans les HSC/Ps. D'autre part, la délétion de l'extrémité C terminale de RhoH comprenant le domaine polybasique et le motif CKIF, impliqués dans les interactions protéiques et les localisations subcellulaires, entraîne une modification de sa localisation qui de membranaire devient nucléaire. Ces données montrent donc que le domaine Switch I, la

région polybasique et le motif CKIF sont des régions critiques pour la localisation subcellulaire de RhoH et son rôle dans le contrôle de l'activation de Rac1 dans les HSC/Ps. La surexpression de RhoH dans des modèles murins a permis de mettre en évidence son rôle de régulateur négatif dans le développement des progéniteurs myéloïdes. Ces résultats suggèrent son implication dans les réponses immunitaires innées.

1.3.2 *RhoH dans l'immunité innée*

L'immunité innée consiste en une série de systèmes de défense non spécifiques et représente la première barrière de défense, toujours active, ne nécessitant pas de contact préalable avec l'agent pathogène, et sans mémoire immunologique. Des cellules intervenant dans ces fonctions immunitaires répondent rapidement à l'invasion par un agent pathogène en détruisant les organismes étrangers par phénomène de phagocytose. Ces cellules sont des cellules myéloïdes, soit phagocytaires comme les monocytes (macrophages) et les granulocytes neutrophiles, soit sécrétrices de médiateurs inflammatoires telles les polynucléaires basophiles, les éosinophiles et les mastocytes (**Figure 21**, ci-dessous). Outre les cellules effectrices de cette immunité, de nombreuses molécules sont impliquées : les facteurs plasmatiques, le système du complément et les cytokines proinflammatoires.

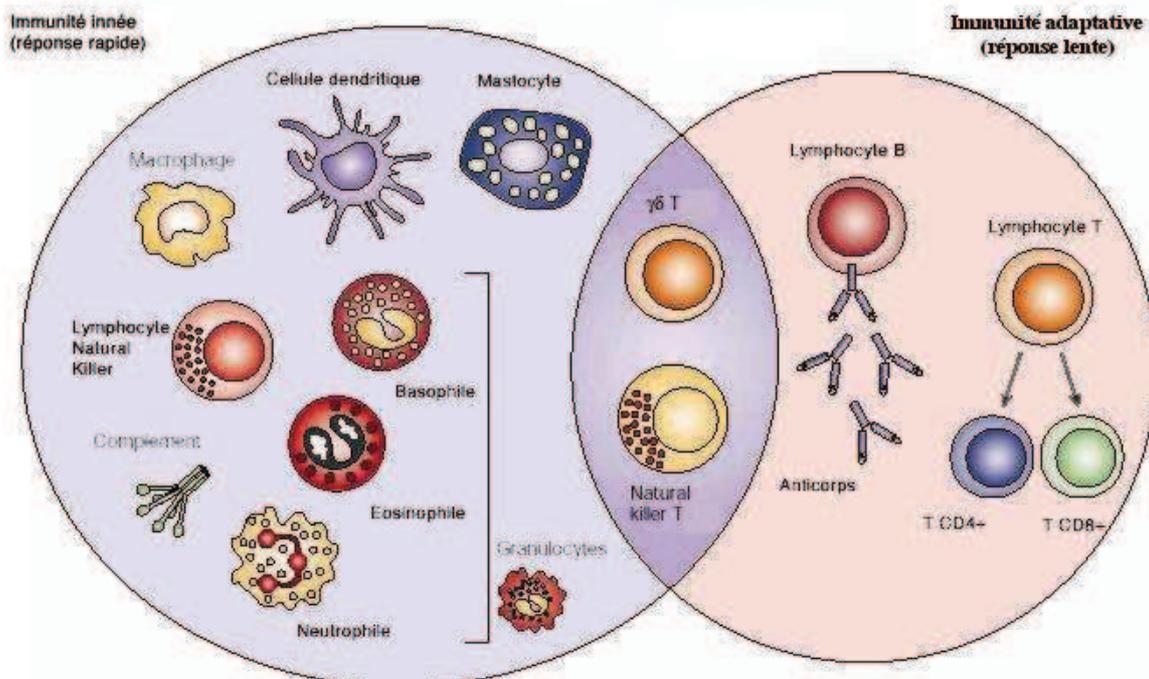


Figure 21 : Représentation simplifiée des différents intervenants (cellules et facteurs inflammatoires) dans les réponses immunitaires innées et adaptatives.

1.3.2.1 Rôle de RhoH dans les neutrophiles

Les granulocytes neutrophiles sont le type de globules blancs les plus abondants chez les mammifères et constituent des acteurs essentiels du système immunitaire. Les réponses fonctionnelles des neutrophiles sont augmentées suite à leur stimulation par des hématopoïétines comme le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage - Colony Stimulating Factor*) [181]. RhoH n'est pas exprimée dans les neutrophiles quiescents, cependant, le GM-CSF augmente rapidement son expression dans les neutrophiles matures dès une heure de stimulation [3, 182]. L'expression de RhoH est également augmentée en conditions inflammatoires, notamment dans la fibrose kystique appelée mucoviscidose) et dans les neutrophiles de patients atteints de colites ulcéraives et d'appendicite. La protéine RhoH se trouve alors localisée à la membrane cellulaire [182]. Les neutrophiles ainsi stimulés produisent de nombreux médiateurs proinflammatoires comme le leucotriène B4 (LTB4) qui représente un facteur chimiotactique pour les neutrophiles eux-mêmes et d'autres leucocytes exprimant les récepteurs de ce médiateur lipidique [181, 183]. Par la génération de LTB4, les neutrophiles ont un potentiel d'amplification de la réponse inflammatoire, nécessaire à l'élimination effective des microbes mais qui peut conduire à l'endommagement des tissus en cas d'inflammation persistante. L'activation des réponses immunitaires innées neutrophiliques doit donc être fortement contrôlée. Les neutrophiles produisent du LTB4 dès 30 minutes de stimulation par le GM-CSF et le complément C5a, alors que les neutrophiles provenant de patients atteints de fibrose kystique ont une production fortement réduite suite à cette activation, inversement corrélée à l'expression de RhoH. Dans ces même cellules, des valeurs basses de LTB4 sont associées à une expression élevée de RhoH jusqu'à 5h de stimulation par le GM-CSF. RhoH régule donc négativement la production de leucotriène B4 dans les neutrophiles [182]. Par l'utilisation d'inhibiteurs, la même équipe de recherche a mis en évidence que cette fonction de RhoH dans les neutrophiles ne dépend pas de MEK1/2 mais nécessite l'activation des voies de signalisation de la PKC, de la p38 MAPK et de la PI3K.

1.3.2.2 Rôle de RhoH dans les Natural Killer

Les cellules NK (*Natural Killer*) sont elles-aussi impliquées dans l'immunité innée. Elles détruisent les cellules infectées par les virus avant qu'ils aient eu le temps de propager la maladie. Bien sûr de nombreux mécanismes de régulation empêchent les NK de s'attaquer

aux cellules saines. Les études d'inactivation de *RHOH*, dans des souris âgées de 2 mois, ont permis de mettre en évidence une augmentation du nombre de NK et de NKT (*Natural Killer T lymphocyte*) dans la moelle osseuse et la rate de ces souris, modification qui n'est plus observée dans les souris *RHOH*^{-/-} âgées de 6 mois [177]. RhoH régule donc négativement la production des cellules NK au début de la mise en place de ce lignage mais n'est pas essentielle à long terme. Ces données, associées aux résultats obtenus dans les neutrophiles, suggèrent que RhoH est impliquée dans la régulation négative des processus de l'immunité innée.

1.3.2.3 Rôle de *RhoH* dans les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules présentes dans de nombreux tissus et contiennent de nombreux granules riches en médiateurs physiologiques impliqués dans les processus d'hypersensibilité et l'inflammation [184, 185]. Les mastocytes reconnaissent les antigènes par l'intermédiaire des immunoglobulines IgE et par les récepteurs Fc spécifiques appelés FcεRI, présents à leur surface [186, 187]. L'activation des récepteurs conduit à la stimulation de leurs voies de signalisation entraînant une mobilisation calcique, l'expression de gènes spécifiques et la dégranulation des mastocytes. La stimulation des FcεRI conduit à l'activation des kinases Lyn et Fyn de la famille Src, de la kinase Syk (de la famille de ZAP70) et à la phosphorylation des motifs ITAM sur l'unité γ des complexes FcεRI (**Figure 22**, page suivante) [188, 189]. Syk activée va en retour phosphoryler LAT, LAT-2 et SLP-76 et induire les cascades de phosphorylation associées [190-192].

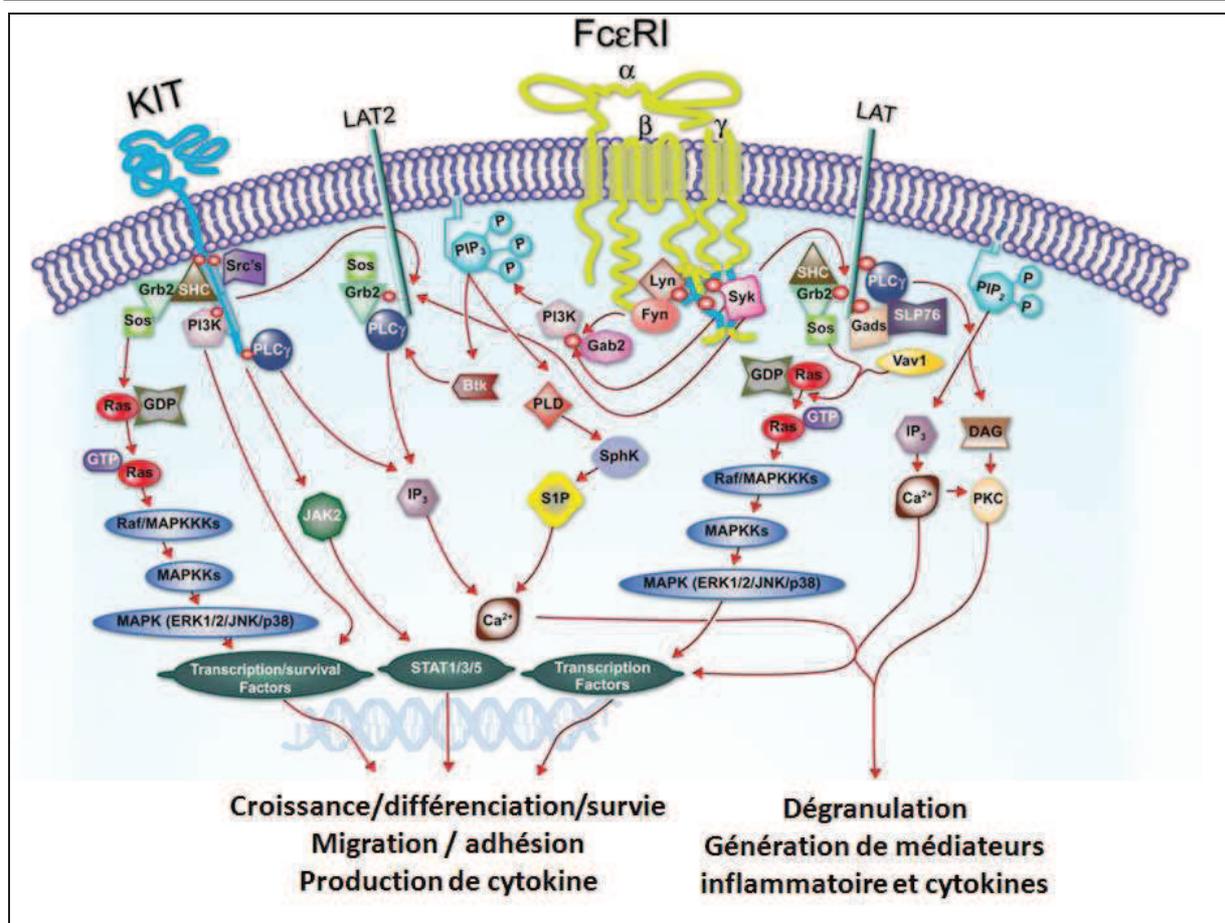


Figure 22 : Voies de signalisation des récepteurs Kit et FcεRI dans les mastocytes (d'après Metcalfe et collaborateurs [4]). L'activation des récepteurs FcεRI et Kit par les antigènes induit une cascade de phosphorylation, indiquée par des spots blancs cernés de rouge. Cette activation entraîne la stimulation des tyrosine kinases de la famille Src, comme Lyn ou de molécules signalétiques contenant des domaines SH2. L'activation de Syk par le récepteur FcεRI conduit à la phosphorylation de LAT et LAT2, à l'activation de petites protéines G de la famille Ras, puis à la formation de complexes impliquant les protéines Gad, Grb2, SLP76, SHC et PLCγ1 et PLCγ2, enfin à la libération du calcium intracellulaire. Ces signaux conduisent à la dégranulation des mastocytes, à la génération de médiateurs inflammatoires et de cytokines par ces cellules, et à de nombreux processus cellulaires, comme la prolifération, la différenciation, l'adhésion, la migration et la survie.

L'inactivation de RhoH n'induit aucune modification du développement des mastocytes chez la souris ; cependant, leur dégranulation est fortement réduite, suggérant un rôle de RhoH dans la signalisation du récepteur FcεRI [176, 177, 193]. Précisément, l'absence de RhoH inhibe la transduction du signal du récepteur FcεRI en diminuant les flux calciques, l'activation de nombreuses protéines et ce, à travers une réduction de la phosphorylation de PLCγ1, PLCγ2, LAT, SLP76 et Syk, et de la production d'interleukine 6 et du TNFα (*Tumor Necrosis Factor α*) [193]. En revanche, cette inactivation n'altère pas l'activation de p38

[193]. RhoH régule donc positivement les voies de signalisation du récepteur FcεRI présent à la surface des mastocytes. D'une part, RhoH réprime la production de leucotriène B4 dans les neutrophiles et d'autre part, dans les mastocytes, elle est nécessaire à la dégranulation cellulaire : les fonctions de RhoH dans l'immunité innée sont donc très complexes et dépendent essentiellement de la nature des cellules et des processus cellulaires étudiés.

1.3.2.4 Rôle de RhoH dans les pathologies myéloïdes

La leucémie aigue myéloïde (LAM) est une maladie caractérisée par la prolifération clonale et l'accumulation de progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse, ce qui conduit à un défaut du développement du système hématopoïétique ou une insuffisance médullaire [194]. Le diagnostic biologique de la LAM est basé sur la morphologie cellulaire des blastes et leurs caractéristiques immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires [195]. L'incidence de cette maladie augmente avec l'âge, les patients ont en moyenne entre 65 et 75 ans. Bien que ce soit une leucémie fréquente chez l'adulte, son taux de survie à 5 ans reste le plus bas de toutes les leucémies [196]. Cette pathologie représente environ 25% de toutes les leucémies chez l'adulte dans le monde occidental. 15 à 20 % des cas de LAM concernent des patients de moins de 15 ans [197]. De nombreux facteurs pronostiques ont été identifiés dans cette leucémie : l'âge, le status de la maladie, l'état des organes, la quantité de globules blancs dans le sang, le caryotype et les autres anomalies moléculaires de ces cellules [198].

Récemment, une équipe japonaise a décrit une possible implication de RhoH dans la résistance de la leucémie aigue myéloïde (LAM) aux agents thérapeutiques. L'inaccessibilité des travaux ne permet pas de discuter des résultats obtenus, ni de savoir précisément les types de LAM étudiés. Cependant, nous savons que l'expression transcriptionnelle du gène *RHOH* a été quantifiée dans 90 échantillons de moelle osseuse de patients atteints de LAM. Par une analyse statistique de type Kaplan-Meier, ils ont suggéré qu'une faible expression du gène *RHOH* serait un facteur de mauvais pronostic de la LAM chez ses patients. Une analyse multivariable a montré que RhoH est un facteur pronostique défavorable indépendant de la survie des patients atteints de LAM. La reconstitution de l'expression de RhoH dans ces cellules conduit à la diminution de l'activation des protéines Rac et à la déphosphorylation de Bad, entraînant une réduction de la survie cellulaire. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que la faible expression de RhoH, entraînant une activation des protéines Rac, contribuerait à la résistance aux agents thérapeutiques des cellules leucémiques. Sur la base de leurs résultats,

ils proposent alors d'inhiber ces dernières et leurs voies de signalisation comme nouvelle stratégie anti-leucémique [199].

Dans une lignée cellulaire, THP-1, dérivée d'un patient atteint de LAM de type 5 (selon la classification internationale), Gündogdu et ses collaborateurs ont montré que l'expression ectopique de RhoH conduit à une diminution de la présence de CD123, récepteur à l'IL3, à la surface de ces cellules, associé à une baisse du taux des transcrits du gène IRF-1. A partir de leurs résultats et de ceux obtenus dans les cellules proB (*paragraphe 1.3.3.1, page 55*), ces données suggèrent que l'expression de RhoH dans les LAM pourrait contribuer à la prolifération accrue des cellules leucémiques induite par l'IL3 et ce en régulant l'expression du récepteur, dépendante du facteur de transcription IRF-1 [200].

1.3.3 RhoH et l'immunité acquise

La 1^{ère} ligne de défense, l'immunité non spécifique, n'est pas suffisante. L'organisme fait alors appel à un système de défense complexe : l'immunité acquise active, induite par contact des lymphocytes T avec les cellules présentatrices d'antigène de l'organisme, et l'immunité acquise passive, dirigée par les anticorps sécrétés par les lymphocytes B. Comme nous l'avons vu précédemment, RhoH intervient dans la régulation de processus cellulaires au cours de l'immunité innée. Cette protéine possède également un rôle dans les réactions immunitaires acquises.

1.3.3.1 Rôle de RhoH dans les lymphocytes B

Le rôle de RhoH dans la différenciation des cellules B a été étudié par cytométrie en flux dans la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques de souris *RHOH*^{-/-} âgées de 2 et 6 mois. Aucune altération aux différents stades du développement des cellules B de moelle osseuse n'a été observée entre les souris *RHOH*^{-/-} et les souris contrôle [9, 177]. Cependant, même si RhoH ne semble pas intervenir dans le développement des lymphocytes B, elle est importante pour la signalisation du BCR. En effet, sa surexpression dans la lignée cellulaire B Namalwa augmente le taux de protéines phosphorylées observées lors de l'activation du BCR, par des anticorps anti-IgM [201]. RhoH elle-même n'est pas phosphorylée dans les cellules B activées mais interagit directement avec de nombreuses protéines qui elles le sont ; elle s'associe de façon constitutive à PLC γ 2 et à SYK, uniquement lorsque cette dernière est activée suite à la stimulation du BCR. Ces données comparées à

celles décrites dans les mastocytes nous permettent d'observer un rôle commun de la protéine RhoH en tant que régulateur positif des voies de signalisation des récepteurs BCR et FcεRI, en interagissant avec PLCγ2 et SYK (*paragraphe 1.3.2.3 page 52*). Grâce aux techniques d'immuno-purification et de spectrométrie de masse, il a également été mis en évidence que RhoH interagit avec des protéines non phosphorylées dans les cellules Namalwa, indépendamment de la stimulation du BCR : ANKRD13, une protéine inconnue, α- et β-tubuline et ubiquitine [201]. L'association à l'ubiquitine suggère une dégradation de RhoH par la voie du protéasome. Ces résultats sont en accord avec ceux de Schmidt-Mende et collaborateurs, montrant que, suite à la stimulation du BCR, RhoH n'est pas dégradée par la voie des lysosomes [3].

Receemment, une équipe allemande s'est intéressée au rôle de RhoH dans la signalisation du récepteur à l'IL3 dans une lignée murine pro-B BaF3 [200]. L'IL3 est une cytokine qui stimule la différenciation des lymphocytes B et la sécrétion d'IgG par ces derniers [202]. Gündogdu et ses collaborateurs ont montré en surexprimant et invalidant RhoH, que celle-ci régule négativement les voies de signalisation en réponse à l'IL3, comme la voie JAK-STAT [200]. Une forte expression de RhoH entraîne une activation de STAT1, connue pour induire l'apoptose ou bloquer le cycle cellulaire. En présence de RhoH, une diminution de la prolifération est observée, associée à une augmentation des inhibiteurs des *Cyclin Dependent Kinases*, p21cip et p27kip. A l'inverse, l'invalidation de RhoH induit une augmentation de la croissance cellulaire dépendante de l'IL3, de l'activation de STAT5 et de la présence de l'IL3 récepteur alpha (CD123) [200].

Dans les lymphocytes B, RhoH présente donc des rôles différents selon la nature des voies de signalisation engagées. D'une part, elle semble importante pour l'activation du BCR ; d'autre part, elle régule négativement la prolifération cellulaire par activation des voies JAK-STAT. Les fonctions de RhoH dans les cellules B sont donc complexes et dépendent de facteurs encore inconnus à ce jour.

1.3.3.2 Rôle de RhoH dans les pathologies lymphoïdes B

Ces 15 dernières années, des altérations du gène *RHOH* ont été décrites, d'une part, lors de réarrangements chromosomiques dans des lymphomes non-Hodgkiniens de type B et d'autre part, dans deux leucémies B : la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie lymphoïde

chronique. Des hypermutations somatiques aberrantes (ASHM, *Aberrant Somatic HyperMutation*) du gène ont également été décrites dans de nombreux lymphomes.

1.3.3.2.1 Les hypermutations somatiques aberrantes du gène *RHOH*

Les hypermutations somatiques sont des processus physiologiques qui rendent possible la substitution nucléotidique dans les chaînes variables des immunoglobulines des cellules B du centre germinatif, ce qui permettra d'augmenter l'affinité d'un anticorps pour un antigène spécifique [203]. Ces hypermutations sont aussi retrouvées dans des gènes autres que les gènes des immunoglobulines, comme les proto-oncogènes *PIMI*, *MYC*, *PAX5* mais aussi *RHOH*. Ces gènes sont également impliqués dans des translocations chromosomiques suggérant que la présence d'hypermutations favoriserait la cassure des doubles brins d'ADN, induisant alors des réarrangements chromosomiques [204]. Les hypermutations somatiques aberrantes du gène *RHOH* ont été localisées principalement en aval de l'extrémité 3' de l'exon 4, sur environ 2000 nucléotides, mais quelques unes sont également présentes dans cet exon [151, 152, 158]. Cette région coïncide avec celle des points de cassures retrouvés chez des patients porteurs de la translocation chromosomique (3;4), déterminée au laboratoire (**données non publiées**). Ces mêmes hypermutations sont retrouvées dans de nombreux lymphomes non-Hodgkiniens tels que les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL, *Diffuse Large B Cell Lymphoma*), lymphomes très agressifs [205-213]. Dans 50% des DLBCL, des hypermutations aberrantes ont été retrouvées dans le gène *RHOH* [158]. Ces altérations augmentent avec la progression et la transformation des lymphomes, par exemple lors de la transformation du lymphome folliculaire et de la leucémie lymphoïde chronique en DLBCL [214-217]. Les lymphomes Hodgkiniens, dont les traitements sont efficaces, sont aussi la cible d'hypermutations somatiques aberrantes, cependant, le gène *RHOH* est faiblement muté dans ces pathologies [218]. Ces résultats suggèrent que les hypermutations du gène *RHOH* seraient plutôt présentes dans des types de lymphomes agressifs. Cependant, Hiraga et ses collaborateurs ont montré, par l'étude de 100 échantillons de patients atteints de DLBCL, non traités, que l'état hypermutationnel du gène *RHOH* n'est en fait pas corrélé avec la survie des malades et ne peut être utilisé comme marqueur pronostique [219]. D'autre part, aucune corrélation n'a été faite entre les niveaux d'expression de RhoH et la présence de ces mutations.

1.3.3.2.2 Les translocations chromosomiques impliquant le gène *RHOH*

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le gène *RHOH* subit des remaniements chromosomiques (translocations) dans certains lymphomes non-Hodgkiniens (LNH) folliculaires et dans un cas de myélome multiple [152]. Le lymphome folliculaire est une pathologie associée à une translocation (14;18)(q32;q21) primaire impliquant les gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines *IGH* en 14q32 et *BCL2* en 18q21, mais une autre anomalie chromosomique secondaire, la t(3;4)(q27;p13), impliquant les gènes *BCL6* (en 3q27) et *RHOH* (en 4p13) peut être retrouvée [220]. Par l'échange réciproque des régions 5' génomique et promotrice des deux gènes partenaires, *BCL6* et *RHOH*, la transcription de ces gènes est alors modifiée [152]. Cette altération de leur expression pourrait intervenir dans la progression des lymphomes folliculaires et être un marqueur pronostique pour les lymphomes folliculaires en transformation. Une autre translocation impliquant *RHOH* a été décrite dans un cas de myélome multiple, la t(4;14)(p13;q32), qui résulte en un réarrangement du gène *RHOH* avec le gène *IGH*. Cependant, le transcrit de fusion *IGH-RHOH* n'a pas pu être détecté [152]. Cette anomalie, translocation t(4;14), a également été décrite dans un cas de lymphome B de la zone marginale (*Nodal Marginal Lymphoma*) et dans des lymphomes spléniques [210, 221]. Bien qu'il s'agisse d'évènements rares, ces réarrangements impliquant le gène *RHOH* sont présents dans les pathologies B. Cependant, l'implication de ces remaniements dans l'expression du gène *RHOH* et dans le pronostic de ces maladies n'a pas encore été mis en évidence.

1.3.3.2.3 Rôle de RhoH dans deux leucémies chroniques de type B

1.3.3.2.3.1 Rôle de RhoH dans la leucémie à tricholeucocytes

La leucémie à tricholeucocytes ou HCL (*Hairy Cell Leukemia*) est une maladie rare représentant moins de 2% de l'ensemble des leucémies et dont la cause est inconnue. L'HCL touche principalement des hommes de plus de cinquante ans. Cette maladie est caractérisée par une infiltration de certains organes par les cellules leucémiques, principalement la moelle osseuse, le foie, la rate et le sang périphérique en moindre proportion. Les traitements actuels sont relativement efficaces cependant le taux de rechutes reste assez élevé du fait de la persistance des cellules leucémiques [222]. Les cellules tumorales ont un aspect « chevelu » dues à la présence de nombreuses expansions cytoplasmiques. Elles expriment fortement le marqueur de surface CD11c, une intégrine $\beta 2$ marqueur d'adhérence. Les lymphocytes malins

isolés de patients atteints de cette maladie présentent une expression du gène *RHOH* inférieure à celle des lymphocytes B normaux, répression plus modérée dans les lignées cellulaires modèles de l'HCL, comparées à d'autres lignées cellulaires provenant de lymphomes de Burkitt, plasmocytomes ou de leucémies lymphoblastiques aiguës des cellules T [223]. Aucune mutation n'a été observée au sein du gène *RHOH* dans la leucémie à tricholeucocytes, suggérant que cette répression serait due à des événements transcriptionnels. Le rôle physiopathologique de RhoH dans l'HCL a été étudié au laboratoire en collaboration avec le Dr Carl Simon Shelley (*Gundersen Lutheran Medical Foundation, La Crosse, WI*) [223]. En restituant l'expression de RhoH dans une lignée cellulaire modèle de la HCL, il a ainsi été observé une diminution de la prolifération, de l'adhésion homotypique et hétérotypique et de la migration transendothéliale, processus cellulaires impliqués dans la progression de la maladie. Par l'utilisation d'un modèle de xéno greffe, les auteurs ont également mis en évidence que la restitution de l'expression de RhoH contrecarrait le phénotype leucémique avec une diminution de la splénomégalie et de la taille des tumeurs [223]. Ces données suggèrent qu'une expression élevée de RhoH serait un facteur protecteur de la leucémie à tricholeucocytes chez la souris.

1.3.3.2.3.2 Rôle de RhoH dans la leucémie lymphoïde chronique

L'expression de RhoH dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) a également été étudiée. Cette maladie est une des leucémies les plus fréquentes chez l'adulte et pour laquelle les traitements ne sont pas efficaces [224, 225]. Cette pathologie est caractérisée par une expansion clonale, principalement dans le sang périphérique, mais aussi la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques de petits lymphocytes B matures, exprimant les marqueurs de surface CD19, CD23 et CD5. Sanchez-Aguilera et collaborateurs ont mis en évidence une expression de *RHOH* plus élevée de 2,3 fois dans les cellules tumorales de patients atteints de LLC comparées à des lymphocytes B isolés du sang périphérique de donneurs sains [226]. Les formes agressives de LLC sont associées à une absence de mutations somatiques des gènes des chaînes variables des immunoglobulines (IGVH), à une expression forte de la protéine ZAP70 (*Zetachain Associated Protein kinase 70*) et dans la majorité des cas, à une surexpression de l'oncogène *TCL1* (*T-Cell Leukemia/Lymphoma 1*) [227-230]. ZAP70 est une tyrosine kinase qui interagit avec RhoH dans les lymphocytes T et joue un rôle central dans la transduction du signal du TCR (*T Cell Receptor*). *TCL1* est une protéine associée au domaine *Pleckstrin Homology* des protéines de la famille AKT, ce qui favorise leur dimérisation et leur activité. Récemment, il a été montré qu'elle est impliquée dans les voies de signalisation du

BCR dans la LLC [231]. Ces données suggèrent que la surexpression de *RHOH* dans la LLC pourrait intervenir dans la transduction du signal du BCR dans ces cellules mais aussi dans la progression de la maladie.

Sanchez-Aguilera et ses collaborateurs ont étudié le rôle physiopathologique de RhoH dans la LLC en utilisant un modèle murin E μ -TCL1 exprimant l'oncogène TCL1 spécifiquement dans les cellules B, générant une forme de LLC non mutée et très agressive [232, 233]. Ces auteurs ont ainsi généré des souris transgéniques invalidées ou non pour le gène *RHOH* et de manière partielle ou totale. Les souris non invalidées pour *RHOH* (E μ -TCL1^{Tg}; *RHOH*^{+/+}) présentent un nombre anormalement élevé de cellules B leucémiques (CD5⁺), augmentant avec l'âge de la souris [226]. En revanche, l'inactivation partielle ou totale de *RHOH* dans les souris entraîne une diminution du nombre de ces cellules. Ces résultats montrent donc que la présence de RhoH est un facteur stimulant la prolifération des cellules LLC (CD5⁺) en présence de l'oncogène TCL1. Les auteurs ont également mis en évidence que la survie des cellules LLC (CD5⁺) présentes dans la rate est fortement réduite en absence de RhoH, résultats corrélés à une diminution de l'activation des protéines ERK1/2 et AKT. Toutes ces données suggèrent donc que RhoH aurait un rôle dans l'initiation et la progression de la LLC. De plus comme RhoH n'altère pas la différenciation des cellules B (*paragraphe 1.3.3.1 page 55*), elle pourrait constituer une cible intéressante dans cette pathologie. Nous pouvons également émettre l'hypothèse d'une relation existante entre la famille AKT et RhoH. D'une part, il semble que l'expression de RhoH soit positivement régulée dans les cellules B suite à l'activation des voies de signalisation de survie cellulaire par TCL1 ; d'autre part, en absence de RhoH, l'activation des protéines AKT est fortement diminuée.

RhoH a donc une fonction critique dans la progression de deux leucémies B : la leucémie lymphoïde chronique, où *RHOH* est surexprimé, et la leucémie à tricholeucocytes, où ce gène est au contraire réprimé. D'une part, RhoH est un régulateur positif de la signalisation du BCR et pourrait induire l'initiation et la progression de la LLC. Mais d'autre part, la restitution de son expression dans l'HCL contrecarre le phénotype leucémique avec une diminution des propriétés migratoires des cellules tumorales et de la splénomégalie. RhoH se situe donc à une frontière : non seulement, elle contrôle négativement les processus de prolifération et de survie cellulaires, mais elle les régule aussi positivement. Ces résultats suggèrent que l'expression de RhoH soit finement régulée dans les lymphocytes B.

Qu'en est-il du rôle de RhoH dans les lymphocytes T ? Dans les paragraphes suivants, nous décrirons le rôle crucial de RhoH dans le développement de ces cellules et lors de leur activation.

1.3.3.3 Rôle de RhoH dans les lymphocytes T

1.3.3.3.1 Rôle de RhoH dans le développement lymphocytaire T murin

Afin de comprendre le rôle physiologique de RhoH, deux équipes ont généré des souris invalidées pour le gène *RHOH* (*RHOH*^{-/-}) [173, 177]. Dorn et ses collaborateurs ont tout d'abord observé que l'absence de RhoH ne modifiait ni la fertilité, ni le poids, ni l'espérance de vie des souris [177]. En revanche, la numération des cellules du sang de souris *RHOH*^{-/-}, âgées de 2, 6 et 12 mois, a permis de montrer une lymphopénie T dans le sang périphérique, la rate et les ganglions lymphatiques, correspondant à une diminution de la quantité de cellules CD4⁺ ou CD8⁺ et à un arrêt du développement des lymphocytes T dans le thymus [173, 177]. En absence d'expression de *RHOH*, la différenciation des cellules T est bloquée au stade DN3 et une forte diminution de la prolifération des thymocytes DN4 est observée ainsi qu'une augmentation de leur apoptose (**Figure 10**, page 30) [173, 177]. *In vitro*, la population DN3 *RHOH*^{-/-} se différencie beaucoup moins en DN4 et DP, après 8 jours de culture en présence d'interleukine 7 et du ligand de la tyrosine kinase Flt3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) ; la différenciation de la population DN4 en DP est également fortement altérée [177]. En restituant l'expression de RhoH dans les souris *RHOH*^{-/-} par infection rétrovirale, on observe une restauration du système immunitaire : la quantité de cellules T matures CD4⁺ ou CD8⁺ est beaucoup plus importante dans la rate et les ganglions lymphatiques [173]. Ces résultats montrent que RhoH est impliquée dans le développement et la maturation des cellules T *in vitro* et *in vivo*. Les deux équipes ont également mis en évidence l'importance de RhoH dans la signalisation du TCR, par génération de souris transgéniques dont les thymocytes expriment un TCRαβ spécifique de l'ovalbumine ou d'un peptide de la glycoprotéine p14 du virus de la chorioméningite lymphocytaire. Ils ont ainsi observé que la population DP présente une expression réduite du TCRβ en absence de RhoH, suggérant donc que cette protéine est nécessaire à la signalisation du TCR lors de la sélection positive et de la maturation des cellules T [173, 177].

1.3.3.3.2 Rôle de RhoH dans la transduction du signal du TCR

L'activation du TCR nécessite la mise en place de complexes protéiques en aval de ce récepteur et entraîne des cascades de phosphorylation impliquant de nombreuses tyrosine kinases, telles que Lck et ZAP70 (Figure 23, ci-dessous).

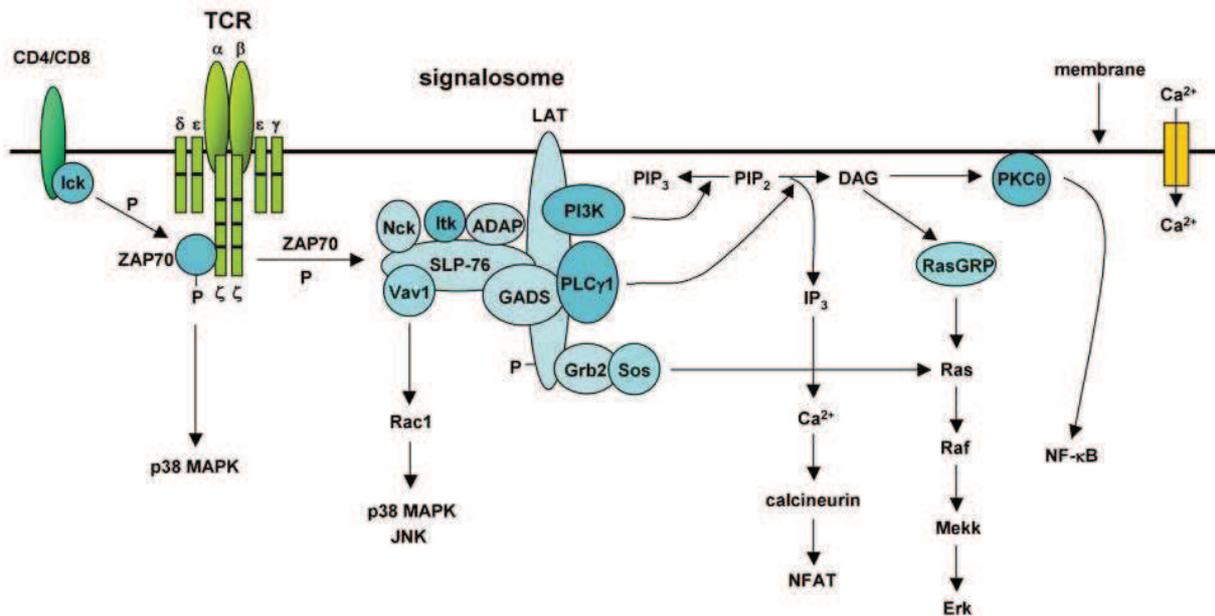


Figure 23 : Schématisation des voies de signalisation du TCR [9]. Suite à la stimulation du TCR par un ligand, les Src kinases Lck et Fyn sont activées et phosphorylent les motifs ITAM des protéines CD3 et TCR ζ . ZAP70 est alors activée par son recrutement sur ces motifs ITAM, phosphorylation par Lck et autophosphorylation. ZAP70 phosphoryle alors LAT et SLP76 entraînant la formation du complexe protéique, appelé signalosome de LAT, contenant les protéines PLC γ 1, Grb2, PI3K et Gads, et qui va alors induire des cascades de signalisation menant à l'activation de Erk, p38, JNK, NFAT et NFKB.

Lck est une tyrosine kinase de la famille des protéines Src spécifique des lymphocytes. Il s'agit d'un élément clé dans la signalisation du pré-TCR et du TCR : Lck est intégrée au complexe du TCR à la membrane plasmique pour former le module fonctionnel. Récemment, il a été montré dans la lignée lymphoïde T Jurkat, que RhoH régule l'activité de cette kinase [180]. RhoH est recrutée à la membrane par son motif CAAX et interagit avec Lck. Cette dernière est maintenue sous une forme inactive, phosphorylée par la kinase Csk, mobilisée elle aussi à la membrane par la protéine RhoH [180]. Dès que le TCR est activé, Lck est déphosphorylée conduisant à son activation et à son recrutement au sein du complexe du TCR [180]. Lck phosphoryle alors les motifs ITAMs de ses partenaires telles les chaînes CD3, les chaînes ζ du TCR et ZAP70 [234]. ZAP70 est une tyrosine kinase de la famille de

Syk ; elle est exprimée dans les lymphocytes T et les Natural Killer [235]. ZAP70 phosphoryle la protéine LAT et est associée à des molécules comme Slp76 et PLC γ 1. L'ensemble de ces protéines est crucial pour l'initiation des événements signalétiques en aval du TCR, tels que l'influx calcique et l'activation de ERK (*Extracellulaire signal-Regulated Kinase*) [236, 237]. Gu et ses collaborateurs ont décrit une diminution de la phosphorylation de ZAP70 suite à l'activation du TCR de thymocytes, en absence de RhoH [173]. De plus dans les mêmes conditions, la phosphorylation de LAT et de PLC γ 1 sur les résidus Y783 et Y319 (nécessaires à son activation) est réduite dans les thymocytes DP. Il en est de même de la phosphorylation de la protéine ERK et de l'influx calcique, qui sont alors fortement diminués dans les thymocytes DP, les CD4⁺ et les CD8⁺ [173, 177]. RhoH est donc une protéine importante dans la signalisation du TCR. Gu et ses collaborateurs ont également montré qu'en absence de RhoH la phosphorylation de Vav1 est réduite, diminuant ainsi son activité GEF, alors que celle de Vav2 reste inchangée. Après l'activation du TCR dans les thymocytes DP *RHOH*^{-/-}, en dépit de la diminution de l'activation de Vav1, les activités de Rac1, Rac2, p38 restent normales de même que l'activité d'AKT [173, 177].

Ces résultats sont à comparer à ceux de Li et de ses collaborateurs qui ont montré que, dans la lignée leucémique T Jurkat, RhoH inhibe l'activation de NF κ B induite par le TNF ou IKK (*I κ B Kinase*), diminue l'activation de p38 suite à la stimulation par le TNF et réduit l'activité de Rac1, RhoA et Cdc42 [104]. Il est à noter que dans les deux cas les stimulations utilisées sont différentes. De plus, Jurkat est une lignée cellulaire dérivée d'un patient atteint d'une leucémie aigue lymphoïde T et présente donc un stade de différenciation plus avancée que les thymocytes DP *RHOH*^{-/-}. Ces différences pourraient ainsi expliquer les fonctions opposées de RhoH dans les cellules T.

1.3.3.3 Les partenaires protéiques directs de RhoH dans la signalisation du TCR

La précipitation *in vitro* d'une protéine de fusion GST (*Glutathion S-Transférerase*)-RhoH mise en contact avec des extraits totaux de lysats de la lignée lymphoïde T Jurkat a permis de mettre en évidence une interaction directe entre RhoH et ZAP70, RhoH e Lck [173, 180]. Ces associations existent en l'absence de stimulation dans la lignée Jurkat mais l'interaction entre RhoH et ZAP70 est fortement accentuée par l'activation de la protéine Lck suite à la stimulation du TCR par un anticorps anti-CD3 ϵ . De manière intéressante, cette interaction fait intervenir la phosphorylation d'une tyrosine de la protéine RhoH, modification

décrite pour la première fois pour une petite GTPase de la famille Rho [173]. L'équipe de Gu a également mis en évidence la fixation de RhoH sur les protéines phosphorylées p21 ζ et p23 ζ composant le CD3 ζ suite à l'activation du TCR. De plus, la phosphorylation de ces protéines dépend également de la présence de RhoH.

ZAP70 reconnaît par ses deux domaines SH2 les motifs ITAM de ses partenaires protéiques [238]. Les protéines RhoH humaines et murines présentent une séquence similaire aux motifs ITAM, entre les résidus 73 et 86 (paragraphe page). Dans des cellules HEK293, l'utilisation de mutants a permis de montrer que l'interaction entre RhoH et ZAP70 nécessite la présence du motif ITAM de la protéine RhoH et des deux domaines SH2 de ZAP70 [173]. Cette association dépend également de domaines de la protéine RhoH non identifiés à ce jour. Les auteurs ont également confirmé l'importance du domaine ITAM dans les fonctions de RhoH *in vivo* : l'expression d'un mutant RhoH dépourvu de motif ITAM ne permet ni de lever le blocage du développement thymique observé dans les souris *RHOH*^{-/-}, et ce contrairement à la protéine native ; ni de restaurer le recrutement de ZAP70 à la synapse immunologique lors de l'activation du TCR [173]. L'utilisation de mutants de Lck a permis de montrer que les domaines SH2 et SH3 de cette dernière sont importantes dans l'interaction entre RhoH et Lck [180]. En reprenant certains résultats et sur la base de la publication de Ridley et de ses collaborateurs, nous avons pu obtenir un modèle simplifié de l'action de RhoH dans la signalisation du TCR (**Figure 24**, ci-dessous).

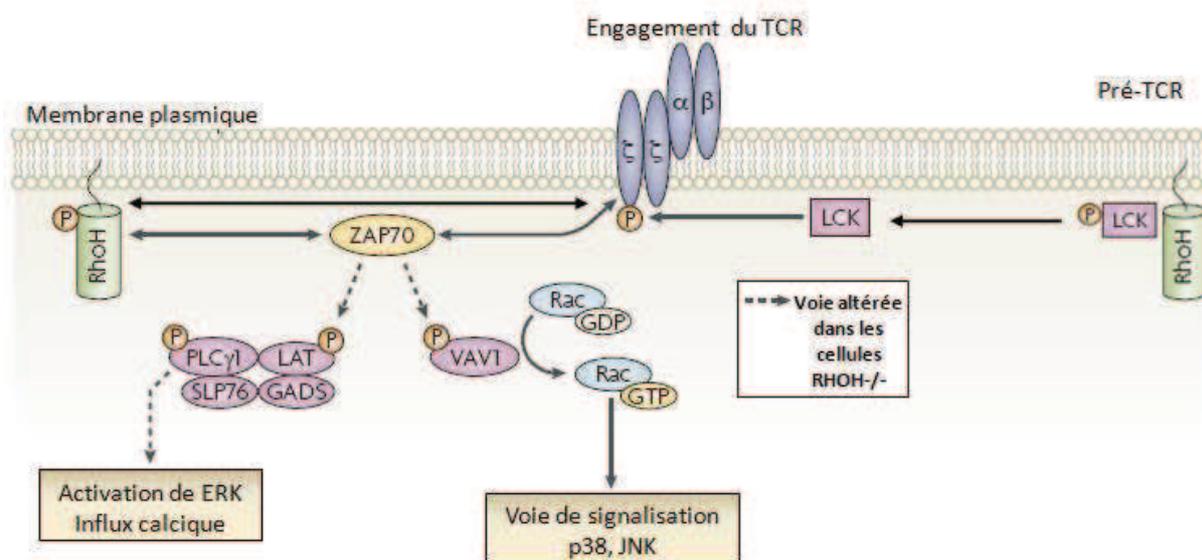


Figure 24 : Représentation de l'action de RhoH dans l'activation du TCR [13]. Mécanisme proposé entre RhoH et le complexe du TCR activé. Les motifs ITAM-like de RhoH sont impliqués dans l'interaction de la protéine avec ZAP70 et dans le recrutement de celle-ci au TCR. Le complexe active alors les voies de signalisation en aval, comme le signalosome de LAT.

1.3.3.3.4 Dégradation de la protéine RhoH lors de l'activation lymphocytaire T

Plusieurs études ont montré l'implication de RhoH dans le développement thymique et dans la signalisation du TCR impliqué dans la sélection positive des lymphocytes T. Tous ces événements nécessitent une régulation fine de différents processus moléculaires, telle la formation des complexes protéiques couplés au TCR permettant un contrôle de l'activation. Une des protéines du complexe du TCR, ZAP70, est dégradée dans le cytoplasme par les calpaïnes après 2 heures de stimulation des cellules T par les cellules présentatrices d'antigène [239]. La stimulation de lymphocytes T isolés de sang périphérique humain et mis en contact avec un anticorps anti-CD3 ϵ induit une diminution de la quantité de protéine RhoH et des protéines CD3 ϵ et CD3 ζ suggérant leur dégradation. L'utilisation d'inhibiteur de pompe à proton, la bafilomycine A1, résulte en une augmentation des protéines CD3 ϵ et CD3 ζ , suggérant qu'elles soient dégradées par la voie lysosomale [240, 241]. De même, l'expression de RhoH est augmentée en présence de cet inhibiteur. RhoH est donc dégradée par la voie lysosomale suite à l'activation du TCR par un anticorps anti-CD3 ϵ [3]. Ce phénomène n'est pas observé pour des temps courts de stimulation (10 minutes) mais plutôt après 4 et 8 heures de stimulation. La dégradation de RhoH n'est pas spécifique d'une sous-population T (CD4 $^+$ ou CD8 $^+$) et ce mécanisme de régulation est également observé dans la lignée lymphoïde T Jurkat. La réponse fonctionnelle des cellules T peut être reproduite suite à la stimulation du TCR par l'action combinée du PMA (*Phorbol-12-Myristate-13-Acétate*), analogue du diacylglycérol et de la ionomycine, ionophore pour le calcium, ou par la molécule PHA (*PhytoHémAgglutinine*). Cependant, la dégradation par voie lysosomale des protéines RhoH, CD3 ϵ et CD3 ζ n'est pas observée après stimulation des lymphocytes T par ces molécules [3].

RhoH est une protéine du complexe du TCR. Sa phosphorylation est cruciale pour son interaction avec ses partenaires protéiques au sein de ce complexe. Suite à l'activation du TCR, RhoH est transportée par les endosomes pour être dégradée par les lysosomes. Ces résultats mettent en évidence la nécessité d'une régulation stricte de RhoH, ne faisant pas intervenir de déphosphorylation mais directement sa dégradation. Le fait que les molécules de synthèse ne reproduisent pas le même phénomène, pourrait être dû à la nature des voies de signalisation activées.

1.3.3.3.5 Rôle de RhoH dans l'adhésion et la migration des cellules T

Il y a quelques années, il a été décrit que RhoH inhibe les propriétés d'adhérence de l'intégrine LFA1 dans un modèle de lignée lymphoïde T Jurkat, J+hi1.14, contenant deux insertions virales : l'une, dans un gène situé en 12q24 correspondant à une protéine hypothétique similaire à une sous-unité de l'ATPase mitochondriale et à la chondroïtine 4 sulfotransférase, et l'autre dans le gène *RHOH* [242]. Cette seconde insertion entraîne une diminution de l'expression transcriptionnelle de *RHOH*. Ce modèle cellulaire J+hi1.14 est caractérisé par la capacité d'adhérer à la protéine ICAM (*Intercellular Adhesion Molecule-1*), dépendante de la présence à la membrane cellulaire de l'intégrine $\beta 2$ LFA1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*). Lisa Cherry et ses collaborateurs ont montré que l'expression ectopique de RhoH dans ces cellules permet d'inverser le phénotype et inhiber cette adhésion [242]. Plus récemment, Dorn et ses collaborateurs ont montré que l'adhérence des thymocytes murins sur ICAM1 par l'intermédiaire de LFA1 n'est pas régulée par RhoH [177]. De même, les lymphocytes du sang périphérique humain adhèrent aux cellules endothéliales surexprimant ICAM1 et VCAM1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) en présence de TNF, indépendamment de RhoH. Cette adhésion est inhibée par des anticorps anti-LFA1 ou anti-intégrine $\alpha 4$. Ces dernières données montrent que dans les thymocytes murins et les lymphocytes T humains, RhoH n'est pas indispensable dans les propriétés d'adhérence cellulaire faisant intervenir les intégrines $\beta 2$ et $\alpha 4$ et la protéine ICAM1 [177]. Ainsi selon l'état d'activation des cellules T et selon les signaux extracellulaires, RhoH régulerait ou non les processus d'adhérence.

Wang et ses collaborateurs ont montré que la migration de la lignée cellulaire Jurkat induite par SDF1 α requiert la présence de RhoH [180]. D'une part, cette protéine réprime la migration en réponse à de faibles doses de SDF1 α (10ng/ μ L) ; d'autre part, elle l'induit à de fortes concentrations en SDF1 α (100-300ng/ μ L). La migration des cellules Jurkat nécessite la présence de Pak1. A de fortes concentrations en SDF1 α , l'interaction de RhoH avec Pak1 augmente l'activité de cette dernière. A de faibles doses en SDF1 α , la présence de RhoH inhibe l'activation de la protéine ITK, qui intervient également dans la migration cellulaire de la lignée lymphoïde T Jurkat [180]. Ces résultats suggèrent que RhoH joue un rôle de régulateur négatif dans les cellules quiescentes et contribue à l'inhibition de leur adhérence. En conditions de stimulation, à des concentrations élevées en SDF1 α , le signal doit être suffisamment fort pour activer les processus cellulaires et lever le blocage induit par RhoH.

Celle-ci active alors les voies de signalisation de Pak1 et aurait un rôle de régulateur positif. En régulant ainsi de manière très fine la migration cellulaire, RhoH contribuerait à l'ajustement de la réponse cellulaire aux stimuli extracellulaires.

1.3.3.4 Rôle de RhoH dans les pathologies lymphoïdes T

Aucune pathologie impliquant des lymphocytes T et impliquant RhoH n'a été décrite dans la littérature. En collaboration avec le Dr Carl Simon Shelley, il a été mis en évidence au laboratoire que la leucémie T de l'adulte ou ATL (*Adult T cell Leukemia*) présente des altérations de l'expression du gène *RHOH*. Lors d'une étude préliminaire sur une dizaine de patients, trois catégories de patients ont été mises en évidence : la première présente une expression de *RHOH* 3.5 fois inférieure à celle retrouvée dans les lymphocytes T de patients sains ; la seconde, au contraire, une expression de ce gène 2.5 fois plus élevée, et la troisième, une expression similaire. Cette variation de l'expression de *RHOH* n'a pas pu être corrélée aux différents stades de la pathologie. Cette hétérogénéité d'expression n'a pas été retrouvée dans les quatre lignées cellulaires modèles de l'ATL étudiées. Celles-ci sont caractérisées par une importante répression des transcrits *RHOH*, comparativement à d'autres lignées T, et correspondraient à des modèles de la première catégorie de patients. Notre hypothèse est qu'une altération de l'expression de RhoH (augmentation ou diminution) pourrait être impliquée dans la progression de la maladie. La leucémie T de l'adulte est caractérisée par une prolifération aberrante de cellules T matures pouvant envahir des organes périphériques tels que le foie et la rate [243]. Pour les deux formes de leucémie T de l'adulte, type aigu et lymphomateux, la maladie se manifeste par une inflammation des ganglions lymphatiques et par des lésions osseuses et viscérales, avec infiltration massive de cellules tumorales circulantes dans les tissus. Malgré le nombre de traitements mis en place, ces deux types d'ATL restent de très mauvais pronostic avec des espérances de vie très faibles : de 6 à 10 mois pour la forme aiguë et environ 4 ans pour le type lymphomateux [243-246]. La leucémie T de l'adulte est fréquente dans certaines parties du monde telles que le Japon, les Caraïbes, les Antilles, l'Afrique Centrale et l'Amérique du Nord [243, 245]. Dans cette pathologie, les cellules en prolifération sont des lymphocytes T *Helper* CD4⁺ présentant des marqueurs d'activation lymphocytaire (CD25 et CD11c). Compte tenu des différentes fonctions de RhoH dans les processus cellulaires T, l'altération de l'expression du gène *RHOH* pourrait promouvoir les potentiels de croissance et d'invasivité des cellules tumorales et ainsi contribuer à la progression de la maladie.

1.4 Tableau récapitulatif des fonctions de RhoH et des protéines Rho dans le système hématopoïétique

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des fonctions de RhoH et des protéines Rho dans le système hématopoïétique

Cellules souches et progéniteurs (HSC/Ps)	
RAC1 ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> ↓ régulation, survie, prolifération de HSC/Ps (cKit) ↓ localisation des HSC/Ps dans la moelle osseuse ↓ migration et prolifération des HSC/Ps dans la moelle osseuse
RAC2 ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> ↓ maintien des HSC/Ps dans la moelle osseuse ↓ prolifération des HSC/Ps ↑ proapoptose des HSC/Ps
CDC42 ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> ↓ trafic, maintien, adhésion et migration HSC/Ps dans la moelle osseuse ↑ activité du cycle cellulaire dans HSC/Ps ↓ quiescence des HSCs ↑ nombre et mobilisation des HPs
RHOA ^(DN)	<ul style="list-style-type: none"> ↑ maintien des HSC/Ps dans la moelle osseuse
RHOH ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> ↑ activité du cycle cellulaire dans HSC/Ps
RHOH ⁺	<ul style="list-style-type: none"> Altération du système hématopoïétique ↓ prolifération des HSC/Ps (+ SCF, SDF1α) ↑ apoptose des HSC/Ps
Progéniteurs et cellules myéloïdes	
RAC1 ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> ↓ prolifération des progéniteurs myéloïdes (+ SCF)
RAC2 ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> ↑ apoptose dans progéniteurs myéloïdes (+SCF)
CDC42 ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> <i>in vivo</i> : monocytose, neutrophilie, éosinophilie, développement d'un syndrome myéloprolifératif fatal ↑ GMP, myélocytes, métamyélocytes, monocytes, neutrophiles dans la moelle osseuse et la rate infiltration des cellules myéloïdes dans le foie et les poumons
RHOH ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> ↑ des érythroblastes dans la rate ↓ dégranulation des mastocytes ↓ signalisation du récepteur FcϵRI des mastocytes ↓ flux calciques, activation de PLCγ1, PLCγ2, LAT, SLP76, SYK et production de IL6 et TNFα dans les mastocytes
RHOH ⁺	<ul style="list-style-type: none"> ↓ production de leucotriène dans les neutrophiles (par activation de PKC, p38, PI3K)

Progéniteurs et cellules lymphoïdes B

RAC1 ^{-/-}	pas d'altération du développement, ni activation, ni migration des LB
RAC2 ^{-/-}	↓ nombre de LB dans la zone marginale de la rate présence de LB folliculaires dans la rate ↓ formation de synapse immunologique des LB (intégrines β) ↓ réponse immunologique lymphoïde B indépendante des LT
RAC1 ^{-/-} , RAC2 ^{-/-}	Arrêt du développement des LB dans la rate
RHOG ^{-/-}	↑ modérée de la réponse immunitaire humorale ↑ prolifération des LB ↑ activation du BCR dans LB
RHOA ^{-/-}	↓ production de InsP3 suite à l'activation du BCR dans LB ↓ flux calciques dans LB ↓ prolifération des LB
RHOC ^{-/-}	pas d'altération du développement, ni activation, ni migration des LB
RHOH ^{-/-}	pas d'altération du développement, ni activation, ni migration des LB ↑ croissance cellulaire des LB ↑ activation de STAT5, expression de IL3 récepteur α à la surface des LB
RHOH ⁺	↑ activation du BCR dans LB ↑ activation de STAT1, p21 ^{oip} et p27 ^{kip} dans LB ↓ prolifération des LB

Progéniteurs et cellules lymphoïdes T

Rac1 ^{+(MCA)}	↓ nombre de thymocytes DP dans le thymus
RhoA ^{+(MCA)}	↑ sélection des thymocytes CD8⁺/CD4⁻ ↑ signalisation du TCR dans LT ↑ adhérence des thymocytes et LT
Rac2 ^{+(MCA)}	↑ apoptose des thymocytes SP ou DP
RAC2 ^{-/-}	Arrêt de la différenciation lymphoïde T (T Helper 1) ↓ partiel de l'activation du TCR dans LT ↓ prolifération lymphoïde T ↓ flux calciques dans LT ↓ activation Erk1/2 et p38 dans LT ↓ production INFγ dans LT ↓ production de CCL19 et CCL21 dans LT ↑ apoptose des thymocytes SP ou DP
RHOC ^{-/-}	pas d'altération du développement, ni activation, ni migration des LT

***RHOH*^{-/-}**

↓ **cellules T** dans le sang périphérique, la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques

Arrêt de la **différentiation lymphoïde T (DN3)**

↑ apoptose des **thymocytes DN4**

↓ **différenciation des thymocytes** des stades DN3 en DN4 et DN4 en DP

↓ expression de TCRβ dans les **thymocytes DP**

↓ phosphorylation de ZAP70 après activation du TCR dans les **thymocytes DP**

↓ phosphorylation de LAT, PLCγ1, ERK, Vav1 après activation du TCR dans les **thymocytes DP**

↓ flux calciques dans thymocytes **DP**, **CD4⁺ SP** et **CD8⁺ SP**

pas de modification de l'activité de Rac1, Rac2, p38 et Vav2

HSC/Ps : Cellules Souches / Progéniteurs Hématopoïétiques ; HSCs : Cellules Souches Hématopoïétiques ;
HPs : Progéniteurs Hématopoïétiques ; DP : Double Positif ; SP : Simple Positif ; LB : Lymphocytes B ; LT :
Lymphocytes T. MCA : Mutant Constitutivement Actif

2 Objectifs

RhoH est une petite protéine G de la famille Rho, constitutivement activée. Cette protéine, exclusivement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, joue un rôle dans le développement du système immunitaire : croissance des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques, différenciation des lymphocytes T et signalisation des récepteurs TCR, BCR et FcεRI, respectivement dans les cellules T, B et les mastocytes. RhoH est également impliquée dans la progression de certaines leucémies, telles la leucémie lymphoïde chronique et la leucémie à tricholeucocytes. Il a également été montré que, pour un même type cellulaire, RhoH peut présenter des rôles antagonistes selon les stades de différenciation ou les stimuli extérieurs rencontrés. Ceci suggère que la protéine RhoH soit finement régulée au cours de la différenciation et de l'activation des différents lignages hématopoïétiques.

De nombreux travaux ont récemment décrit le rôle de RhoH dans certaines voies de signalisation, ses partenaires protéiques dans les lymphocytes B et T et certains mécanismes impliqués dans la régulation de cette protéine. L'expression de RhoH est tout d'abord contrôlée par des événements transcriptionnels, tels qu'il l'a été décrit dans l'HCL, puis par des mécanismes de dégradation, telle la voie des lysosomes dans les lymphocytes T activés. Dans ces cellules T, l'activation de RhoH dépend de la phosphorylation d'au moins une de ses tyrosines. Les kinases responsables et la ou les tyrosine(s) impliquée(s) n'ont pas encore été décrites à ce jour. Cette phosphorylation, qui représente une modification spécifique de RhoH au sein de la famille Rho, pourrait être la cible d'agents thérapeutiques afin de contrôler les fonctions de cette protéine. Une seconde approche serait de connaître mieux les facteurs protéiques régulant la transcription de *RHOH*. En modulant leur expression, son action pourrait ainsi être contrôlée.

Au laboratoire, notre équipe a mis en évidence une dérégulation de la transcription du gène *RHOH* dans la leucémie à tricholeucocytes (HCL) et dans la leucémie T de l'adulte (ATL), résultant d'une répression des transcrits initiés en amont de l'exon 4. Ces deux maladies sont caractérisées par une prolifération anormale de cellules matures activées, soit de

type B pour l'HCL, soit de type T pour l'ATL. Dans l'HCL, l'expression ectopique de la protéine RhoH conduit à une diminution du phénotype leucémique dans un modèle murin de xénotgreffe, avec réduction de la prolifération cellulaire, de la splénomégalie et de la taille des tumeurs. Ces données suggèrent que si nous parvenions à restituer l'expression de la protéine endogène par contrôle de la transcription du gène *RHOH*, nous pourrions peut être contrecarrer la progression de l'HCL. Notre objectif a donc été tout d'abord d'étudier la régulation du gène *RHOH* et les voies de signalisation induites par la protéine au cours de l'activation lymphocytaire B et T. En comprenant mieux ces mécanismes, nous pourrions mettre en évidence les facteurs responsables de la dérégulation du gène observée dans les deux pathologies HCL et ATL. Ces résultats permettraient d'apporter de nouvelles connaissances sur la régulation de *RHOH* dans les lymphocytes, mécanismes encore inconnus à ce jour, mais aussi de proposer de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de ces deux maladies.

Afin de mettre en évidence certains mécanismes de régulation du gène *RHOH* dans les lymphocytes B et T, il était important d'étudier tout d'abord le profil d'expression des transcrits *RHOH* dans les cellules B et T. Ceci nous a permis de mettre en évidence que la région promotrice principalement active dans ces cellules est située en amont de l'exon 4 et correspond au promoteur P3 (**section 4.1**, pages 103 à 110). Nous avons par la suite cherché à identifier des facteurs de transcription contrôlant l'activité de cette région promotrice lors des phénomènes d'activation des lymphocytes B et T. La section **4.2** (pages 110 à 151) concerne donc l'identification de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de *RHOH* dans les cellules B. Sur la base de ces données, nous avons essayé de mettre en évidence des mécanismes moléculaires impliqués dans la faible expression du gène *RHOH* dans la leucémie B, HCL (**section 4.2.2**, pages 141 à 151). Dans la **section 4.2.3** (pages 152 à 168), nous décrivons les résultats obtenus lors de l'étude des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de *RHOH* dans les cellules T et dans la dérégulation de ce gène dans la leucémie T ATL.

Parallèlement à cela, il nous est apparu important d'identifier les voies de signalisation induites par l'expression de RhoH dans les cellules B, T, mais aussi myéloïdes. Ces résultats pourraient nous permettre de comprendre les événements signalétiques, conséquence de la faible expression de RhoH dans trois leucémies : la leucémie à

tricholeucocytes, la leucémie T de l'adulte et la leucémie aigue myéloïde. En exprimant de manière ectopique cette protéine dans deux modèles cellulaires, l'un de type B et l'autre de type T, caractérisés par une faible expression de ce gène, ou en induisant l'expression de *RHOH* dans des cellules mononucléées provenant de patients atteints de leucémie aigue myéloïde, nous avons ainsi mis en évidence un effecteur protéique de RhoH dans les cellules B (**section 4.3.1**, pages 168 à 172) et identifié de nouvelles cibles potentielles de cette protéine dans les lymphocytes T (**section 4.3.2**, pages 172 à 184).

De plus, notre étude nous a amenés à nous intéresser aux leucémies aigues myéloïdes et à la faible expression du gène *RHOH* dans ces cellules. Dans une dernière partie, nous décrivons les résultats des expériences réalisées au laboratoire, dans lesquelles nous parvenons à augmenter le taux de transcrits *RHOH* en modulant l'expression d'un facteur de transcription, JunD, dont nous montrons l'implication dans la régulation du gène *RHOH* dans les cellules lymphoïdes B. Une des cibles potentielles de RhoH mise en évidence dans les cellules B, *PRKCA*, est également modulée dans ces expériences. Ces résultats sont présentés dans la **section 4.4** (pages 184 à 189). Ces données suggèrent l'existence d'une boucle de régulation possible entre JunD et RhoH dans les cellules de LAM, menant ainsi à une modulation de l'expression de *PRKCA*.

3 Matériel et Méthodes

3.1 Méthode de culture cellulaire

3.1.1 Les lignées cellulaires

Nous disposons au laboratoire de lignées cellulaires lymphoïdes T, Jurkat et KK1 ou B, Raji, Daudi, Namalwa, JOK-1, HC-1, Eskol, EH, et de lignées épithéliales, telle que HeLa.

3.1.1.1 Les lignées cellulaires lymphoïdes T

3.1.1.1.1 Lignée modèle des cellules T pour l'étude de la régulation du gène *RHOH*

La lignée cellulaire Jurkat est utilisée comme modèle pour l'étude du gène *RHOH* dans les lymphocytes T en parallèle de cellules T provenant du sang périphérique fraîchement prélevé de volontaires sains. Cette lignée a été établie par Schneider et ses collaborateurs en 1976 à partir du sang périphérique d'un jeune garçon de 14 ans, atteint d'une leucémie lymphoblastique aigue T ou T-ALL (*Acute Lymphoblastic Leukemia*) [247]. Il s'agit d'une leucémie caractérisée par la prolifération anormale de cellules immatures touchant principalement les sujets jeunes. La lignée cellulaire Jurkat est caractérisée par l'expression des marqueurs de surface CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD5⁺, CD6⁺, CD7⁺, TCRαβ⁺, TCRγδ⁺ et l'absence de CD8⁻, CD13⁻, CD19⁻.

3.1.1.1.2 Lignée modèle des cellules T pour l'étude du rôle physiologique de RhoH

La lignée cellulaire KK1 est caractérisée par une expression faible de RhoH et sert de modèle pour l'étude des voies de signalisation induites suite à l'expression ectopique de RhoH. KK1 est une lignée dérivée à partir des cellules d'un patient (KK) atteint de la leucémie T de l'adulte (ATL). L'ATL est une maladie rare hautement agressive sans caractéristiques histologiques excepté un phénotype de cellules T matures activées. La cause de la pathologie est une infection par le virus HTLV-I (*Human T cell Leukemia/Lymphotropic Virus Type I*). Les cellules KK1 présentent le phénotype CD3^{+/+}, CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ et TCRβ⁺ [248].

3.1.1.2 Les lignées cellulaires lymphoïdes B

3.1.1.2.1 Lignées modèles des cellules B pour l'étude de la régulation du gène *RHOH*

Les lymphocytes B frais ne représentent que 5-20% des cellules provenant du sang périphérique. Afin d'étudier la régulation du gène *RHOH* dans les lymphocytes B par des techniques de biologie moléculaire, nous avons choisi d'utiliser, comme modèles d'étude, les lignées cellulaires Raji, Daudi et Namalwa. Ces dernières ont toutes été générées à partir de patients atteints de lymphome de Burkitt et expriment des taux relativement élevés du gène *RHOH* [223]. Le lymphome de Burkitt a été découvert en Afrique tropicale et observé sous tous les climats, avec un âge de prédilection pour les enfants et les jeunes patients. Ce lymphome est majoritairement caractérisé par la présence de la translocation chromosomique t(8;14)(q24;q32) [249].

3.1.1.2.2 Lignées modèles de la leucémie à tricholeucocytes (HCL)

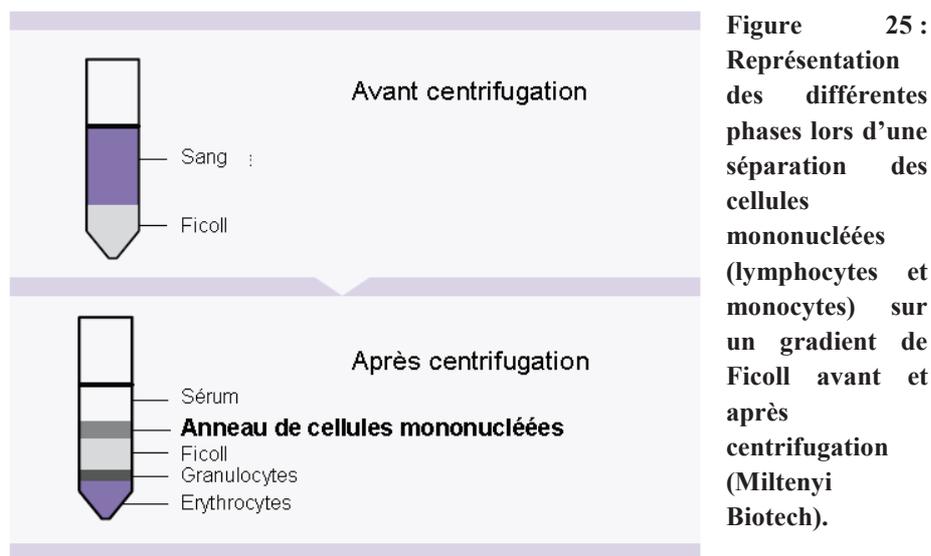
Les lignées cellulaires EH, Eskol, HC-1, JOK-1 et Mo sont issues de patients atteints de la leucémie à tricholeucocytes ou, dans le cas de la lignée Mo, du variant de cette maladie et sont utilisés comme modèles de l'HCL dans notre étude. Les cellules HCL sont caractérisées par l'expression des marqueurs CD19⁺, CD20⁺, CD11c⁺, CD25^{+/-}, CD103⁺, DBA44⁺ et une activité phosphatase-acide-tartrate résistante (TRAP). Les cellules Mo proviennent d'un homme atteint de l'HCL et présentent des caractéristiques phénotypiques de lymphocytes T. Il s'agit d'un variant de la leucémie à tricholeucocytes (HCL-V), pathologie encore plus agressive. La lignée Mo contient des insertions virales du génome HTLVII et exprime la chaîne β du récepteur à l'interleukine 2 mais pas la chaîne α (CD25) [250, 251].

3.1.1.3 La lignée cellulaire épithéliale HeLa

La lignée cellulaire HeLa n'exprime pas les transcrits *RHOH* et est donc utilisée dans notre étude comme lignée contrôle négative pour l'étude de l'activité du promoteur P3 du gène *RHOH*. Ces cellules proviennent d'un prélèvement de métastase chez une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus et décédée en 1951 [252].

3.1.2 Isolement et purification des lymphocytes T

Les lymphocytes T ont été isolés à partir de sang périphérique humain provenant de donateurs volontaires sains. Le sang est prélevé dans des tubes supplémentés d'anticoagulant EDTA (*acide Ethylène Diamine Tétra Acétique*). La séparation des cellules mononucléées est réalisée par centrifugation sur un gradient de Ficoll. Le sang est tout d'abord dilué au tiers avec du Dulbecco's PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (Invitrogen), puis déposé doucement sur un gradient de Pancol (PanBiotech) dans des proportions 2 v/v. L'ensemble est alors centrifugé durant 30 min à 400 g sans accélération ni frein. Cette centrifugation permet d'obtenir un anneau de cellules mononucléées à l'interface du Ficoll, contenant les lymphocytes et les monocytes et du sérum (**Figure 25**, ci-dessous). Le prélèvement de cet anneau est effectué précautionneusement après avoir délicatement ôté le sérum.



La purification des lymphocytes T à partir des cellules mononucléées est effectuée par déplétion de ces cellules, en suivant les instructions du kit *Pan T cell Isolation Kit II* humain (Miltenyi Biotech). Il s'agit d'un système de marquage magnétique indirect qui permet la purification des lymphocytes T du sang périphérique humain sans les marquer. Les cellules mononucléées sont lavées deux fois par du tampon *Running Macs Buffer* (PBS supplémenté par 0.5 % de BSA *Bovin Serum Albumin* et en EDTA, Miltenyi Biotech) et centrifugé 10 min à 300 g avec accélération et frein. Les cellules sont ensuite reprises par du tampon et le nombre de leucocytes est évalué. Après centrifugation, les cellules sont reprises

par 40 μL de tampon *Running Macs Buffer* / 10^7 cellules. Les cellules contaminantes, lymphocytes B, NK, cellules dendritiques, monocytes, granulocytes et les érythrocytes, sont ensuite marquées directement par un ensemble d'anticorps conjugués à la biotine, anticorps ciblant les protéines de surface CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 et la glycophorine A (10 μL d'anticorps / 10^7 cellules) puis incubées durant 10 min à 4 °C. Ensuite du tampon *Running Macs Buffer* et les billes couplées aux anticorps anti-biotine sont ajoutées (respectivement 30 μL / 10^7 cellules, 20 μL / 10^7 cellules) et l'ensemble est incubé 15 min à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées par du tampon et centrifugées 10 min à 300 g puis reprises par 500 μL de tampon et déposées sur une colonne magnétique de type LS (Miltenyi Biotech), préalablement équilibrée par 3 mL de tampon. Les cellules non retenues sur les colonnes LS (les lymphocytes T) sont éluées par la gravité. Chaque colonne est ensuite lavée 3 fois par 3 mL de tampon. Les lymphocytes T récupérés sont ensuite comptés, centrifugés et mis en culture. La pureté de la population est évaluée par cytométrie en flux, en mesurant le pourcentage de cellules exprimant le CD3 à leur surface.

3.1.3 Isolement des cellules mononucléées provenant du sang périphérique de patients atteints de leucémie aigue

Les cellules blastiques ont été isolées du sang périphérique provenant de patients atteints de leucémie aigue myéloïde ou de leucémie aigue lymphoblastique (de type T ou B) (**Tableau 1**, Annexe 1). Le sang est prélevé dans des tubes supplémentés d'anticoagulant EDTA. La séparation des cellules mononucléées est réalisée, comme décrit précédemment, par centrifugation sur un gradient de Ficoll humain. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois par du PBS et leur nombre est évalué. Une partie des blastes est alors congelée dans des tubes de cryogénéisation à raison de 30-100.10⁶ cellules / tube dans un mélange composé de 90 % de SVFd et 10 % DMSO. Le reste est préparé pour la transfection transitoire d'ARN interférents pour l'étude de la régulation du gène *RHOH*. Pour cela, une lyse des hématies est effectuée par le tampon de lyse (*Cell Lysis Buffer*, BD Biosciences), à raison de 15 mL pour 5.10⁸ cellules mononucléées et par une incubation à température ambiante durant 15 min et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite diluées dans du PBS puis centrifugées à 1200 rpm durant 8 min. Les cellules sont lavées une seconde fois par du PBS et comptées. Elles sont ensuite transfectées par les ARN interférents par la méthode Amaxa (Lonza Group LTD). Après 48 H de culture, les cellules sont alors récupérées et mises en présence de tampon de

lyse pour extraction d'ARN (*paragraphe 3.3.1 page 80*). Le pourcentage de la population cellulaire CD34⁺ est estimé par cytométrie en flux.

Dans le cas de prélèvements congelés (cellules purifiées par un gradient de Ficoll et congelées comme décrit précédemment), le culot cellulaire congelé est repris par 10 mL de milieu préchauffé à 37 °C et les cellules sont centrifugées à 1200 rpm durant 10 min. Elles sont de nouveau reprises dans du milieu et leur nombre est évalué. Pour améliorer la viabilité des cellules et l'efficacité de transfection, ces dernières sont mises en culture 2 H à la concentration de 1.10^6 cellules / mL, avant transfection (méthode Amaxa). Le pourcentage de la population cellulaire CD34⁺ (ou blastes) a également été estimé par cytométrie en flux (**Tableau 1**, Annexe 1).

3.1.4 Culture cellulaire

Les lignées cellulaires Jurkat, EH, Eskol, JOK-1, HC-1, Daudi et Namalwa sont cultivées en milieu GIBCO™ RPMI Medium 1640 contenant de la L-Glutamine (Invitrogen) complémenté par 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVFd) et 1 % de pénicilline / streptomycine (Invitrogen). Le milieu de culture de la lignée KK1 contient de plus de l'interleukine 2 recombinante humaine (100 U/mL). Les cellules Raji sont mises en culture dans du milieu GIBCO™ RPMI Medium 1640 contenant de la L-Glutamine et 25 mM de tampon HEPES (Invitrogen) complémenté par 10 % de SVFd, 1 % de sodium pyruvate (100 mM), 1 % d'acides aminés non essentiels (100 X) et 1 % de pénicilline/streptomycine. Les cellules sont maintenues à une densité de 5.10^5 - 1.10^6 cellules / mL par remplacement du milieu tous les 2-3 jours et conservées par cryogénéisation dans un mélange de SVFd supplémenté de 10 % de DMSO. Les cellules HeLa sont entretenues par du milieu GIBCO™ DMEM Medium (Invitrogen) contenant 10 % de SVFd et 1 % de streptomycine et pénicilline, à une concentration de 2.10^4 - 1.10^5 cellules / mL.

Les lymphocytes T sont cultivés dans du milieu GIBCO™ RPMI Medium 1640 contenant de la L-Glutamine complémenté par 10 % de SVFd avec une faible teneur en endotoxines (Invitrogen) et 1 % de pénicilline / streptomycine. Les cellules mononucléées obtenues du sang périphérique de patients atteints de leucémie aigue sont cultivées dans du

milieu GIBCO™ RPMI Medium 1640 contenant de la L-Glutamine complémenté par 10 % de SVFd et 1 % de pénicilline / streptomycine.

3.1.5 Autres réactifs pour la culture

Les lymphocytes T ont été activés par des billes couplées à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 du kit T cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi Biotech). Les interleukines IL2, IL12 et IL18 ont été utilisées aux concentrations respectives de 100 u/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL. Le PMA ou Phorbol-12-Myristate-13-Acétate est un diester de phorbol, qui active la PKC. Cette molécule a été utilisée à la concentration de 100 ng/mL dans notre étude. La ionomycine est antibiotique produit par la bactérie *Streptomyces conglobatus*. Il s'agit d'un ionophore sélectif du calcium et entraîne ainsi une augmentation de la concentration calcique intracellulaire. La ionomycine a été utilisée à la concentration de 5 µM. La molécule SP600125 est un inhibiteur anthrapyrazolone de la Jun Kinase (JNK) et a été utilisé à la concentration de 30 µM. U0126 ou (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene) est un inhibiteur hautement sélectif de MEK1 et MEK2. Cette molécule a été utilisée à la concentration de 20 µM.

3.2 Méthode d'analyse de l'expression de protéines membranaires par cytométrie en flux

3.2.1 Matériel

Les anticorps suivants, directement conjugués, ont été utilisés : human CD3-fluorescein isothiocyanate (FITC), human CD69-FITC et leur isotype correspondant (Mouse IgG1κ-FITC, BD Pharmingen™); human CD34-FITC et son isotype (IgG1-FITC, Immunotech). Les données de cytométrie ont été produites en utilisant le système EPICS XL-MCL4 (Beckman Coulter), équipé des lasers Argon (488 nm), Hélium Néon (633 nm) en combinaison avec le logiciel d'acquisition Expo32 (Beckman Coulter).

3.2.2 Marquage membranaire

Les cellules ont été resuspendues dans du PBS (Invitrogen) à une concentration de 1.10^5 - 5.10^5 cellules / 50 μ L. Les anticorps anti-CD3 et anti-CD69 ont été ajoutés individuellement. Un contrôle négatif (cellules seules) ainsi que les contrôles négatifs propres à chaque anticorps (IgG1) ont été réalisés. Après incubation de 30 min à 4 °C et à l'abri de la lumière, les cellules sont lavées puis reprises par 500 μ L de PBS puis analysées sur un EPICS XL-MCL4 et les données traitées avec le logiciel Expo32 (Beckman Coulter).

3.2.3 Tri cellulaire

Le marquage membranaire a été réalisé au moyen de l'anticorps anti-CD69 FITC de la même façon que décrit précédemment sur les lignées cellulaires stables Jurkat générées au laboratoire. Les cellules ont été triées sur un ALTRA EPICS (Beckman Coulter) par la responsable technique Nathalie JOUY, afin d'obtenir les populations Jurkat CD69^{low/-}. Le phénotype de ces cellules a ensuite été vérifié l'absence de CD69 à la membrane cellulaire après 15 jours de culture.

3.3 Méthode d'analyse du niveau d'expression des gènes

3.3.1 Extraction des ARN totaux

L'isolement des ARN totaux des lignées cellulaires ou des lymphocytes T a été réalisé selon le protocole High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics) sur des culots cellulaires de 1 - 5.10^6 cellules, préalablement lavées par du PBS. Cette extraction comprend une étape d'élimination de l'ADN génomique contaminant par traitement à la DNase-I. La qualité et la quantité des ARN, élués par de l'eau stérile, ont été évaluées par enregistrement du spectre d'absorption par spectrométrie UV (technologie Nanodrop, ThermoFischer Scientific, Courtaboeuf, France). Le rapport A_{260}/A_{280} , normalement compris entre 1.8 et 2, donne une indication sur la pureté de l'échantillon. Suite à cela, les ARN sont aliquotés jusqu'à 5 μ g par tube, auxquels sont ajoutées les solutions de précipitation : $1/10^e$ V d'acétate de sodium (3 M) et 2.5 V d'éthanol 100 %. Les ARN sont conservés précipités à -80 °C.

3.3.2 Synthèse des ADNc

Afin d'évaluer l'expression des gènes par RT-PCR analytique ou quantitative, les ARN messagers sont « rétro-transcrits » en ADNc. Les ARN, conservés à -80 °C, sont récupérés par centrifugation de 30 min à 13.000 rpm. Les surnageants sont éliminés délicatement en prenant soin de ne pas perturber les culots d'ARN. 1 à 5 µg d'ARN totaux sont repris dans un mélange réactionnel contenant 2 µL d'héxanucléotides (*Random Primer Mix*, 250 ng/µL), 1 µL de dNTP (10 mM), 0.5 µL d'inhibiteurs de ribonucléase (40 U/µL, Fermentas) pour un volume de 12.5 µL (QSP par de l'eau stérile). Les ARN messagers et les héxanucléotides sont hybridés à 65 °C pendant 5 min, la réaction est ensuite arrêtée dans la glace. Puis sont ajoutés 4 µL de tampon « *5x First Strand* », 2 µL de DTT à 0.1 M, 0.5 µL d'inhibiteurs de ribonucléase à 40 U/µL, 1 µL de *MMLV reverse Transcriptase* à 200 U/µL ajoutée au dernier moment. La transcription inverse est alors réalisée au Minicycler™ (MJResearch), par un cycle de 50 min à 37 °C, puis de 15 min à 75 °C. La réaction est stoppée à 4 °C. Les ADNc sont repris par de l'eau stérile à une concentration d'environ 50 ng/µL et sont conservés à +4 °C.

3.3.3 Réactions de RT-PCR

3.3.3.1 Evaluation de l'expression des transcrits par RT-PCR analytique

Les amplifications sont réalisées à l'aide de la *Platinum®TaqDNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) sur une quantité d'ADNc de 100 ng et dans un volume réactionnel de 35 µL. Cette enzyme présente une fidélité six fois plus élevée par rapport à d'autres Taq Polymerases couramment utilisées pour la PCR. De plus, elle est capable d'amplifier des séquences ADN allant jusqu'à 12 Kb. Pour chaque réaction, le mélange réactionnel de la PCR est composé de 3.5 µL de tampon *High Fidelity PCR Buffer 10X*, 0.7 µL de dNTP (10 mM), 3.50 µL de MgSO₄ (50 mM), 0.175 µL d'enzyme *Platinum®Taq Polymerase High Fidelity* (5 U/µL), 0.35 µL d'amorce sens (10 µM), 0.35 µL d'amorce anti-sens (10 µM), 2 µL de matrice d'ADNc (50 ng/µL), QSP avec de l'eau stérile. Le témoin négatif est réalisé en excluant la matrice du mélange réactionnel. Les réactions d'amplification commencent par une dénaturation de l'ADN double brin à 94 °C pendant 2 min suivie de 35 cycles composés chacun d'une dénaturation des produits d'amplification à 94°C pendant 30 sec, d'une hybridation des amorces pendant 30 sec à une température déterminée pour chaque couple

d'amorce (**Tableau 1**, Annexe 2), et enfin de la polymérisation à 68°C pendant 1 min. Les résultats sont ensuite visualisés sur gel d'agarose de 2 à 3 % selon la taille des produits de PCR obtenus.

3.3.3.2 Visualisation des produits de PCR sur gel d'agarose

Les produits de PCR sont mélangés à une solution de Bleu de Bromophénol (0.02 M EDTA, 50 % (v/v) glycérol, 1 % (p/v) BB ϕ , 2 % (p/v) Ficoll 400) dans des proportions 5/1 (v/v) et déposés sur un gel d'agarose de 1 à 3 % selon la taille des fragments attendus. La migration se fait sous une tension de 100 V en tampon borate (Tris 0.135 M, acide orthoborique 0.045 M). L'ADN est visualisé sous rampe UV (366 nm) grâce au *Gelstart® Nucleic Acid Gel Stain* (Lonza Group LTD), un intercalant de l'ADN contenu dans le gel (0.5 μ g/mL), et la taille des bandes est évaluée à l'aide de marqueurs de taille de 50 pb à 10 Kb (Biolabs).

3.3.3.3 Evaluation de l'expression des transcrits par RT-PCR semi-quantitative

Les amplifications sont réalisées à l'aide de la *Platinum®TaqDNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), sur une quantité d'ADNc de 100 ng et dans un volume réactionnel de 35 μ L. Le mélange réactionnel de la PCR est composé de 3 μ L de tampon *High Fidelity PCR Buffer 10 X*, 0.6 μ L de dNTP (10 mM), 3 μ L de MgSO₄ (50 mM), 0.15 μ L d'enzyme *Platinum®Taq Polymerase High Fidelity* (5 u/ μ L), 0.69 μ L d'amorce sens (10 μ M), 0.69 μ L d'amorce anti-sens (10 μ M), QSP 35 μ L avec de l'eau stérile et en présence de 100 ng de matrice d'ADNc. Le témoin négatif est réalisé en excluant la matrice du mélange réactionnel. Les réactions d'amplification commencent par une dénaturation de l'ADN double brin à 94 °C pendant 2 min, suivie de 28 cycles composés chacun d'une dénaturation des produits d'amplification à 94 °C pendant 30 sec, d'une hybridation des amorces pendant 30 sec à une température déterminée pour chaque couple d'amorce (**Tableau 2**, Annexe 2), et enfin de la polymérisation à 68°C pendant 1 min. Les résultats sont ensuite visualisés sur gel d'agarose comme décrit précédemment.

3.3.3.4 Evaluation de l'expression des transcrits par RT-PCR quantitative

Le principe de la PCR quantitative repose que la quantification des fragments d'ADN génomique ou d'ADNc modifiés à l'aide soit d'une sonde marquée à ces deux extrémités (5' FAM, 3' MGB6, fluorophores) ou chimie TaqMan, soit d'un agent fluorophore et intercalent de l'ADN ou chimie SYBR Green.

La quantification des transcrits totaux du gène *RHOH* a été réalisée grâce à la chimie TaqMan et le système 7900HT Fast Real-Time PCR. Les expériences sont réalisées en double exemplaire en plaque de 96 puits. Le mélange réactionnel (10 μ L par échantillon) est constitué de 5 μ L de TaqMan® Master Mix 2X, 0.6 μ L d'amorce sens à 10 μ M, 0.6 μ L d'amorce antisens à 10 μ M, 0.3 μ L de sonde fluoromarkée à 20 μ M (**Tableau 3**, Annexe 2), 2 μ L d'ADNc à 25 ng/ μ L et 1.5 μ L d'eau stérile. Afin de s'assurer de la pertinence des résultats, un témoin sans matrice est réalisé. L'ADNc des lignées cellulaires lymphoïdes B Namalwa et Raji expriment des taux importants de transcrits *RHOH* et *ABL*, et ont été utilisées pour générer une courbe de calibration constituée d'une dilution sériée au 1/10^e de 5 points. Cette droite d'étalonnage sert à évaluer l'efficacité de PCR pour chaque couple d'amorces. L'expression des transcrits (ARNmq) est évaluée par l'équation $ARNmq = 1/\text{puissance} [(Ct-b)/a]$, relativement à l'échantillon utilisé pour la courbe de calibration. La quantification des transcrits des gènes cibles est alors normalisée par l'expression du gène de référence *ABL*.

Pour la quantification des transcrits *RHOH* spécifiques des sites d'initiation de la transcription en amont des exons 1, 2 ou 4 ou de certains autres gènes, nous avons utilisé la méthode SYBR Green. Le mélange réactionnel (10 μ L par échantillon) est constitué de 5 μ L de SYBR®Green PCR Master Mix 2X, 0.4 μ L d'amorce sens à 10 μ M, 0.4 μ L d'amorce antisens à 10 μ M (**Tableau 3**, Annexe 2), 2 μ L d'ADNc à 25 ng/ μ L et 2.2 μ L d'eau stérile. Afin de s'assurer de la pertinence des résultats, un témoin sans matrice est réalisé. L'efficacité de PCR est évaluée par une courbe de calibration constituée d'une dilution sériée au 1/10^e de 5 points, à partir de l'ADNc soit d'une lignée cellulaire, soit des cellules de patient. Afin de pouvoir comparer les taux des transcrits *RHOH* initiés en amont des exons 1, 2 ou 4 entre eux, l'expression des transcrits (ARNmq) est évaluée pour chacun des échantillons par l'équation suivante $ARNmq = 1/\text{puissance} (\text{Eff}; Ct)$. L'efficacité de PCR (Eff) est calculée

par $Eff = puissance [10^{-(1/a)}]$, a étant la pente de la courbe de calibration. Cette quantification est également réalisée pour les autres gènes. L'évaluation du taux des transcrits des gènes cibles est alors normalisée par l'expression du gène de référence *ABL*.

3.4 Méthode de clonage des fragments du promoteur P3

3.4.1 Matériel

3.4.1.1 Le plasmide pGL4.14[luc2/Hygro]

Le pGL4.14[luc2/Hygro] a été utilisé pour le clonage des fragments du promoteur P3 du gène *RHOH* en vue de son étude dans les cellules hématopoïétiques. Ce vecteur est un plasmide contenant la séquence codante pour la luciférase du ver luisant, dépourvue de promoteur et située en aval d'un site de clonage multiple. Notre choix pour ce vecteur repose sur le faible bruit de fond obtenu lors des mesures d'activité luciférase, et son haut niveau d'expression de la luciférase. Il comporte également une cassette de résistance à l'hygromycine utilisée pour la sélection de cellules eucaryotes. Ce plasmide est commercialisé par la société Promega, sa carte est représentée sur la **Figure 26**.

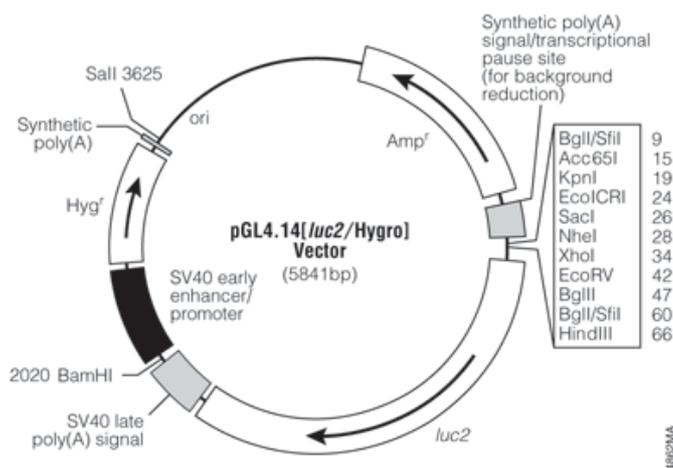


Figure 26 : Cartographie du plasmide pGL4.14[luc2/Hygro] (Promega)

3.4.1.2 Les bactéries

La souche XL1-blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac[F'*, *proAB*, *lacI^qZAM15*, *Tn10* (Tet^r)] est déficiente en système de restriction et de recombinaison

Escherichia Coli, ce qui permet de maintenir de manière stable des transgènes dans les plasmides recombinés. Elle est donc utilisée pour l'amplification de tous les plasmides.

3.4.2 Obtention des fragments du promoteur P3 du gène *RHOH*

3.4.2.1 Réactions de PCR

Les fragments du promoteur P3 du gène *RHOH* ont été obtenus par PCR grâce à un mélange contenant 15 µL de tampon *10 X High Fidelity PCR*, 6 µL de MgSO₄ (50 mM), 3 µL dNTP (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP), 3 µL d'oligonucléotides sens (10 µM), 3 µL d'oligonucléotides antisens (10 µM), 0.6 µL d'enzyme *Platinum® Taq High Fidelity* (Invitrogen), 300 ng d'ADN génomique matrice (ex : Raji), complété jusqu'à 150 µL par de l'eau stérile. Ce mélange est réparti à raison de 50 µL par tubes. La description des couples d'amorces spécifiques utilisés est présentée dans le **Tableau 4** (Annexe 1) . Un contrôle négatif ne comprenant pas de matrice est réalisé en parallèle. La spécificité de ces amorces a été optimisée en choisissant les oligonucléotides grâce au logiciel PCGene. Pour pouvoir insérer les produits de PCR dans le plasmide pGL4.14[*luc2/Hygro*], une séquence de 12 nucléotides comportant un site *HindIII* a été ajoutée en 5' des amorces sens et antisens. Le programme d'amplification est le suivant : 1 cycle de dénaturation à 94°C pendant 2 min suivi des 3 étapes suivantes : dénaturation à 94°C pendant 30 sec, hybridation à 55-58°C pendant 30 sec et élongation à 68°C pendant 1 à 3 min, répétées 35 fois. Un refroidissement des échantillons à 4 °C achève ce programme. Après la PCR, 5 µL de tampon de charge ADN 5 X sont ajoutés à 20 µL du produit de PCR et déposés sur un gel d'agarose de 1 à 3 %, selon la taille de l'ampligène, et contenant du BET.

3.4.2.2 Digestion des produits de PCR

Suite à l'amplification par PCR et à la vérification de la qualité des produits de PCR sur gel d'agarose, ces derniers sont soumis à une digestion enzymatique par *HindIII* (Fermentas). 15 µL de tampon 10 X sont ajoutés aux 130 µL de produits de PCR restants, plus 5 à 10 µL d'enzyme. Le tout est mis à incuber 1 H 30 dans un bain-marie à 37 °C. Les produits de digestion sont ensuite refroidis et purifiés sur colonne en suivant le protocole du

kit *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) et élués dans 30 μL d'eau stérile. La concentration des produits de PCR est évaluée par la technique Nanodrop (ThermoFischer).

3.4.2.3 Linéarisation du plasmide pGL4.14[luc2/Hygro]

10 μg du plasmide pGL4.14[luc2/Hygro] sont digérés pendant 1 H 30 à 37 °C par 50 unités d'enzyme de restriction *HindIII* (10 u/ μL), en présence de 5 μL de tampon 10 X dans un volume réactionnel de 50 μL . L'efficacité de la réaction de digestion est vérifiée par migration sur gel d'agarose. Le plasmide linéarisé est ensuite déphosphorylé afin de limiter par la suite sa recircularisation sur lui-même et ainsi le nombre de transformants ne renfermant pas de fragment d'ADN d'intérêt. Aux 50 μL de solution de plasmide digéré sont ajoutés 6 μL de tampon 10 X et 6 μL de phosphatase alcaline (*Calf Intestin Alcalin Phosphatase*, 10 u/ μL , New England Biolabs). Le mélange réactionnel est incubé 1 H 30 à 37 °C. Le plasmide ainsi linéarisé et déphosphorylé est purifié à l'aide du kit de purification de l'ADN (Qiagen) et repris dans 30 μL d'eau. La concentration du plasmide linéarisé ainsi préparé est évaluée par le système Nanodrop (ThermoFischer).

3.4.2.4 Insertion des fragments du promoteur P3 du gène RHOH dans le plasmide pGL4.14[luc2/Hygro] linéarisé

Le mélange réactionnel comprend 200 ng de plasmide pGL4.14[luc2/Hygro] linéarisé et purifié, 600 ng de produit de PCR digéré et purifié, 1 μL de *T4 DNA ligase* (Promega), 1 μL de tampon 10 X et de l'eau (volume final 10 μL). L'ensemble est incubé une nuit à 4 °C.

3.4.2.5 Préparation des bactéries XL1 compétentes et transformation bactérienne

Les bactéries compétentes sont préparées le jour même de la transformation, et il est nécessaire de travailler sur glace. Les bactéries XL1 sont relancées dans 20 mL de milieu LB 1 nuit à 37 °C, puis le lendemain dans du nouveau milieu de culture pour 3 H. 10 mL de cette culture sont prélevés et centrifugés à 5.000 rpm pendant 8 min à 4 °C. Le culot bactérien est ensuite repris par 1 mL de TSS (milieu LB, 10 % p/v PEG 6000, 50 μL DMSO et 50 μL MgSO_4 1 M). 100 μL de bactéries compétentes sont utilisées par transformation, en présence de 3 μL du mélange réactionnel obtenu pour l'insertion des produits de PCR dans le plasmide

linéarisé. Les bactéries sont ensuite incubées 30 min sur glace. Afin de développer la résistance à l'ampicilline, 900 μL de TSS supplémenté par 100 μL de Glucose 2 M sont ajoutés aux bactéries, qui sont alors incubées 1 H à 37 °C, avec agitation. 100 ou 200 μL sont ensuite étalés sur boîte de Pétri contenant du LB-agar et de l'ampicilline et les boîtes sont incubées une nuit à 37 °C.

3.4.2.6 Extraction de l'ADN plasmidique

3.4.2.6.1 Vérification des clones bactériens

La méthode de clonage utilisée permet, après coupure enzymatique (*Hind*III) et migration sur gel d'agarose, de savoir rapidement quels sont les plasmides recombinants contenant à l'origine des fragments de promoteur P3 du gène *RHOH*. Il est important de noter que l'utilisation d'un site enzymatique (*Hind*III) unique induit la possibilité d'une recircularisation du vecteur sur lui-même au cours du clonage. De plus, rien ne permet de distinguer un clone bactérien résistant à l'ampicilline et contenant un plasmide recombinant d'un clone contenant un plasmide vide et également résistant. Il est donc nécessaire de vérifier si certains clones bactériens sont positifs et contiennent le plasmide recombinant d'intérêt. Pour cela, une préparation rapide de l'ADN plasmidique est effectuée, suivie d'une digestion enzymatique par *Hind*III. Chaque clone bactérien est mis en culture en présence d'ampicilline une nuit à 37 °C. 1.5 mL est centrifugé à 13.000 rpm durant 2 min. Le culot bactérien est alors repris par 300 μL de tampon de lyse (50 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8, 0.5 % Triton, 0.8 % sucrose) complémenté par 50 μL de solution de lysozyme (10 mg/mL). Le tout est mis à ébullition 40 sec puis centrifugé 10 min à 13.000 rpm. Un amas gélatineux, contenant des membranes et autres contaminants, est alors observé et retiré minutieusement. L'ADN plasmidique est ensuite purifié par précipitation par 400 μL d'isopropanol et 60 μL d'acétate de sodium 2 M, puis centrifugation à 13.000 rpm durant 15 min. Le culot est séché et repris par 50 μL de TE 1 X. 3 μL sont soumis à une digestion enzymatique par *Hind*III à 37 °C, durant 1 H 15 (mélange réactionnel : 1 μL de RNase, 2 μL de tampon 10 X, 1 μL d'enzyme, 13 μL d'eau stérile, 3 μL d'ADN plasmidique). L'ensemble est déposé sur gel d'agarose de 2 à 3 % contenant du BET. Les clones positifs sont ceux pour lesquels les tailles des fragments d'ADN attendues sont correctement retrouvées.

3.4.2.6.2 Purification de l'ADN plasmidique en vue de son séquençage

A partir des cultures réalisées sur les clones positifs, une purification de l'ADN plasmidique est réalisée grâce au kit de minipréparations *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), soit le jour même, soit le lendemain. L'ADN obtenu, repris par 50 µL d'eau stérile, est quantifié par le système Nanodrop (Nanodrop1000, ThermoFischer), puis préparé pour être séquençé. Le séquençage des fragments d'ADN d'intérêt insérés dans les plasmides contenus dans les clones positifs est réalisé par la société GATC Biotech (Allemagne) à partir d'ADN plasmidiques purifiés et en utilisant les amorces spécifiques du plasmide pGL4.14[*luc2/Hygro*] : pGL4S (5'-AGTGCAGGTGCCAGAACATT -3') et pGL4AS (5'-TCCATGGTGGCTTTACCAAC -3'). La méthode est basée sur l'incorporation de nucléotides couplés à des fluorochromes (méthode Sanger). Une fois les séquences correspondantes à chaque clone obtenues, une analyse de comparaison avec la séquence génomique du gène *RHOH* est réalisée au laboratoire, à l'aide du logiciel ClustalW du site Internet EBI (www.align.genome.jp), nous permettant de déterminer l'orientation des fragments d'ADN d'intérêt dans le plasmide pGL4.14[*luc2/Hygro*]. Pour les clones dont les plasmides recombinants contiennent les fragments d'ADN d'intérêt orienté en sens et dont la séquence nucléotidique est correcte, un stock d'ADN plasmidique est alors réalisé.

3.5 Méthode de préparation des stocks d'ADN plasmidique

3.5.1 Matériel plasmidique

Le plasmide pSG5 est un vecteur d'expression utilisé pour la surexpression du facteur de transcription cJun humain (pSG5-cJun). Les vecteurs pSG5 et pSG5-cJun ont été fournis par le Dr. Marie-Hélène David-Cordonnier (Unité INSERM 837 équipe 4, Lille, France). La cartographie du vecteur pSG5 est représentée sur la **Figure 27** (page suivante). Le plasmide pRSV est un vecteur d'expression, qui a été utilisé pour la surexpression du facteur de transcription JunD humain (pRSV-hJD) dans les lignées lymphoïdes B. Les vecteurs pRSV et pRSV-hJD ont été fournis par le Dr. Yosef Shaul (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel). La cartographie du vecteur pRSV est représentée sur la **Figure 27** (page suivante). Le plasmide pCR3.1 est un vecteur d'expression utilisé pour la surexpression de TAM67, un dominant négatif du facteur cJun, ne possédant pas le domaine transactivateur de ce dernier.

Les plasmides pCR3.1 et pTAM67 ont été fournis par le Dr. Michael J. Birrer (National Institutes of Health, Rockville, MD). La cartographie du vecteur pCR3.1 est représentée sur la **Figure 27**. Le plasmide pCMV6 (pCMV6XL5) est un vecteur d'expression utilisé pour la surexpression du facteur de transcription JunB humain (pCMV6-JunB). Les vecteurs pCMV6 et pCMV6-JunB proviennent de l'entreprise OriGene Technologies, Inc. La cartographie du vecteur pCMV6 est représentée sur la **Figure 27**.

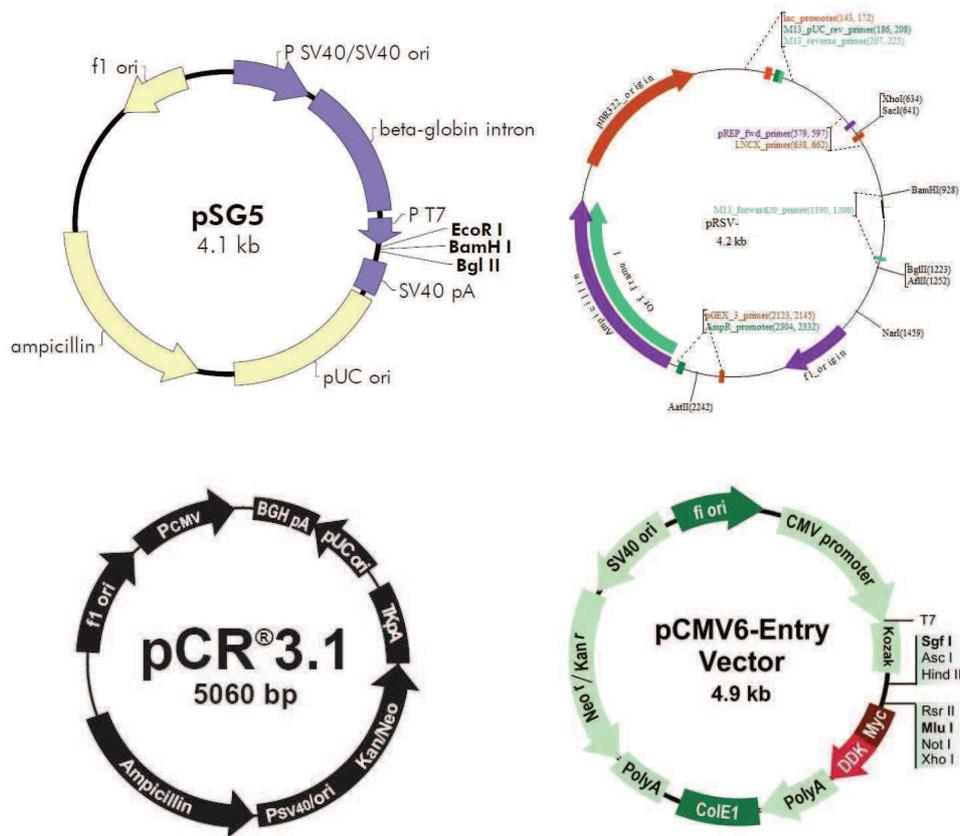


Figure 27 : Cartographie des plasmides pSG5, pRSV, pCR3.1 et pCMV6.

3.5.2 Amplification de l'ADN plasmidique

3.5.2.1 Transformation bactérienne

Deux méthodes de transformation bactérienne ont été utilisées : la première, précédemment décrite (page 86) ; la seconde détaillée ci-après. Les boîtes de Pétri contenant du LB-agar et de l'ampicilline sont préchauffées à 37 °C. 1-5 µL d'ADN plasmidique purifié sont mélangés aux bactéries Z-Competent™ (ZymoResearch), contenues dans un tube et

maintenues sur la glace environ 5 min. 50 à 100 µL de la solution bactérienne sont ensuite étalés sur boîte de Pétri, incubé 1 nuit à 37 °C. Un clone bactérien est relancé dans 10 mL de LB-ampicilline 1 nuit à 37 °C. 1 mL de cette culture est repris dans 250-500 mL de LB ampicilline et remis à 37 °C une seconde nuit.

3.5.2.2 Purification de l'ADN plasmidique

La purification de l'ADN plasmidique est réalisée à l'aide du kit *NucleoBond® Xtra Maxi Plus* (Macherey-Nagel) ou du kit *EndoFree® Plasmid Purification* (Qiagen), utilisé pour les plasmides transfectés dans les lymphocytes T normaux (quantité d'endotoxines réduite). L'ADN plasmidique, repris par du TE 1 X, est quantifié par le système Nanodrop1000 (ThermoFischer). La solution mère est conservée à 4°C. Une dilution à la concentration désirée est réalisée dans de l'eau stérile.

3.6 Méthode d'analyse de l'activité du promoteur P3 du gène RHOH

3.6.1 Transfections transitoires

3.6.1.1 Matériel

Les plasmides pSG5, pRSV, pCR3.1 et pCMV6 (obtenus des Drs Marie Hélène David Cordonnier, Yosef Shaul, Michael J. Birrer et OriGene Technologies) ont été utilisés au cours des transfections, par électroporation par la méthode Amaxa. De même, les plasmides pGL4.14[*luc2/Hygro*] recombinants générés au laboratoire (*paragraphe 3.4.2. page 85*) ont été transfectés par cette méthode.

Dans le but d'invalider des gènes cibles, des ARN interférents (ou siRNA) ont été utilisés et transfectés par la méthode Amaxa : siJunD 5'-ACGCGAACCUGAGCAGCUAUU-3' dirigé contre les transcrits du gène *JUND* ; sic-Jun 5'- AAGAACGUGACAGAUGAGCAGUU -3' dirigé contre les ARNm *c-JUN* et siJunB 5'- AAACAGAAGGUCAUGACCCACUU -3' dirigé contre les transcrits du gène *JUNB* [11]. L'ARN interférent siRFP 5'- AGACGGUGGUCAUUACCUAUU -3' est dirigé contre la *Red Fluorescent Protein* et a été choisi comme contrôle négatif, ne ciblant aucun transcrit humain.

3.6.1.2 Transfection par électroporation

Les transfections de plasmides ou d'ARN interférents (siRNA) ont été réalisées par électroporation en utilisant les réactifs et le système Amaxa (Lonza Group LTD). 0.5-5.10⁶ cellules par transfection sont centrifugées à 200 g durant 10 min, et sont ensuite reprises par 100 µL de solution de transfection, puis mélangées à l'ADN (4.5 µg de plasmide d'intérêt et 0.5 µg de pRSV-βgal, utilisé pour le contrôle de l'efficacité de transfection) ou à l'ARN (500 nM) et déposées dans une cuvette. Les cellules subissent alors le choc électrique puis sont reprises par 500 µL de milieu préalablement chauffé à 37 °C. Ce volume est ajouté à 1mL de milieu chaud contenu dans une plaque 12 puits. A chaque lignée cellulaire correspond un programme précis d'électroporation, qui a été soit mis au point au laboratoire, soit obtenu des bases de données de la société Lonza (**Annexe 3**). 48H après transfection, les cellules sont centrifugées et congelées à -80°C. Elles sont utilisées soit pour l'étude du niveau d'expression des gènes, soit pour l'évaluation de l'activité promotrice.

3.6.1.3 Evaluation de l'activité du promoteur P3 du gène RHOH

3.6.1.3.1 Extraction des protéines

L'activité du promoteur P3 est évaluée par mesure de l'activité de la luciférase exprimée par les constructions pGL4.14[*luc2/Hygro*], normalisée par l'activité enzymatique de la β-galactosidase exprimée par le plasmide pRSV-βGal (contrôle interne de l'efficacité des transfections). Les culots cellulaires, conservés à -80 °C, sont repris après décongélation par 250 µL de tampon de lyse (Potassium Phosphate 100 mM pH 7.8, 0.2 % Triton X-100, DTT 1 mM) et incubés 5 min à température ambiante. Les lysats sont ensuite centrifugés 5 min à 13.000 g et le surnageant est transféré dans un nouveau tube.

3.6.1.3.2 Quantification de l'activité promotrice

L'activité luciférase de chaque échantillon est évaluée à partir de 50 µL d'échantillon avec 100 µL de tampon (Tris phosphate 25 mM, MgCl₂ 8 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 1 %, Glycérol 15 %, ATP 2 mM, luciférine 0.25 mM). La luminescence est alors quantifiée sur un luminomètre. L'activité de la βgalactosidase est évaluée grâce au kit *Luminescent β-Galactosidase Detection Kit II* (Clontech). 196 µL de tampon sont ajoutés à 4 µL de substrat par transfection. 25 µL d'échantillon y sont ajoutés et incubés 1 H à

température ambiante et à l'abri de la lumière. La luminescence est quantifiée sur un luminomètre.

L'activité promotrice est évaluée en divisant les mesures obtenues pour l'activité luciférase par les résultats de la β -galactosidase. Pour faciliter la comparaison des expériences entre elles, le ratio correspondant à la transfection du plasmide vide pGL4.14[*luc2/Hygro*] est arbitrairement fixé à 1 unité et chaque quantification rapportée à cette référence.

3.6.2 Transfections stables

3.6.2.1 Génération de lignées Jurkat

Pour étudier l'activité du promoteur P3 du gène *RHOH* dans la lignée cellulaire Jurkat à des temps courts d'activation (3 H), les transfections transitoires ne sont pas suffisantes pour obtenir une activité luciférase analysable. Pour pouvoir analyser ces temps d'activation, nous avons généré des lignées Jurkat CD69⁻ exprimant de manière stable chacune des constructions plasmidiques pGL4.14[*luc2/Hygro*] contenant un fragment du promoteur P3 ainsi que pour le plasmide vide, grâce à la cassette de résistance à l'hygromycine présente dans le plasmide d'origine. Tout d'abord, une mise au point de la quantité d'hygromycine nécessaire a été effectuée. Des cultures de la lignée Jurkat CD69⁻ ont été effectuées en présence d'une gamme de concentration de cet antibiotique (0 à 1000 $\mu\text{g/mL}$). La concentration en hygromycine pour laquelle les cellules sont toutes mortes en 10 jours a été sélectionnée comme concentration de travail, soit 300 $\mu\text{g/mL}$ dans notre cas.

Pour la génération de ces lignées, les cellules Jurkat CD69⁻ ont été transfectées par les plasmides pGL4.14[*luc2/Hygro*] recombinants ou non. Les cellules ont été laissées 48 H en culture pour permettre l'expression de la résistance à l'hygromycine et la reconstitution des membranes cellulaires après le choc électrique. Après ce temps, les cellules ont été cultivées en présence d'hygromycine pendant 15 jours. La population CD69⁻ de chaque lignée cellulaire stable a ensuite été triée dans le but d'obtenir une population ne présentant pas ce marqueur d'activation à la membrane (*paragraphe 3.2.3. page 80*). Les cellules ont ensuite

été cultivées 3 H en présence de molécules synthétiques, puis centrifugées et conservées à -80 °C.

3.6.2.2 Evaluation de l'activité promotrice

L'évaluation de l'activité promotrice des fragments du promoteur P3 a été réalisée par la quantification de l'activité luciférase normalisée par la quantité de protéines présentes dans chaque échantillon (BioRad, *paragraphe 3.6.1.3. page 91*).

3.7 Méthode de quantification des cytokines sécrétées par les techniques ELISA et Luminex

3.7.1 Dosage des cytokines par la méthode ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay)

3.7.1.1 Quantification des protéines CCL1, CCL23 et IL16

Les dosages des chémokines CCL1, CCL23 et de l'interleukine IL16 ont été réalisés en utilisant les kits *human CCL1/I-309 DuoSet*, *human CCL23/MPIF-1 DuoSet* et *human IL16 DuoSet* (R&D Systems).

3.7.1.1.1 Préparation des plaques

Les anticorps de capture sont dilués dans du PBS à la concentration adéquate pour chacun, puis déposés à raison de 100 µL par puits dans une plaque de 96 puits (R&D Systems) laissée ensuite une nuit à température ambiante. Les puits sont alors lavés 3 fois dans du tampon de lavage (R&D Systems) afin d'éliminer les anticorps non adsorbés. La saturation des sites aspécifiques est ensuite effectuée par la solution de dilution (PBS-BSA 1 %). L'ensemble est incubé 1 H à température ambiante. Les puits sont à nouveau lavés 3 fois. La plaque, ainsi préparée, peut être utilisée pour la quantification.

3.7.1.1.2 Préparation des échantillons et des standards

Chaque standard a été reconstitué par du tampon de dilution à la concentration recommandée par le fournisseur. Une courbe d'étalonnage de 7 points a été réalisée par

dilution sériée au $\frac{1}{2}$ à partir des stocks mères dans du tampon de dilution. Ce tampon est utilisé comme point zéro de la gamme. Les échantillons sont utilisés soit purs, soit dilués au $\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{10}$ dans du tampon de dilution.

3.7.1.1.3 Procédure de l'expérimentation

Les standards et les échantillons sont déposés sur la plaque à raison de 100 μ L par puits en double exemplaire. L'expérimentation est alors réalisée suivant le protocole fourni par le fabricant. Une fois la réaction stoppée, l'absorbance est mesurée à 450 nm dans un lecteur de plaque. Les valeurs obtenues sont corrigées par une lecture à 540 nm.

3.7.1.2 Quantification de l'interleukine IL26

Ce dosage a été réalisé à l'aide du kit *human interleukin 26 (IL-26) ELISA kit* (Cusabio Biotech Co, LTD).

3.7.1.2.1 Préparation des standards et des échantillons

Le standard est repris par 1mL de tampon de dilution (*Sample Diluent*) à une concentration de 4000 pg/mL. Une dilution sériée au $\frac{1}{2}$ du standard est ensuite effectuée dans ce même tampon (soit de 4000 à 65 pg/mL). Le tampon de dilution est utilisé comme point zéro de la gamme. Les échantillons ont été utilisés soit purs soit dilués au $\frac{1}{2}$; $\frac{1}{10}$ et $\frac{1}{100}$ dans du tampon de dilution.

3.7.1.2.2 Procédure de l'expérimentation

L'expérimentation est réalisée selon le protocole fourni par le fabricant. Une fois la réaction stoppée, l'absorbance est mesurée sur un lecteur de plaque à 450 nm dans les 30 min qui suivent l'arrêt de la réaction. La quantification est ensuite faite grâce à la courbe d'étalonnage.

3.7.2 Dosage des cytokines par la méthode Luminex™

3.7.2.1 Préparation des standards et des échantillons

Certains standards sont un mélange de plusieurs protéines. Nous avons donc utilisé le standard du kit *Human IL4 Singleplex Bead Kit* pour la gamme d'étalonnage lors du dosage du TNF α et de l'IL4, et celui du kit *Human IL3 Singleplex Bead Kit* pour le dosage de l'IL13, MIP1 α et MIP1 β . Les gammes ont été réalisées par une première dilution au 1/2 dans du tampon de dilution puis en dilution sériée au 1/3. Le tampon de dilution a été utilisé comme zéro de la gamme. Les échantillons ont été utilisés dilués au 1/5 dans du tampon de dilution et au 1/4 et 1/20.

3.7.2.2 Détection de MIP1 α , MIP1 β , IL4, IL13 et TNF α par la méthode Luminex

Le dosage des cytokines IL4, IL13 et TNF α et des chemokines MIP1 α et MIP1 β a été effectué en utilisant les tampons du kit *Extracellular Protein Buffer Reagent Kit for Human and Monkey* et les réactifs contenus dans les kits *Human IL4 Singleplex Bead Kit*, *Human IL13 Singleplex Bead Kit*, *Human TNF α Singleplex Bead Kit*, *Human MIP1 α Singleplex Bead Kit* and *Human MIP1 β Singleplex Bead Kit* (Invitrogen). En considérant la compatibilité des différentes billes, les protéines MIP1 α , MIP1 β et IL13 ont été quantifiées ensemble dans une expérience et les cytokines IL4 et TNF α dans une seconde expérience. Celles-ci ont été réalisées suivant le protocole fourni par le fabricant. La lecture des résultats est ensuite effectuée grâce au système Luminex. Les paramètres de l'appareil utilisé ont été les suivants :

Paramètres d'utilisation :

Volume d'échantillon	50 μ L
Temps d'analyse	80sec
Vitesse d'injection	60 μ L/min
Fenêtre de mesure basse	7500
Fenêtre de mesure haute	15000
Nombre de billes de chaque type à analyser	100 billes

La quantification est ensuite faite grâce à la courbe d'étalonnage.

3.8 Méthode d'analyse des interactions facteurs de transcription-ADN

3.8.1 Technique de retard en gel

3.8.1.1 Principe de la technique

Le retard en gel ou EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) est une technique permettant de détecter une interaction entre une protéine et des acides nucléiques. Le fragment nucléotidique étudié est mis en contact ou non avec la protéine susceptible de se fixer dessus, puis l'ensemble est alors déposé sur un gel et assujéti à une électrophorèse non dénaturante. Si la protéine se fixe effectivement sur le fragment (appelé sonde), la migration de ce dernier sera plus lente qu'en absence de protéines. La bande correspondante aura migré moins loin sur le gel, elle est dite retardée. Dans le cas contraire, aucun retard n'est observé.

3.8.1.2 Extraction nucléaire

250.10⁶ cellules sont collectées par centrifugation puis lavées 3 fois par du PBS froid. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 4 mL du tampon 1 froid (10 mM NaCl, 0.4 M sucrose, 10 mM Tris-Cl à pH 7.8, 0.2 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.5 % Nonidet P-40, complétement par un cocktail complet d'inhibiteurs de protéases) et incubées 30 min sur la glace avec agitation intermittente. 4 mL du tampon 2 froid (10 mM NaCl, 0.4 M sucrose, 10 mM Tris-Cl à pH 7.8, 0.2 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1.5 M sucrose, 0.5 mM DTT, complétement par un cocktail complet d'inhibiteurs de protéases). Les noyaux des cellules sont alors collectés par centrifugation à 10.000 rpm à 4 °C pendant 15 min puis lavés par 4 mL du tampon 3 froid (10 mM NaCl, 0.4 M sucrose, 10 mM Tris-Cl à pH 7.8, 0.2 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, complétement par un cocktail complet d'inhibiteurs de protéases). Les culots nucléaires sont resuspendus à une concentration équivalente de 3.10⁶ cellules par mL dans du tampon 4 froid (20 mM Tris-Cl pH 7.8, 300 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 25 % glycérol complétement par un cocktail complet d'inhibiteurs de protéases) et l'ensemble est mis sous agitation pendant 30 min à 4 °C. Les extraits nucléaires sont alors centrifugés à 13.000 rpm pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant est récupéré et transféré dans un nouveau tube et soumis à une nouvelle centrifugation. Les extraits sont alors aliquotés et conservés à -80 °C. La concentration en protéines est déterminée par les réactifs de Bio-Rad.

3.8.1.3 Radiomarquage des sondes

Les oligonucléotides utilisés pour la technique d'EMSA présentent une séquence double brin longue de 30 à 40 bp (**Tableau 5**, Annexe 2). Le radiomarquage en 5'-OH des oligonucléotides est effectué à l'aide de la polynucléotide kinase T4 et de γ -ATP (radiomarquage au ^{32}P). 1 μL d'oligonucléotide simple brin sens (à 500 μM) est mis en présence de 5 μL de tampon 10 X, de 2 μL de T4 DNA ligase (10 U / μL), 5 μL de γ -ATP et 37 μL d' H_2O stérile. L'ensemble est placé à 37 °C durant 2 heures puis à 90 °C pendant 10 min. L'hybridation de l'oligonucléotide marqué à l'oligonucléotide simple brin complémentaire est réalisée en ajoutant 1 μL d'oligonucléotide anti-sens.

3.8.1.4 Retard en gel

Le retard en gel s'effectue à partir d'une solution d'ADN radiomarqué à 200 « coups » par minutes (cpm) pour 5 μL . Les interactions entre l'ADN et les protéines nucléaires sont réalisées comme suit : 5 μg d'extraits nucléaires sont mis en présence de 2 μL d'ADN à 200 cpm / 5 μL , 3 μL de Tampon EMSA (5 X), 2 μg de poly dI/dC (interactions non spécifiques) et 2.5 μg de BSA (agrégation des protéines) dans un volume final de 15 μL (QSP H_2O). La solution est incubée 30 min à 4 °C. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'acrylamide/bisacrylamide (37/5) à 8 % (TBE 0.5 X) et la migration réalisée durant 2 H 30 à 300 V. Le gel est ensuite séché et révélé grâce au système PhosphorImager (445 SI). Les extraits nucléaires sont préincubés 15 min avec les oligonucléotides compétiteurs et en présence des poly dI/dC, BSA et du tampon, sont préincubés 15 min.

3.8.2 Technique d'Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP)

3.8.2.1 Etape de fixation et sonication de l'ADN

La réaction d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a été réalisée à l'aide du kit ChIP-IT™ de la société Active Motif. $45 \cdot 10^6$ cellules sont centrifugées à 800 rpm pendant 5 min. Les culots sont repris par 60 mL de solution de fixation (1.6 mL formaldéhyde 37 % dans 60 mL de milieu RPMI) et incubés sous agitation 10 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite centrifugées 5 min à 800 rpm et lavées par 30 mL de PBS froid, puis

sont à nouveau centrifugées 5 min à 800 rpm. La réaction de fixation est arrêtée par 30 mL d'une solution de glycine (3 mL de glycine 10 X dans 27 mL de PBS 1 X) et une incubation de 5 min sous agitation. Les cellules sont centrifugées et lavées par 30 mL de PBS. Après une centrifugation de 5 min à 800 rpm, elles sont reprises par 6 mL de *Solution Cell* froide (6 mL de PBS avec 30 µL de PMSF 100 mM) et centrifugé 10 min à 2.500 rpm à 4 °C. Le surnageant est retiré et le culot repris par 1 mL de tampon de lyse en présence d'inhibiteurs de protéases et de PMSF. Les membranes sont fragilisées et le tout est incubé sur glace 30 min pour la lignée cellulaire Raji et 60 min pour la lignée EH. Les noyaux sont récupérés par centrifugation à 5.000 rpm durant 10 min à 4 °C. Le surnageant est retiré et 1 mL de tampon de sonication (en présence d'inhibiteurs de protéases) est ajouté au culot. Le mélange est réparti dans 3 tubes, soit 330 µL par tube. La sonication est réalisée sur chaque tube par une sonde à ultrasons selon le programme suivant : 20 sec de sonication continue, suivies de 30 sec de repos sur glace, et ce de 15 à 25 fois selon l'état de sonication de la chromatine nécessaire (obtention des fragments d'ADN de 200 à 1000 bp). Les échantillons sont centrifugés à 15.000 rpm à 4 °C durant 12 min. Les surnageants sont alors poolés, aliquotés et conservés à -80 °C. 25 µL de chromatine soniquée sont alors soumis à une cassure des pontages covalents entre l'ADN et les protéines, dans le but d'évaluer l'efficacité de la sonication, mise en évidence par migration de l'ADN sur un gel d'agarose. La concentration en ADN des échantillons est ensuite quantifiée.

3.8.2.2 Immunoprécipitation de la chromatine

12 µg d'ADN couplé aux protéines ont été utilisés par réaction d'immunoprécipitation de la chromatine. Celle-ci est tout d'abord reprise par une solution de billes couplées à des protéines G et incubée 2 H à 4 °C sur un rotor, afin d'éliminer toutes fixations aspécifiques. Les tubes sont ensuite centrifugés 2 min à 4.000 rpm. Le surnageant (chromatine) est transféré dans un nouveau tube. Celui-ci est à son tour centrifugé afin d'éliminer les billes restantes. 10 µL du surnageant récupéré est conservé tel quel à -80 °C et servira de témoin positif lors des réactions de PCR (Input). Le surnageant restant est soumis à l'immunoprécipitation en présence de 2 µg d'anticorps, soit fournis dans le kit (IgG contrôle négatif et anticorps anti-RNA polymérase II), soit avec l'anticorps anti-human JunD de SantaCruz Biotechnology, Inc. Les tubes sont incubés 1 nuit à 4 °C sur un rotor. Les complexes anticorps-protéines-ADN sont alors mis en présence des billes couplées aux protéines G et incubés 1 H 30 à 4 °C sous agitation, puis centrifugés 2 min à 4.000 rpm. Le

surnageant est retiré et les billes sont lavées par différents tampons, comme indiqué dans le protocole du kit. Les complexes sont alors dissociés des billes. L'ADN est mis en présence de NaHCO₃ 1 M, 1 % SDS et de tampon d'éluion puis incubé 15 min à température ambiante sous agitation. Les tubes sont centrifugés 2 min à 4.000 rpm. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube. L'étape est répétée 1 fois et les surnageants sont poolés. Les complexes ADN-protéines sont ensuite défaits et l'ARN contaminant éliminé par 4 µL de NaCl 5 M et 1 µL de RNase A (réaction également réalisée sur l'échantillon Input). Les tubes sont alors placés sur un bloc chauffant 1 nuit à 65 °C. Les protéines sont ensuite éliminées par 2 µL d'EDTA 0.5 M, 2 µL de Tris-Cl pH 6.5 1 M et 2 µL de protéinase K et incubation des tubes 2 H à 42 °C. Il est purifié sur des minicolonnes puis lavé plusieurs fois par des tampons contenant de l'éthanol. L'ADN est ensuite élué par 50 µL d'eau traitée au DEPC, DiEthyl PyroCarbonate, un inhibiteur de RNases. L'ADN est dilué au 1/5^e dans de l'eau stérile et soumis aux réactions de PCR ou conservé à -20 °C.

3.8.2.3 Evaluation de la présence des fragments d'ADN génomique par PCR analytique

Les amplifications sont réalisées à l'aide de la *Platinum®TaqDNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) sur 5 µL d'échantillon et dans un volume réactionnel de 25 µL. Le mélange réactionnel de la PCR est composé de 2.5 µL de tampon *PCR Buffer 10 X (ChIP-IT™, Active Motif)*, 1 µL de dNTP (5 mM), 0.2 µL d'enzyme *Platinum®Taq Polymerase High Fidelity* (5 u/µL), 2 µL d'amorce sens (10 µM), 2 µL d'amorce anti-sens (10 µM), 5 µL de matrice et 12.3 µL d'eau stérile. Le témoin négatif est réalisé en excluant la matrice du mélange réactionnel. Les réactions d'amplification commencent par une dénaturation de l'ADN double brin à 94 °C pendant 3 min suivie de 36 cycles composés chacun d'une dénaturation des produits d'amplification à 94 °C pendant 20 sec, d'une hybridation des amorces (**Tableau 6**, Annexe 2) à 59 °C pendant 30 sec et de la polymérisation à 72 °C pendant 30 sec. Les résultats sont ensuite visualisés sur gel d'agarose de 2 à 3 % selon la taille des ampligènes obtenus, en présence de GelStar®.

3.8.2.4 Quantification des fragments d'ADN génomique par PCR quantitative

Les PCR quantitatives sont réalisées à l'aide du SYBR® Green PCR Master Mix 2X en présence de 5 µL d'échantillon dans un volume réactionnel de 25 µL. Le mélange de

PCR est composé de 12.5 µL de tampon 2 X SYBR® Green PCR Master Mix, 2 µL d'amorce sens (10 µM), 2 µL d'amorce anti-sens (10 µM), 5 µL d'échantillon et 3.5 µL d'eau stérile. Les amorces utilisées sont indiquées **Tableau 7** (Annexe 2). Le témoin négatif est réalisé en excluant la matrice du mélange réactionnel. Le nombre de copies de l'ADN génomique est calculé en divisant la quantité des produits de PCR, évaluée comme décrit dans le paragraphe page, par son poids moléculaire puis en multipliant la valeur obtenue par le nombre d'Avogadro.

3.9 Méthode d'analyse de l'expression des protéines par électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE

Le principe de l'analyse électrophorétique monodimensionnelle SDS-PAGE repose sur la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Les protéines, molécules amphotères, sont placées dans un milieu basique ; elles acquièrent ainsi une charge globale négative et migrent de la cathode vers l'anode.

3.9.1 Matériel

Les anticorps primaires utilisés pour l'immunomarquage sont les suivants : anti-human phospho-CamKII, anti-human CamKII, anti-human lamin B, anti-human beta actin, anti-human Runx1 provenant de Cell Signaling, et anti-human c-Jun, anti-human JunB, anti-human JunD, provenant de Santa Cruz et l'anti-human RREB1 de Rockland. Les anticorps secondaires sont des anticorps anti-mouse et anti-rabbit conjugué à HRP et provenant du fournisseur Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe, GmbH.

3.9.2 Préparation des échantillons

Les cellules sont centrifugées à 800 rpm pendant 5 min. Les culots cellulaires sont repris par du tampon de lyse (*Cell Lysis Buffer*, Cell Signaling) complété par des cocktails d'inhibiteurs de phosphatases. Le mélange est incubé 10 min sur la glace puis centrifugé 15 min à 13.000 rpm à 4 °C. Les surnageants sont conservés ensuite à -80 °C. La concentration en protéines est évaluée par la méthode BioRad. 30 µg de lysats protéiques sont utilisés par

dépôt, mélangés à du tampon de charge 4 X (Invitrogen) et à 1 μ L d'agent réducteur (Invitrogen). Les tubes sont chauffés 10 min à 70 °C puis déposés sur gel.

3.9.3 Préparation des gels et conditions de migration

Les gels utilisés, *NuPAGE® Novex® Bis-Tris* de 10 et 12 %, sont précoulés par la société Invitrogen. Le tampon de migration est du *NuPAGE® MOPS SDS running Buffer* complétement par de l'antioxydant (Invitrogen). Les échantillons préparés sont déposés sur le gel, en parallèle des témoins de masse Seeblue® Pre-stained standard et MagicMark™ XP Western Protein Standard (Invitrogen). La migration est réalisée sous 250 V durant 1 H.

3.9.4 Transfert sur membrane et immunodétection des protéines

3.9.4.1 Transfert électrophorétique des protéines

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est réalisé par le système *iBlot® Dry Blotting System* (Invitrogen). Le programme utilisé dépend de la taille des protéines à analyser et peut varier de 6 à 7 min 30.

3.9.4.2 Révélation immunologique

La révélation se fait en bloquant les sites spécifiques en incubant la membrane 2 H avec du tampon de blocage TBS complétement par 5 % de BSA et 2 % Tween pour les anticorps purifiés de lapin ou de souris et complétement par 3 à 5 % de Lait écrémé et 2 % de Tween pour les anticorps purifiés de chèvre (en présence de cocktail d'inhibiteurs de phosphatases pour la révélation de protéines phosphorylées). L'Anticorps primaire est ajouté au tampon de blocage à la concentration de 1/5000 ou 1/1000 selon l'anticorps utilisé, et laissé 1 nuit à 4 °C sous agitation. La membrane est ensuite lavée 3 fois 15 min par du TBS contenant 0.2 % de Tween, puis l'anticorps secondaire (anti-lapin, -souris ou -chèvre, couplé à l'HRP ou *HorseRadish Peroxidase*) est ajouté au 1/5000^e dans du tampon de blocage contenant 0.2 % de Tween. La membrane est de nouveau lavée 3 fois 15 min par du TBS complétement par 0.2 % de Tween. Elle est alors mise en contact avec un substrat chimioluminescent de la peroxydase de Raifort (*ECL plus Western Blotting*

Detection Reagents, GE Healthcare), puis est ensuite exposée sur un film sensible à la luminescence dans une chambre noire selon le temps nécessaire puis ce dernier est révélé.

3.10 Méthode d'analyse bioinformatique

3.10.1 Identification de sites consensus pour des facteurs de transcription sur P3

L'identification de sites consensus pour des facteurs de transcription sur le promoteur P3 du gène *RHOH* a été réalisée à partir de plusieurs sites bioinformatiques. Les programmes MatInspector, TFSearch et P-Match utilisent respectivement les bases de données suivantes Matrix Family Library Version 6.0, Transfac et Transfac®6.0 et nous ont permis d'obtenir différents profils de fixation de facteurs de transcription sur cette région génomique.

3.10.2 Identification de régions conservées entre espèces dans la région du promoteur P3

L'analyse d'homologie des séquences du gène *RHOH* entre espèces a été réalisée par le programme bioinformatique GenomeVISTA. Il s'agit d'un site informatique, qui recherche les régions orthologues d'une séquence ADN donnée dans différentes espèces. Ce logiciel effectue également une analyse comparative de ces régions. L'ensemble des programmes VISTA sont développés par la division génomique de *Lawrence Berkeley National Laboratory* et de *United States Department of Energy Joint Genome Institute*. La séquence du promoteur P3 du gène humain *RHOH* a été alignée avec ses régions orthologues, comme décrit dans [11].

4 Résultats

4.1 Mise en évidence de l'activité prédominante du promoteur P3 dans les lymphocytes B et T

4.1.1 Etude de l'activité des promoteurs P1, P2 et P3 du gène *RHOH* dans les lymphocytes B et T

Les lymphocytes B et T du sang périphérique expriment un taux relativement élevé de transcrits *RHOH*. Cette quantification a été réalisée sur l'ensemble des isoformes de *RHOH* par RT-PCR quantitative et chimie TaqMan [2]. Il a également été montré que le gène *RHOH* est exprimé dans les cellules B en au moins dix isoformes d'ARN messagers et au moins 6 isoformes dans les lymphocytes T, transcrits initiés en amont des exons 1, 2 ou 4 (*paragraphe 1.2.1.3, page 38*). Quelle est l'importance relative de ces transcrits ? Lesquels sont les plus fortement représentés ? Pour évaluer l'expression spécifique des ARN messagers de *RHOH*, nous avons réalisé des RT-PCR analytiques et quantitatives à partir d'ADNc de lymphocytes B et T normaux isolés de sang périphérique et de la lignée lymphoïde B Raji. Les amorces utilisées dans ces expériences sont spécifiques de chaque site d'initiation de la transcription et permettent l'amplification des transcrits initiés en amont soit de l'exon 1, de l'exon 2 ou de l'exon 4 (**Figure 28**, page suivante) [2, 11].

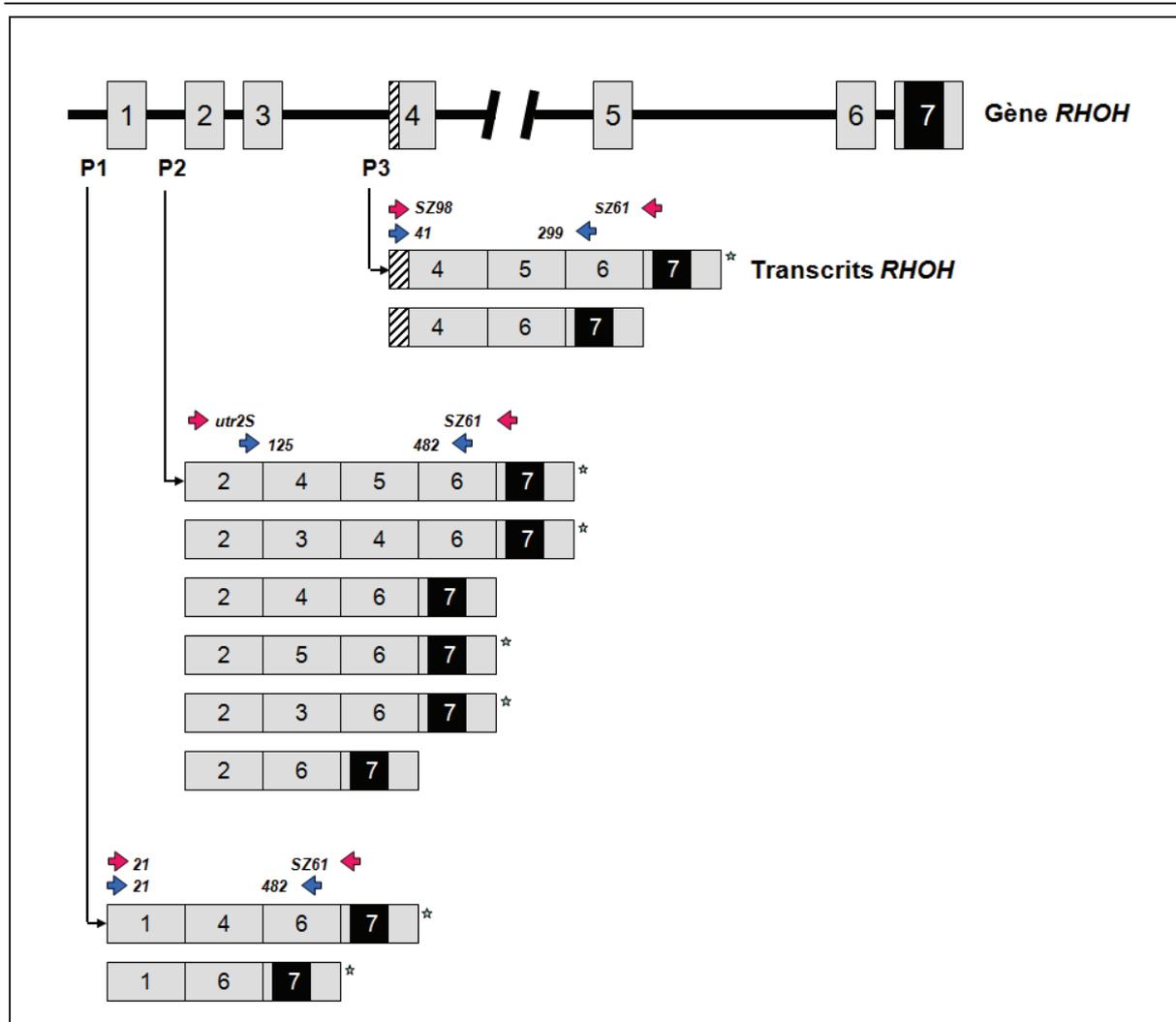


Figure 28 : Positionnement des amorces spécifiques de chaque site d'initiation de la transcription utilisées lors des RT-PCR analytiques et quantitatives. Les structures du gène *RHOH* et de ses transcrits matures, après épissage alternatif, ont été représentées non à l'échelle. La transcription peut être initiée en amont des exons 1 (promoteur P1), 2 (P2) ou 4 (P3). Pour quantifier l'activité transcriptionnelle de ces 3 promoteurs, des amorces spécifiques de chaque site d'initiation ont été sélectionnées pour la RT-PCR analytique (rose) et pour la RT-PCR quantitative (bleu). Afin de limiter la taille des produits de PCR dans ce cas, les amorces en antisens ont été choisies dans l'exon 6. Les oligonucléotides 21 et 482 ou 21 et SZ61, localisées respectivement dans les exons 1 et 6 et dans les exons 1 et 7 permettent l'amplification des ARN messagers initiés en amont de l'exon 1 ; 125 et 482 ou utr2S et SZ61, situées dans les exons 2 et 6 ou dans les exons 2 et 7, l'amplification des isoformes issues du promoteur P2 ; 41 et 299 ou SZ98 et SZ61, localisées à l'extrémité 5' de l'exon 4 (41, SZ98) et au milieu de l'exon 6 (299) ou au début de l'exon 7 (SZ61) amplifient spécifiquement les transcrits initiés en amont de l'exon 4. Ces derniers contiennent en effet les 53 premiers nucléotides de cet exon, qui sont exclus dans les isoformes où cet exon est inséré. Les ARN messagers matures suivis d'une * sont des isoformes faiblement représentées [2]. La séquence de 576 nucléotides codant la protéine RhoH est située en totalité dans l'exon 7 a été représentée

Le choix des amorces et la mise au point des RT-PCR analytiques et quantitatives ont été réalisés par le Dr Sylvie Zouitina-Galiègue. Pour les transcrits initiés en amont de l'exon 4 (promoteur P3), les amorces en sens sont situées dans les 60 premiers nucléotides de cet exon, afin d'amplifier spécifiquement les isoformes issues de l'activité de P3. En effet, les 53

premiers nucléotides de cet exon sont uniquement présents dans les transcrits matures initiés par P3 et sont excisés dans les ARN messagers issus des promoteurs P1 et P2 (**Figure 28**, page précédente) [2]. Le choix de ces amorces nous permet ainsi de visualiser de façon spécifique l'expression des transcrits issus de l'activité du promoteur P3 dans les lymphocytes B et T.

4.1.1.1 Etude de l'activité des promoteurs P1, P2 et P3 dans les lymphocytes B

L'expression des transcrits issus de l'activité des promoteurs P1, P2 et P3 a été évaluée dans les lymphocytes B et la lignée cellulaire Raji grâce aux amorces mises au point pour la technique de RT-PCR analytique décrite précédemment (**Figure 29**, ci-dessous).

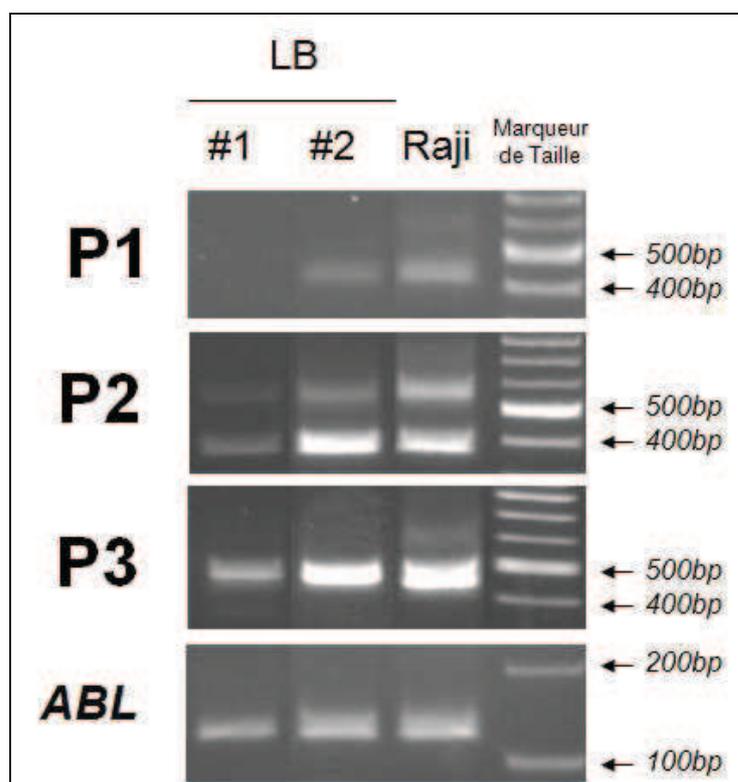


Figure 29 : Expression des ARN messagers du gène *RHOH* issus des activités promotrices P1, P2 ou P3, dans des lymphocytes B normaux et la lignée lymphoïde B Raji. L'expression des transcrits a été évaluée dans 2 échantillons d'ADNc de lymphocytes B normaux, obtenus du Dr Sylvie Zouitina-Galiègue, et de la lignée Raji, par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques de chaque site d'initiation de la transcription en amont des exons 1 (P1), 2 (P2) ou 4 (P3) décrites par Lahousse et collaborateurs en 2004 [2] et **Figure 28** (page précédente). Nous avons contrôlé, en parallèle et de la même manière, la quantité et la qualité des ADNc utilisés par l'expression du gène *ABL*, connu pour avoir une transcription constante dans les cellules hématopoïétiques. L'analyse des produits de PCR a été réalisée sur gel d'agarose de 2 à 3% en présence d'un intercalant de l'ADN, le Gel®Star.

L'étude qualitative des ARN messagers du gène *RHOH* spécifiques de chaque site d'initiation de la transcription nous a permis d'observer des variations d'expression pour les lymphocytes B et la lignée Raji. Les transcrits initiés en amont de l'exon 1 semblent peu présents dans les lymphocytes B. Les cellules B (lymphocytes B normaux et lignée Raji) expriment plus fortement les ARN messagers *RHOH* initiés en amont des exons 2 (P2) et 4

(P3), avec une légère prédominance pour ces derniers. Ainsi, les transcrits initiés en amont de l'exon 4 semblent les isoformes les plus fortement représentées dans les cellules B. La quantification des transcrits issus des activités des promoteurs P1, P2 et P3 a été réalisée dans la lignée cellulaire lymphoïde B Raji et est présentée **Figure 30** (ci-dessous).

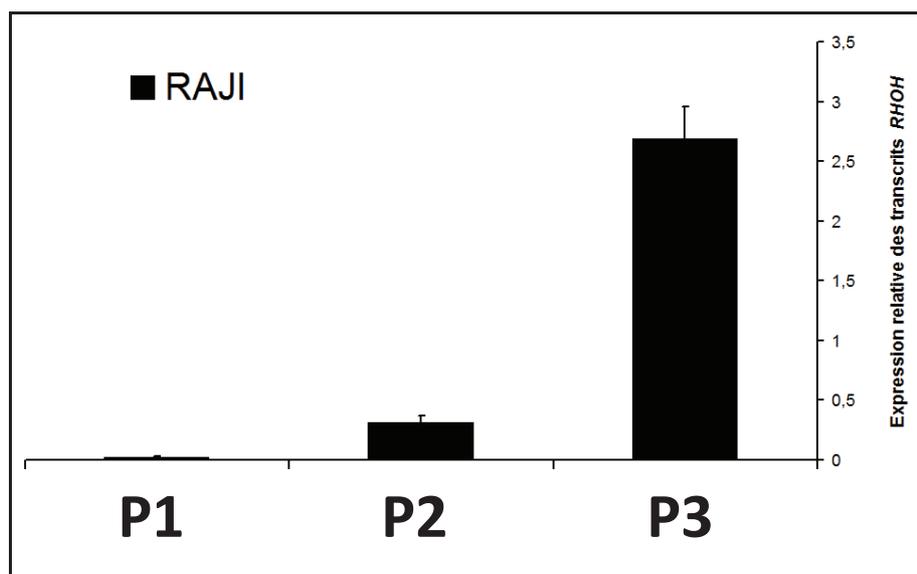


Figure 30 : Quantification relative de l'expression des ARN messagers du gène *RHOH* initiés en amont des exons 1, 2 ou 4, dans la lignée lymphoïde B Raji [11]. L'évaluation de la présence de ces transcrits a été réalisée par RT-PCR quantitative à l'aide des amorces décrites dans la **Figure 28**, page 104. L'expression des ARN messagers *RHOH* initiés en amont de l'exon 1 (promoteur P1) a été représentée en (P1) ; ceux initiés en amont de l'exon 2 en (P2) et les transcrits initiés en amont de l'exon 4 en (P3), relativement aux taux d'ARN messagers du gène *ABL*. Les résultats ont été obtenus à partir de 2 cultures différentes et la moyenne représentée sur ce graphique.

La quantification relative de chacun de ces transcrits dans la lignée Raji, par la technique de SYBR® Green, nous a permis de déterminer les niveaux d'expression relative des isoformes initiées en amont des exons 1, 2 ou 4 respectivement de 0.03, 0.32 et 2.69. Nous avons ainsi observé que les ARN messagers issus du promoteur P3 sont environ 8 fois plus exprimés que ceux issus des promoteurs P1 et P2 combinés (**Figure 30**). Au laboratoire, notre équipe a pu corréler la répression des transcrits initiés en amont de l'exon 4 à la diminution d'expression de la protéine RhoH, observés dans des lignées cellulaires modèles de la leucémie à tricholeucocytes [223]. Notre hypothèse est que ces transcrits issus de

l'activité du promoteur P3 seraient majoritairement responsables de l'expression de la protéine RhoH dans les cellules B. Pour ces raisons, nous nous sommes intéressés à la caractérisation du promoteur P3 de *RHOH* (en amont de l'exon 4) dans ces cellules B. La détermination de mécanismes impliqués dans la régulation de ce promoteur P3 dans les lymphocytes B pourrait peut être nous aider à identifier des événements responsables de l'expression anormalement faible du gène *RHOH* dans la leucémie à tricholeucocytes (*partie 4.2.2.3, page 141*).

4.1.1.2 Etude de l'activité des promoteurs P1, P2 et P3 du gène *RHOH* dans les lymphocytes T

Précédemment, nous avons montré que les transcrits *RHOH* sont différemment représentés dans les cellules B, et cela en fonction de leur site d'initiation (exon 1, 2 ou 4). Le gène *RHOH* est fortement exprimé dans les lymphocytes [2], population cellulaire majoritairement représentée par les lymphocytes B et les lymphocytes T. Compte tenu de l'expression de RhoH dans les lymphocytes T et B et des fonctions de cette protéine dans la différenciation des cellules T, dans l'activation des récepteurs TCR et BCR, nous avons entrepris de quantifier l'expression des transcrits issus de l'activité des promoteurs P1, P2 et P3 aussi bien dans les cellules B que dans les lymphocytes T. L'étude de l'expression des ARN messagers du gène *RHOH* spécifiques de chaque site d'initiation de la transcription a été évaluée dans les lymphocytes T normaux par RT-PCR analytique (**Figure 31**, page suivante).

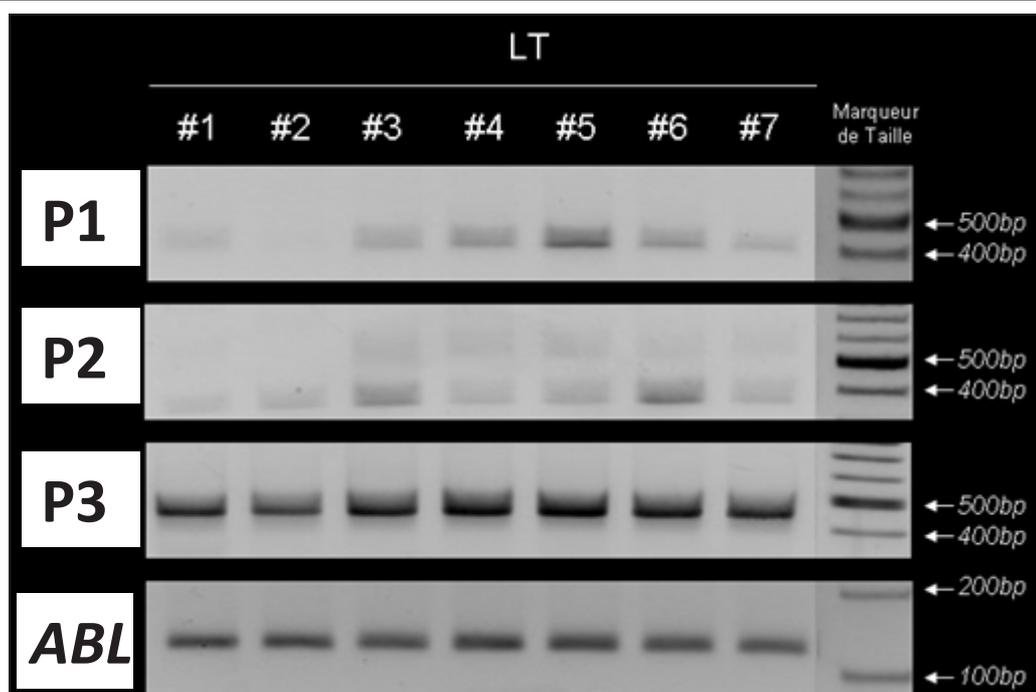


Figure 31 : Expression des ARN messagers du gène *RHOH* issus de l'activité des promoteurs P1, P2 ou P3, dans des lymphocytes T normaux (LT). La présence de ces transcrits a été détectée par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques de chaque site d'initiation de la transcription en amont des exons 1, 2 ou 4, choisies pour la RT-PCR analytique et décrites par Lahousse et collaborateurs en 2004 et **Figure 28**, page suivante [2]. Nous avons ainsi mis en évidence les activités des promoteurs P1, P2 et P3, pour 7 échantillons d'ADNc de lymphocytes T normaux. Nous avons contrôlé, en parallèle et de la même manière, la quantité et qualité des ADNc utilisés par l'expression du gène ABL, connu pour avoir une transcription constante dans les cellules hématopoïétiques. L'analyse des produits de PCR a été réalisée sur gel d'agarose de 2 à 3% en présence d'un intercalant de l'ADN, le Gel@Star.

Les transcrits initiés en amont de l'exon 1 sont exprimés de manière variable et faiblement représentés dans les lymphocytes T normaux. Les ARN messagers issus de l'activité du promoteur P2 (exon 2) semblent aussi être faiblement exprimés dans les lymphocytes T (**Figure 31**). A l'inverse, les transcrits initiés en amont de l'exon 4 sont fortement présents dans les cellules T. Ces résultats suggèrent que les isoformes majoritaires dans les lymphocytes T sont celles issues de l'activité du promoteur P3. La quantification relative de ces transcrits dans les cellules T nous a permis de confirmer cette observation (**Figure 32**, page suivante).

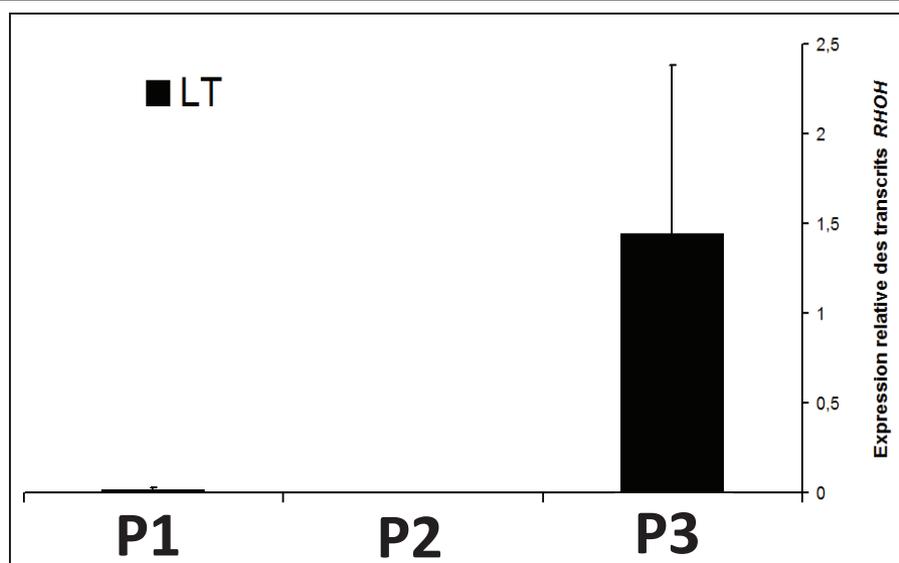


Figure 32 : Quantification relative de l'expression des ARN messagers du gène *RHOH* initiés en amont des exons 1, 2 ou 4, dans les lymphocytes T normaux périphériques (LT). L'évaluation de la présence de ces transcrits a été réalisée par RT-PCR quantitative à l'aide des amorces décrites dans la **Figure 28**, page 104. L'expression des ARN messagers *RHOH* initiés en amont de l'exon 1 (promoteur P1) ; ceux initiés en amont de l'exon 2 en (P2) et les transcrits initiés en amont de l'exon 4 en (P3), relativement aux taux d'ARN messagers du gène *ABL*. Les résultats ont été obtenus à partir de 3 ADNc différents et la moyenne représentée sur ce graphique.

Nous avons ainsi obtenu les valeurs d'expression suivantes : 0.019, 0.0002 et 1.45, correspondant respectivement aux taux des isoformes initiées en amont des exons 1, 2 et 4. Les transcrits générés à partir du promoteur P3 sont donc environ 70 fois plus représentés dans les lymphocytes T, comparativement aux ARN messagers issus de l'activité des promoteurs P1 et P2 réunis. Nos résultats montrent également que les isoformes issues de P2 ne sont pratiquement pas détectables dans les cellules T normales.

4.1.2 Conclusion - Mise en évidence de l'activité prédominante du promoteur P3 dans les lymphocytes B et T

Dans cette première partie, nous avons évalué le taux de transcrits *RHOH* initiés en amont des exons 1, 2 et 4 dans les lymphocytes B et T normaux, nous permettant ainsi d'étudier les profils transcriptionnels des isoformes du gène *RHOH* dans ces cellules. Nous avons ainsi mis en évidence des différences d'expression des transcrits *RHOH* dans les lymphocytes B et T et cela, en fonction des sites d'initiation de ces ARN messagers. Un point commun a été observé : ces deux types cellulaires expriment principalement les transcrits initiés en amont de l'exon 4. Ces données montrent donc que le promoteur P3 est le plus actif

et est à l'origine de la majorité des ARN messagers du gène *RHOH*. Les isoformes issues de l'activité des promoteurs P1 et P2, situés respectivement en amont des exons 1 et 2 sont plus faiblement représentées dans les cellules B et T. Cependant, de manière intéressante, cette étude nous a permis d'identifier des spécificités cellulaires de l'expression de ces transcrits : le promoteur P1 est plus actif dans les cellules T et à l'inverse, P2 est plutôt nettement favorisé dans les cellules B (**données du laboratoire non montrées**). Les transcrits initiés en amont de l'exon 1 semblent donc être T-spécifiques et ceux initiés de l'exon 2, B-spécifiques.

4.2 Etude des mécanismes moléculaires contrôlant l'activité du promoteur P3 du gène *RHOH* dans les lymphocytes B et T

Dans la première partie, nous avons montré que P3 est le promoteur le plus actif dans les cellules B et T et est à l'origine de la majorité des transcrits *RHOH*. Les données du laboratoire montrent que les transcrits *RHOH* initiés en amont de l'exon 4 (P3) sont ceux qui sont réprimés dans l'HCL et l'ATL (**données du laboratoire non montrées**). Il nous est donc apparu important de nous intéresser à la régulation de ces transcrits. Compte tenu de la présence d'uORFs dans les ARN messagers *RHOH*, l'expression de ces derniers peut être contrôlée par des mécanismes posttranscriptionnels. Cependant, des mécanismes transcriptionnels importants contrôlant le promoteur P3 peuvent également réguler la synthèse de ces isoformes. Dans une première approche, nous nous sommes intéressés à la régulation de P3 dans les cellules B et T et à sa possible dérégulation dans les deux proliférations malignes lymphoïdes chroniques HCL et ATL.

4.2.1 Analyse *in silico* de la région promotrice P3

4.2.1.1 Recherche d'éléments *cis* appartenant à la région proximale du promoteur P3

La transcription d'un gène eucaryote est réalisée grâce aux événements de décondensation de l'ADN, de remodelage des nucléosomes, de modification des histones, d'association de facteurs de transcription activateurs ou co-activateurs aux sites appelés « enhancer » et grâce au recrutement de la machinerie transcriptionnelle au niveau du promoteur proximal, séquence activatrice située dans l'environnement proche du site d'initiation de la transcription (+1). Le promoteur proximal contient les séquences d'ADN présentes dans les 35 bp en amont et 35bp en aval du site d'initiation de la transcription ou

(+1), sur lesquelles vont s'associer les éléments de la machinerie transcriptionnelle (facteurs de transcription, comprenant la RNA Polymérase II). La transcription sera alors initiée. Parmi les motifs présents dans la région encadrant le (+1), nous retrouvons la boîte TATA, l'élément Initiateur (Inr) et des séquences BRE (*TFIIB Recognition Element*) et DPE (*Downstream Promoter Element*) (**Figure 33**, ci-dessous) [17].

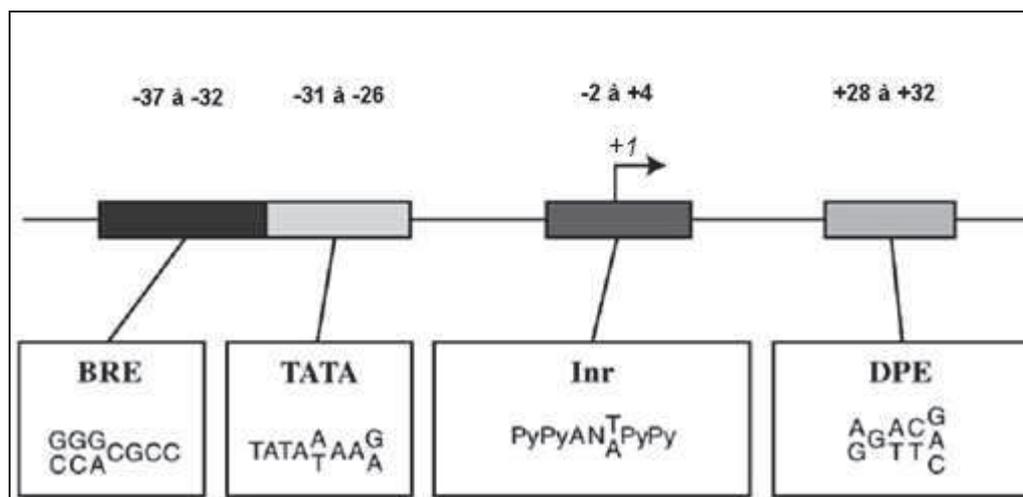


Figure 33 : Schéma représentatif possible pour un promoteur proximal. Les sites de fixation des constituants de la machinerie transcriptionnelle et leur séquence consensus chez les mammifères ont été positionnés en regard du site d'initiation de la transcription (+1), représenté par une flèche recourbée. Py : pyrimidine, C ou T ; N : A, C, T ou G [17].

La boîte TATA ou séquence riche en AT est localisée à une distance précise de -31 à -26 en amont du site d'initiation de la transcription. Le site consensus pour une association optimale du facteur de transcription TBP (*TATA Binding Protein*) correspond à TATATAAG. Cette boîte TATA peut fonctionner en absence des autres motifs. Juste en amont est situé le motif BRE, un élément de reconnaissance pour le facteur TFIIB et qui peut être également situé juste en aval de la boîte TATA. L'élément Initiateur ou Inr est défini comme étant un élément « discret » du promoteur, il fonctionne de la même manière que la boîte TATA indépendamment de cette dernière. La séquence de ce motif contient une adénosine au niveau du site d'initiation de la transcription, une cytosine en position -1 et autour principalement des pyrimidines (T/C/T/CANT/A^T/C^T/C). Le site consensus DPE (A^GGA^T/C^TG^A/C^T) est requis pour l'interaction de TFIID avec certains promoteurs dépourvus de boîte TATA. Ce motif est donc surtout retrouvé dans ce type de séquences promotrices mais avec des exceptions. Le site DPE agit en synergie avec l'élément Inr comme un seul élément au sein du promoteur, il est

localisé entre les nucléotides +28 et +32. Chacun de ces motifs n'est retrouvé que dans certains des promoteurs proximaux : soit ils les contiennent tous, soit quelques uns ou au contraire aucun. D'autres éléments peuvent également intervenir dans la régulation de la transcription, comme les motifs DCE (*Downstream Core Element*) et MTE (*Motif Ten Element*) et les îlots CpG [17].

Si nous analysons la région promotrice P3 du gène *RHOH* sur une région -100 à +100 par rapport au site d'initiation de la transcription (situé à l'extrémité 5' de l'exon 4), nous pouvons observer la présence de certains motifs (**Figure 34**, ci-dessous).

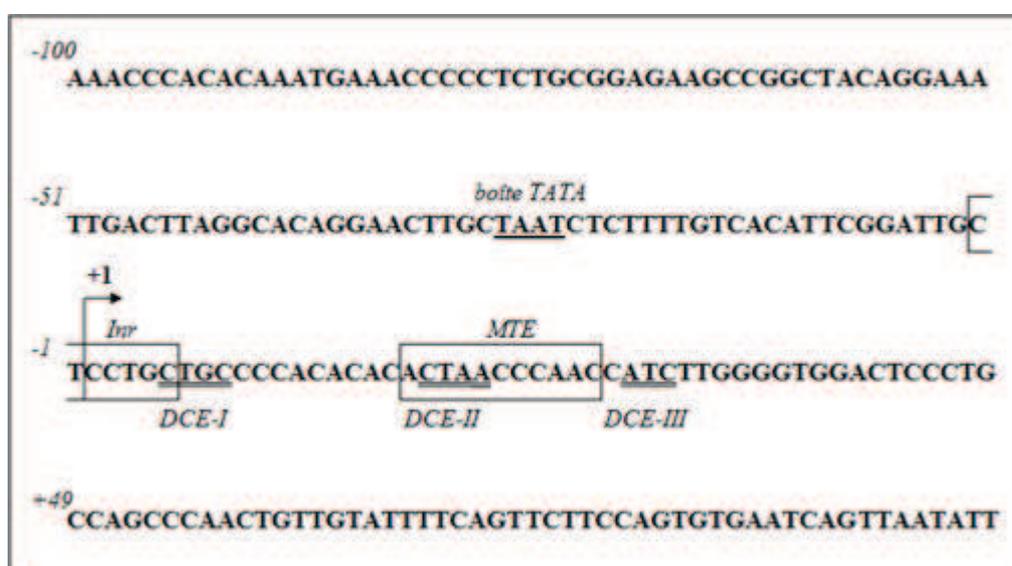
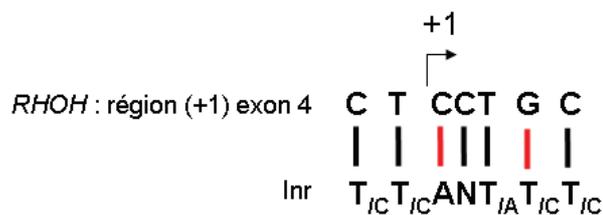


Figure 34 : Recherche d'éléments de la machinerie transcriptionnelle du promoteur proximal P3 de *RHOH* par une analyse de la région -100/+100 en regard du site d'initiation de la transcription (+1). Cette étude a montré la présence d'une boîte TATA dégénérée, riche en A et T en position -28, d'un site Initiateur (Inr) en -2, d'un motif MTE (*Motif Ten Element*) en +18 et d'éléments DCE (*Downstream Core Element*) I, II et III, imparfaits, respectivement en positions +5, +19, +30.

Nous mettons ainsi en évidence :

- (1) la présence d'un élément Inr dé généré. Nous remarquons, au niveau du site d'initiation de la transcription situé à l'extrémité 5' de l'exon 4, l'absence d'une adénosine en position +1, caractéristique d'un motif Inr. Cependant, la région entourant ce site d'initiation de la transcription (CTCCTGC) présente des identités de séquence avec le site consensus $T_C T_C A N T_A T_C T_C$ de l'élément Inr, représentées par un trait

noir dans la figure ci- après (les différences sont indiquées par un trait rouge) :



Il a été décrit que les pyrimidines présentes en -2, +4 et +5 augmentent l'activité de l'élément Inr [17]. Dans notre cas, 2 positions sur 3 sont tenues par des pyrimidines. Nous sommes donc en présence d'un élément Inr dégénéré au site +1 du promoteur P3 de *RHOH*.

(2) la présence d'une séquence TAAT entre les positions -28 et -25 pouvant correspondre à une boîte TATA présumée. Des motifs TATA dégénérés ont été également observés dans d'autres gènes, tel le motif TTTAAAA dans le gène humain de la guanyline [253]. Des études ont montré que les éléments Inr et TATA agissent en synergie quand ils sont séparés l'un de l'autre par 25-30 bp [17]. Dans notre cas, les deux motifs sont disants de 25 bp suggérant une action synergique dans l'initiation de la transcription en amont de l'exon 4.

(3) l'absence d'éléments BRE en amont et en aval de la pseudo boîte TATA.

(4) l'absence d'éléments DPE aux positions +28 à +32.

(5) la présence de pseudo éléments DCE-I, DCE-II et DCE-III : séquences CTGC, CTAA, ATC, en positions +5, +19, +30, correspondant aux sites consensus CTTC, CTGT, AGC respectivement retrouvés aux positions +8, +20, +31 en aval du site d'initiation de la transcription. L'élément DCE intervient dans la fixation du facteur TFIID sur le promoteur, en présence de TFIIA [254].

(6) la présence d'un motif ACTAACCCAAC correspondant à l'élément MTE, dont la séquence consensus est CCC_{/G}AA_{/G}CC_{/G}C_{/G}AAC, et localisé ici en position +18 à +27 (**Figure 34**, page précédente).



Cette situation, de +18 à +27 relativement au site d'initiation de la transcription permet sa pleine fonction et peut entraîner l'initiation de la transcription. Il peut agir indépendamment de la présence de la boîte TATA et de l'élément DPE mais peut aussi fonctionner en synergie avec eux. Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que ce motif MTE nécessite cependant la présence d'un élément Inr. La présence de ces deux éléments peut entraîner l'initiation de la transcription et compenser ainsi une absence de boîte TATA [255].

4.2.1.2 Recherche d'îlots CpG dans la région promotrice P3 du gène RHOH

En étudiant une région plus vaste [-2590/+110], relativement au site d'initiation de la transcription (situé à l'extrémité 5' de l'exon 4), nous avons également observé la présence de petits îlots CpG, d'une taille inférieure à 200 bp. Les îlots CpG sont des séquences de 0.2 à 2Kb enrichies en dinucléotides symétriques CpG (pourcentage CpG > 50%), sites majeurs de méthylation en position C5 de la cytosine. Environ la moitié des gènes humains contiennent des îlots CpG dans leur région promotrice, éléments régulateurs de leur expression. Nous avons recherché la présence de tels îlots dans la région [-2590/+110] du promoteur P3, grâce au programme CpGPlot de *EMBOSS Explorer*, et avons ainsi détecté deux petits îlots dans la région promotrice P3 de *RHOH* : un dont la taille est inférieure à 100 bp, en position [-2250/-2150] et le second, d'une taille inférieure à 200 bp, en position [-270/-120] (**Figure 35**, page suivante). Quoique ces séquences soient de taille inférieure à la taille minimale des îlots CpG (200pb), nous considérons qu'il est important de noter qu'elles existent. La recherche d'îlots a également été réalisée sur une région couvrant les nucléotides -2260/+340, mais cette étude n'a pas donné de nouvelles informations (**données non montrées**), en particulier aucun îlot n'a été détecté entre les nucléotides +110 et +340.

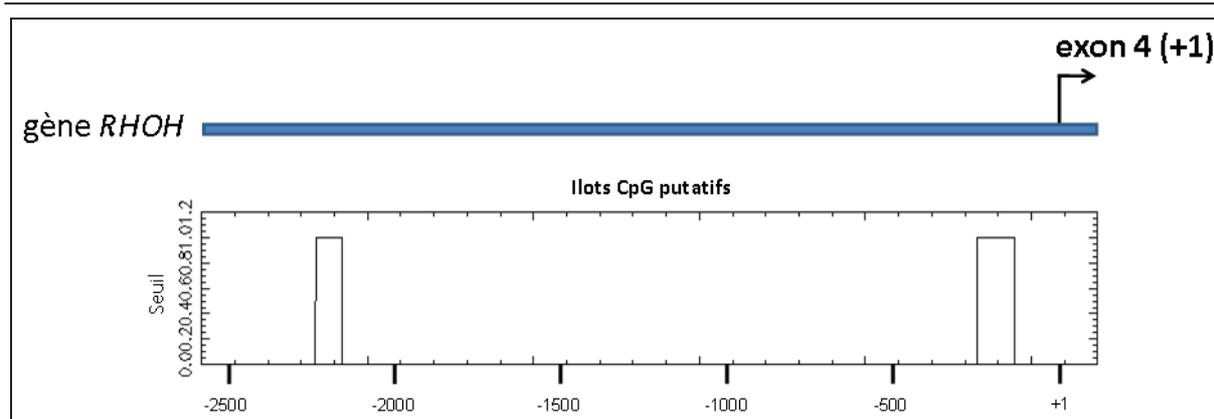


Figure 35 : Recherche d'îlots CpG dans le promoteur P3 de *RHOH*. L'analyse a été effectuée sur une région recouvrant les nucléotides [-2590/+110], en regard du site d'initiation de la transcription (+1), situé à l'extrémité 5' de l'exon 4 et à l'aide du logiciel CpGPlots du site *Emboss Explorer*. On observe 2 îlots CpG putatifs d'une taille inférieure à 200bp, longueur minimale pour un îlot CpG. Le premier se situe à [-2250/-2150] et a une taille inférieure à 100 bp. Le second se positionne entre les nucléotides [-270/-120] et sa longueur est inférieure à 200 bp.

4.2.1.3 Recherche de séquences conservées entre espèces dans la région promotrice P3 du gène *RHOH*

Une autre analyse *in silico*, consistant en l'étude des séquences conservées entre espèces, peut aussi apporter beaucoup d'informations utiles dans l'étude de la régulation d'un promoteur. En évaluant la conservation inter-espèces, nous mettons en évidence des séquences conservées au cours de l'évolution, jouant probablement un rôle dans la régulation du promoteur P3. A l'aide du site informatique *UCSC Genome Browser*, nous avons effectué cette comparaison entre espèces pour la région [-2660/+340] du promoteur P3 (**Figure 36**, ci-dessous). Nous avons ainsi détecté des régions fortement conservées entre mammifères, situées en [-1270/-1220], [-740/-560], [-330/-300], [-175/+20] et [+190/+275], et supposées contenir des éléments régulateurs importants. Toutes ces données peuvent nous aiguiller sur des régions intéressantes à cibler lors de notre caractérisation du promoteur P3 de *RHOH*.

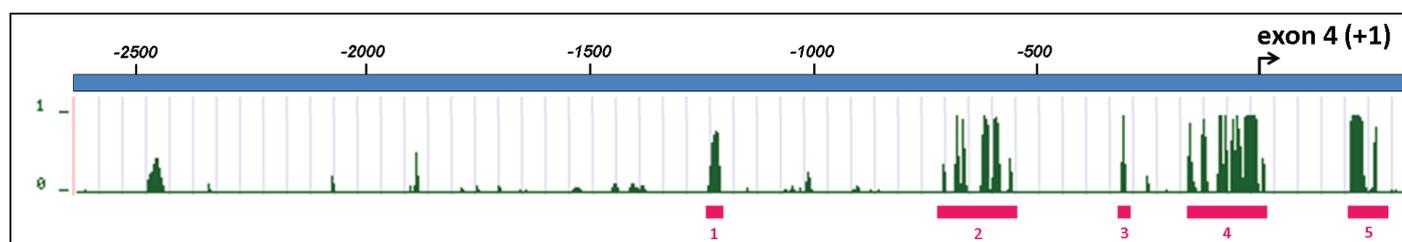


Figure 36 : Analyse de la conservation entre espèces de la région [-2660/+340] du promoteur P3 de *RHOH* en regard du site d'initiation de la transcription (+1), par approche bioinformatique. Cette étude a été effectuée grâce au site *UCSC Genome Browser* et a permis de mettre en évidence 5 zones très conservées chez les mammifères, situées respectivement entre les nucléotides : [-1270/-1220] (région conservée 1), [-740/-560] (région conservée 2), [-330/-300] (région conservée 3), [-175/+20] (région conservée 4), [+190/+275] (région conservée 5). La conservation de ces régions nous permet d'émettre l'hypothèse de la présence de séquences ADN importantes pour la régulation du gène *RHOH*, en leur sein.

4.2.1.4 Conclusion – Analyse *in silico* du promoteur P3 du gène *RHOH*

Lors de notre analyse *in silico* de la région promotrice P3 du gène *RHOH*, nous avons mis en évidence, aux alentours du site d'initiation de la transcription, une boîte TATA en position -28, d'un site initiateur en -2, un motif MTE en +18 et des éléments DCE (I, II et III) en +5, +19, +30 (**Figure 37**, ci-dessous). La présence potentielle de ces séquences sur le promoteur P3 pourrait permettre l'initiation de la transcription à l'extrémité 5' de l'exon 4. De plus, cette analyse nous a permis de détecter 2 îlots CpG en [-2250/-2150] et [-270/-120], quoique leurs tailles soient inférieures à celle fréquemment observée, ainsi que 5 zones fortement conservées entre espèces situées à [-1270/-1220], [-740/-560], [-330/-300], [-175/+20] et [+190/+275] (**Figure 37**, ci-dessous).

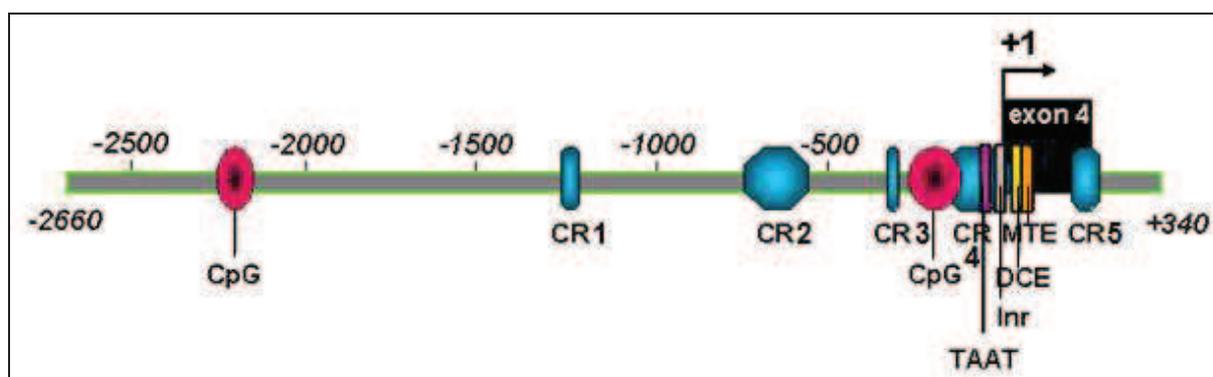


Figure 37 : Schéma récapitulatif des éléments « cis » potentiels présents sur la région promotrice P3 [-2660/+340] du gène *RHOH*, mis en évidence par analyse *in silico*. 2 îlots CpG (CpG) ont été observés entre les nucléotides [-2250/-2150] et [-270/-120]. 5 zones très conservées entre espèces (*Conserved Region*, CR) sont situées entre [-1270/-1220], [-740/-560], [-330/-300], [-175/+20] et [+190/+275]. De plus, des motifs potentiels correspondant à une boîte TATA ou TAAT, à l'élément Initiateur (Inr), aux motifs MTE (*Motif Ten Element*) et DCE I ; II et III (*Downstream Core Element*) localisés, respectivement, en positions -28, -2, +18, +5, +19 et +30 ont été représentés sur la figure.

4.2.2 Etude de la régulation du promoteur P3 du gène *RHOH* dans les cellules lymphoïdes B et de sa répression dans la leucémie à tricholeucocytes

4.2.2.1 Caractérisation du promoteur P3 minimal dans les cellules B

Les lymphocytes B ne représentent que 5-20% des leucocytes du sang périphérique, ce qui limite la faisabilité d'études de biologie moléculaire dans ces cellules. Pour notre étude

sur la régulation du gène *RHOH* dans les cellules B, nous avons donc choisi d'utiliser les lignées cellulaires lymphoïdes B : Raji, Namalwa et Daudi (*paragraphe 3.1.1.2.1, page 75*). Il s'agit de 3 lignées cellulaires dérivées de patients atteints d'un lymphome de Burkitt et qui expriment des taux élevés de transcrits *RHOH*, comme certaines lignées lymphoïdes T, telles CEM et HSB2 ou la lignée plasmocytaire U266 [2, 223]. De plus, nous avons montré dans la partie 4.1.1 (page 103) que l'expression des transcrits spécifiques de chaque site d'initiation de la transcription du gène *RHOH* est comparable entre la lignée cellulaire Raji et des lymphocytes B sains (**Figure 29**, page 105), ces résultats en font donc une lignée adéquate pour l'étude de la régulation du promoteur P3 dans les cellules B.

4.2.2.1.1 Isolement du promoteur P3 minimal entre les nucléotides [-236/+67]

En nous aidant des informations recueillies précédemment, nous avons choisi de générer plusieurs constructions plasmidiques contenant des fragments du promoteur P3 de tailles variables, afin de cerner les véritables régions régulatrices. Nous avons utilisé, pour cela, le plasmide pGL4.14[*luc2/Hygro*], appartenant à une génération de plasmides rapporteurs de la luciférase du *Photinus Pyralis*, sensible, dont l'expression a été optimisée dans les cellules de mammifères ; et ne contenant pas de promoteur en amont du gène de la luciférase. Compte tenu de la présence d'une région conservée entre espèces entre les nucléotides +190 et +275, nous avons choisi de générer deux séries de fragments du promoteur P3 (**Figure 38**, page suivante).

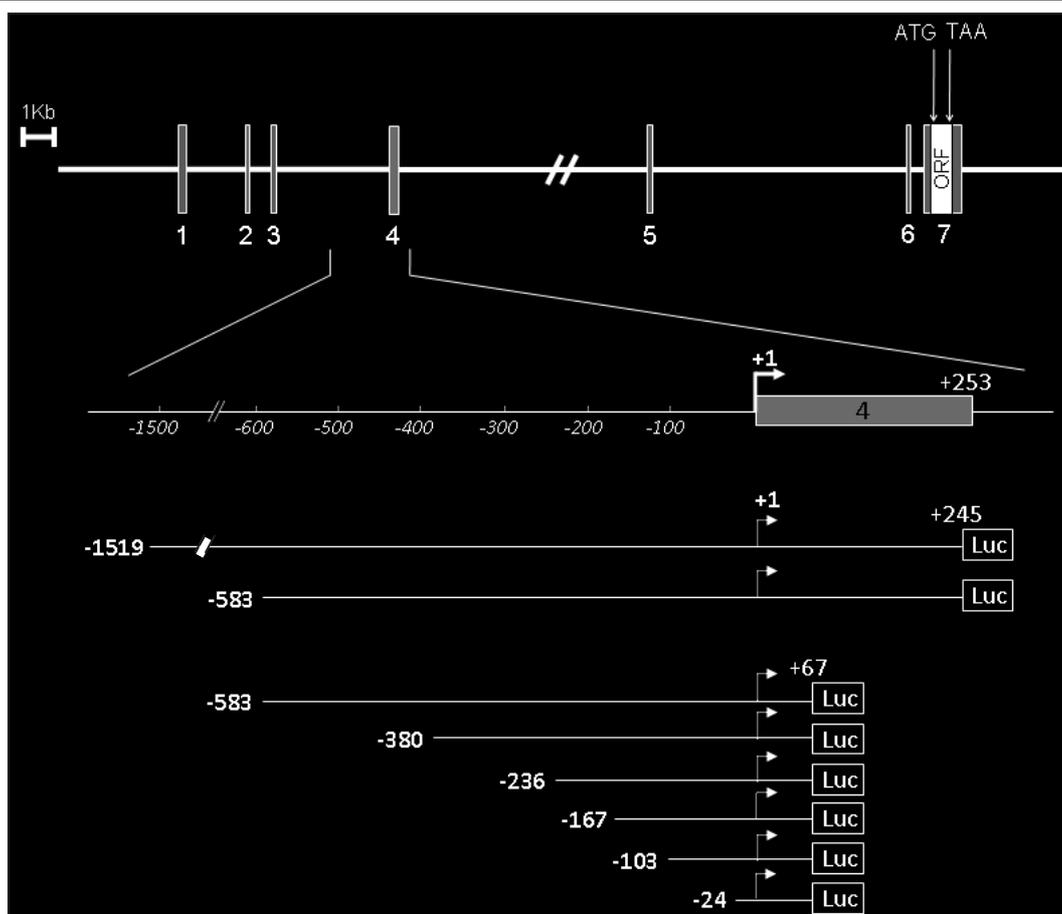


Figure 38 : Représentation du gène *RHOH* et des constructions générées pour l'étude du promoteur P3. 8 fragments dont les extrémités 5' varient entre -24 et -1519, et les extrémités 3' entre +67 et +245, ont été obtenus par PCR. Après digestion enzymatique par *HindIII*, ils ont ensuite été clonés en amont du gène codant la luciférase, dans le plasmide pGL4.14[*luc2/Hygro*] qui ne contient aucun élément promoteur.

Dans la première, les extrémités 3' des séquences ont été fixées à +245, celles-ci contiennent donc plus de la moitié de la région conservée 5 [+190/+275] et la presque totale intégralité de l'exon 4. Afin de prévenir le risque d'un épissage alternatif excisant la séquence codante de la luciférase, nous avons décidé de ne pas inclure les 8 derniers nucléotides de l'exon 4, contenant en particulier le site donneur d'épissage, à l'extrémité 3'. Les extrémités 5' de cette série de fragments ont été fixées à -1519 et -583. Nous avons ainsi obtenu une séquence nucléotidique [-1519/+245] contenant toutes les régions conservées entre espèces. Le fragment [-583/+245] est dépourvu des deux régions conservées, CR1 [-1270/-1220] et CR2 [-740/-560]. L'étude de ces deux séquences nous permet de déterminer l'importance de ces deux régions CR1 et CR2 dans le contrôle de l'activité du promoteur P3. La seconde série est constituée de fragments dont les extrémités 3' ont été fixées à +67, excluant ainsi la région conservée [+190/+245] (ainsi que l'uORF présente dans l'exon 4 entre les nucléotides

+127/+158) et les extrémités 5' aux nucléotides -583, -380, -236, -167, -103 et -24. D'une part, ces différentes constructions nous permettent d'étudier le rôle des régions conservées comme la région CR3, en comparant les séquences [-380/+67] et [-236/+67], la région CR4 contenue ou non dans les fragments [-236/+67] et [-167/+67]. D'autre part, ces constructions permettent de cerner des régions régulatrices plus courtes, par délétions successives de 70 bp environ (fragments [-236/+67], [-167/+67], [-103/+67] et [-24/+67]). Nous avons cloné ces fragments dans le plasmide pGL4.14[*luc2/Hygro*] après coupure enzymatique par *Hind*III. Nous avons ensuite analysé l'activité promotrice de chaque construction en les transfectant dans 3 lignées lymphoïdes B (Raji, Namalwa et Daudi) et en quantifiant l'activité enzymatique de la luciférase. Comme contrôle de l'efficacité de transfection, nous avons utilisé le vecteur pRSV- β GAL permettant la synthèse de la β -galactosidase. L'activité du promoteur a donc été évaluée par le quotient de l'activité enzymatique de la luciférase sur celle de la β -galactosidase, et représentée relativement à celle du plasmide vide pGL4.14[*luc2/Hygro*], dont l'activité a été fixée arbitrairement à 1 (**Figure 39**, ci-dessous).

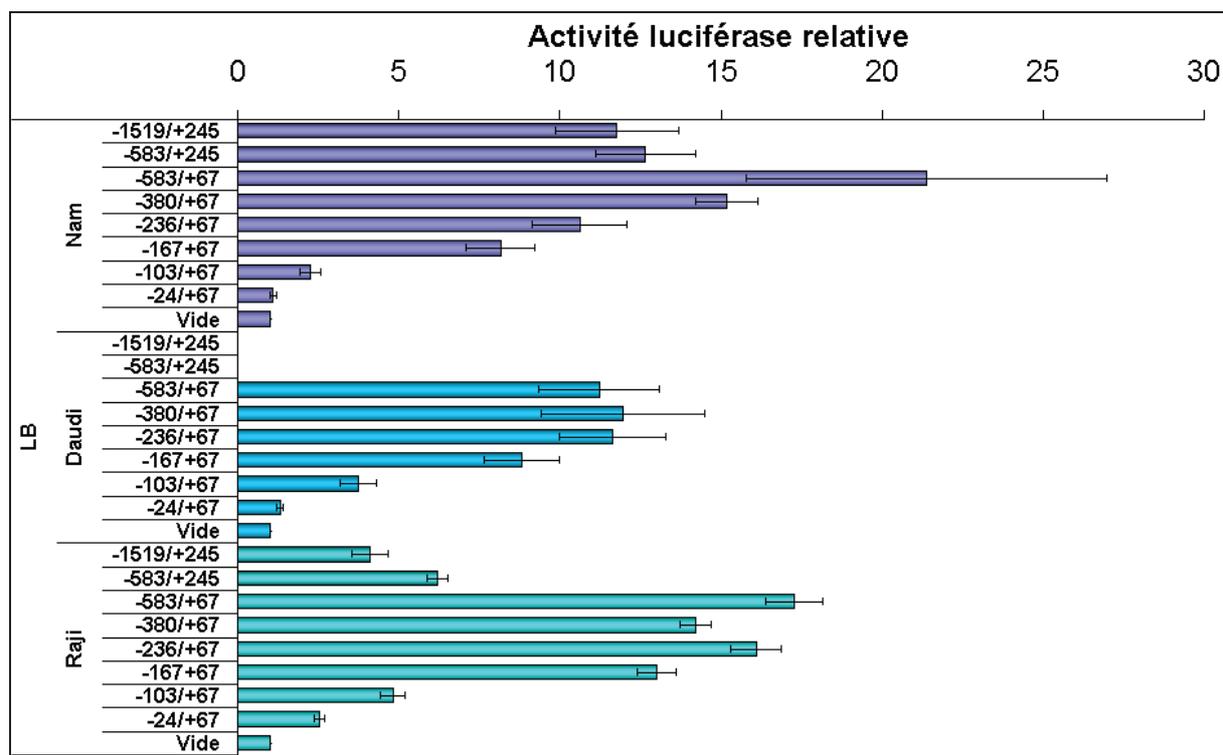


Figure 39 : Etude du promoteur P3 de *RHOH* dans 3 lignées cellulaires lymphoïdes B. Les constructions plasmidiques générées (détaillées **Figure 38**, page 118) ont été transfectées dans les lignées Raji, Daudi et Namalwa, par électroporation. Après 48 heures de culture, les cellules ont été récupérées et l'activité promotrice évaluée. Pour quantifier celle-ci et prendre en compte l'efficacité de chaque transfection, un plasmide exprimant la β -galactosidase (pRSV- β GAL) a été transfecté en présence des constructions étudiées. L'activité promotrice a été calculée en faisant le quotient des activités enzymatiques de la luciférase et la β -galactosidase, pour chaque échantillon et représentée par rapport au plasmide vide, dont l'activité a été fixée arbitrairement à 1. Deux constructions, contenant les fragments d'ADN les plus longs [-583/+245] et [-1519/+245], n'ont pas été analysées dans la lignée cellulaire Daudi.

Dans ces lignées cellulaires de type B, nous avons observé des activités promotrices maximales de 12 à 17 (unités arbitraires) pour les fragments comportant les séquences de [-167/+67] à [-583/+67]. Il est intéressant de noter que ces zones présentant le maximum d'activité promotrice P3 sont celles dans lesquelles sont situées des séquences fortement conservées entre espèces (régions conservées 2, 3 et 4, **Figure 37**, page 116). Dans le cas des lignées cellulaires Raji et Daudi, la construction [-236/+67] contient la séquence minimale permettant d'obtenir l'activité promotrice maximale. Dans les cellules Namalwa, une activité maximale est obtenue pour le fragment [-583/+67], suggérant la présence de sites de fixation potentiels pour des facteurs de transcription entre ces nucléotides et dont l'activité est modulée dans cette lignée cellulaire. Nous pouvons émettre l'hypothèse de la présence de ces éléments « cis » dans les régions conservées 2 et 3 (**Figure 37**, page 116). Cependant, malgré la différence observée entre la lignée Namalwa comparée aux lignées Raji et Daudi, nous avons considéré la construction [-236/+67] comme étant le promoteur P3 minimal dans ces cellules B.

Ces expériences ont aussi montré une augmentation d'un facteur 2.65 de l'activité promotrice P3 entre les fragments [-167/+67] (de 8.15 à 13 unités) et [-103/+67] (de 2.3 à 4.8 unités) ; et d'un facteur 2.34 entre les régions [-103/+67] (de 2.3 à 4.8 unités) et [-24/+67] (de 1.1 à 2.5 unités), dans les 3 lignées étudiées. Ceci suggère la présence d'un élément activateur entre les nucléotides -167 et -103, et entre les positions -103 et -24, respectivement. Nous avons également pu observer des activités promotrices différentes pour les constructions dont l'extrémité 3' a été fixée à +245, dans les lignées cellulaires Raji et Namalwa (la lignée Daudi n'ayant pas été étudiée pour les fragments plus longs en 3'). Compte-tenu des valeurs d'activité promotrice obtenues (17.5, 6.5 et 21.5, 12 unités) pour les constructions [-583/+67] et [-583/+245], respectivement, dans les lignées cellulaires Raji et Namalwa, nous pouvons émettre l'hypothèse d'éléments « cis » répresseurs entre les nucléotides +67 et +245. Soulignons la présence d'une région conservée chez les mammifères entre les nucléotides +190 et +275.

4.2.2.1.2 Conclusion - Caractérisation du promoteur P3 minimal dans les cellules B

L'ensemble des données obtenues précédemment a été regroupé dans le schéma récapitulatif suivant :

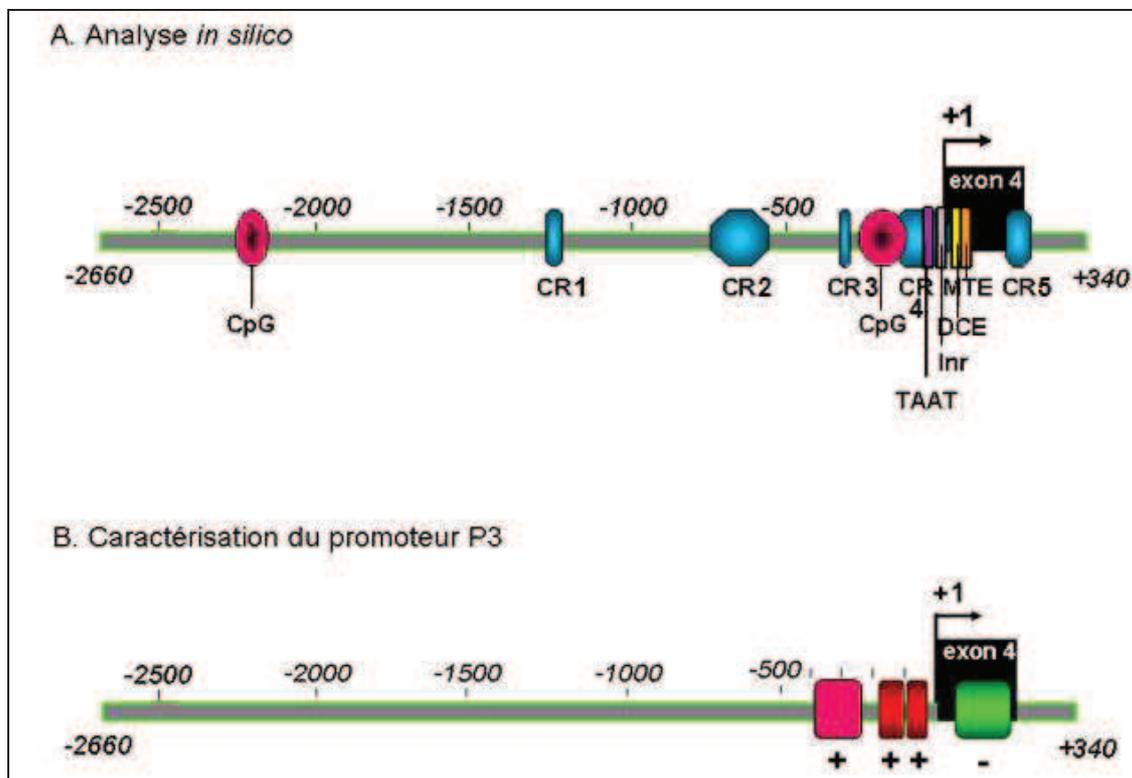


Figure 40 : Schéma récapitulatif des informations obtenues de l'analyse *in silico* de la région promotrice P3 [-2660/+340] et de la caractérisation du promoteur minimal P3. A. L'analyse *in silico* de la région [-2260/+340] a permis de mettre en évidence 2 îlots CpG (CpG) entre les nucléotides [-2250/-2150] et [-270/-120]. 5 zones très conservées entre espèces (*Conserved Region*, CR) sont situées entre les nucléotides [-1270/-1220], [-740/-560], [-330/-300], [-175/+20] et [+190/+275]. De plus des motifs potentiels correspondant à une boîte TATA, à un élément Initiateur (Inr), aux motifs MTE (*Motif Ten Element*) et DCE I ; II et III (*Downstream Core Element*) localisés, respectivement, en -28, -2, +18, +5, +19 et +30 ont été représentés sur la figure. B. La caractérisation du promoteur P3 minimal dans les cellules B a été réalisée par transfection transitoire de constructions plasmidiques de fragments du promoteur dans les lignées Raji, Daudi et Namalwa. Nous avons ainsi déterminé la présence d'un élément « cis » répresseur entre les nucléotides +67 et +245, de deux séquences activatrices entre les nucléotides [-167/-103] et [-103/-24]. De plus, la séquence [-380/-236] semble contenir des sites activateurs du promoteur, uniquement dans le cas de la lignée Namalwa.

4.2.2.2 Recherche de facteurs de transcription régulant le promoteur P3 minimal dans les cellules B

Dans le chapitre Introduction, nous avons décrit des résultats bibliographiques montrant que RhoH intervient dans l'initiation de l'activation lymphocytaire B ; ceci suggère

que la protéine RhoH soit impliquée dans les événements précoces de l'activation et aussi dans la transduction du signal du BCR par les voies calcique et du DAG. L'expression de RhoH doit donc être induite pour renforcer ce signal puis ensuite réprimée, afin que l'activation cellulaire soit contrôlée. Notre hypothèse est que ces mêmes voies de signalisation réguleraient l'activité transcriptionnelle du gène *RHOH* dans les cellules B. Afin d'étudier l'implication de ces voies (calcique et du DAG) dans la régulation du promoteur P3 du gène *RHOH*, nous avons décidé d'utiliser un modèle non physiologique consistant en l'utilisation de molécules chimiques pour induire ces voies dans des lignées cellulaires lymphoïdes B (Raji et Daudi). Nous avons donc utilisé séparément un analogue du diacylglycérol, le PMA ou Phorbol-12-Myristate-13-Acétate et un ionophore pour le calcium, la ionomycine, pour activer ces deux voies respectives. Le plasmide pGL4.14[*luc2/Hygro*] contenant ou non la séquence du promoteur P3 minimal [-236/+67] a été transfecté dans les cellules Raji et Daudi et les cellules ont ensuite été réparties dans des milieux de culture contenant soit du DMSO (DiMéthylSulOxyde, solvant des molécules PMA et ionomycine) soit du PMA, soit de la ionomycine, durant 48 heures. Après évaluation de l'activité du promoteur, nous avons obtenu les résultats représentés **Figure 41** (ci-dessous).

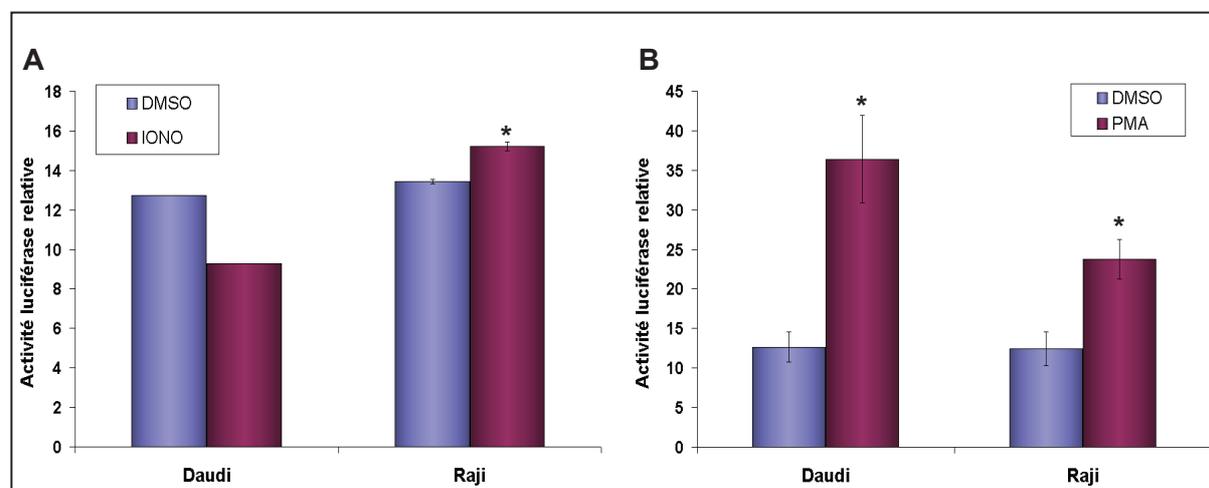


Figure 41 : Régulation du promoteur P3 du gène *RHOH* suite à la stimulation des voies de signalisation calcique ou du diacylglycérol dans deux lignées cellulaires B. Après transfection du plasmide contenant la séquence du promoteur P3 dans les cellules Raji et Daudi, les cellules ont été mises en culture 48 heures en présence soit de DMSO (DiMéthylSulfOxyde, contrôle négatif), soit de ionomycine (5 μ M) soit de PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acétate, 100ng/mL). L'activité promotrice a ensuite été évaluée comme expliqué **Figure 39** page 119. Les résultats obtenus par stimulation par la ionomycine, représentés en A, correspondent à 1 expérience pour les cellules Daudi et à la moyenne de 2 expériences pour Raji. Les moyennes de 3 expériences de stimulation des lignées cellulaires Raji et Daudi par le PMA ont été représentées dans la partie B de la figure. *, $p < 0.05$.

La stimulation par la ionomycine induit des phénomènes différents selon la lignée étudiée. En effet, en présence de cette molécule, l'activité promotrice de P3 augmente de 12 % dans la lignée Raji. Au contraire, dans la lignée Daudi, nous observons une inhibition de l'activité du promoteur P3 de 27 %. Ces résultats nous montrent que les facteurs de transcription régulés par la voie calcique régulent différemment le promoteur P3 de *RHOH* dans les lignés cellulaires Raji et Daudi. Il serait intéressant de connaître ces facteurs. Cependant, il nous a paru plus simple de se focaliser tout d'abord sur la voie de signalisation du DAG pour laquelle la variation de l'activité du promoteur P3 est similaire dans les deux lignées et pourrait être le reflet d'un mécanisme commun aux cellules B. Dans le premier cas (Raji), nous observons une augmentation de l'activité du promoteur P3 d'un facteur 1,9 (de 12,5 à 23,8 unités), et dans le second cas (Daudi), une élévation de l'activité promotrice d'un facteur 2.9 par rapport au contrôle (de 12,7 à 36,4 unités). Ces résultats suggèrent donc que le promoteur P3 de *RHOH* est régulé dans les cellules B par des facteurs de transcription contrôlés par la voie du DAG, résultats corrélés à l'augmentation du taux de transcrits *RHOH* observés suite à l'activation de la voie du DAG par le PMA dans la lignée Raji (**données non montrées**). Des facteurs de transcription dont l'activité est modulée par cette voie, tels que NFκB, AP1 ou ceux dépendant de la voie Ras, seraient donc impliqués dans le contrôle positif du promoteur P3 dans ces cellules B [256].

4.2.2.2.1 Rôle du complexe AP1 dans la régulation de P3 dans les cellules B

4.2.2.2.1.1 Recherche par analyse *in silico* de sites de fixation potentiels pour le facteur AP1 dans le promoteur P3 de *RHOH*

L'activation du facteur de transcription AP1 est dépendante de voies de signalisation impliquant la JNK (Jun Kinase) et d'autres MAPK comme ERK1/2. Ce dimère AP1 s'associe à un motif ADN palindromique (5'-TGAG_CTCA-3') pour réguler l'expression des gènes cibles [257]. Notre hypothèse de travail a été que suite à l'induction de la voie de signalisation du DAG, certains facteurs de transcription tels que AP1 seraient activés et contrôleraient positivement le promoteur P3 de *RHOH* dans les cellules B telles Raji et Daudi. L'analyse *in silico* de la séquence [-236/+67] du promoteur P3 minimal, à l'aide des programmes *TFSearch*, *MatchP* et *Genomatix*, a révélé la présence de deux éléments « cis » sur cette séquence, sites consensus pour le facteur de transcription AP1 (AP1#1 et AP1#2) non loin du site d'initiation de la transcription, en positions [-50/-44] et [-14/-20] en amont de celui-ci et

respectivement en sens et en anti-sens (Figure 42, ci-dessous). Ces deux sites correspondent plus ou moins parfaitement à la séquence consensus (TGACTCA) décrite pour ce facteur de transcription dans la littérature [257]. En parallèle, nous avons analysé la conservation entre espèces de ces sites à l'aide du programme *UCSC Genome Browser*. Les résultats de notre analyse montrent que ces sites sont conservés entre espèces (quoiqu'imparfaitement), suggérant qu'ils pourraient intervenir dans la régulation du promoteur P3 du gène *RHOH*.

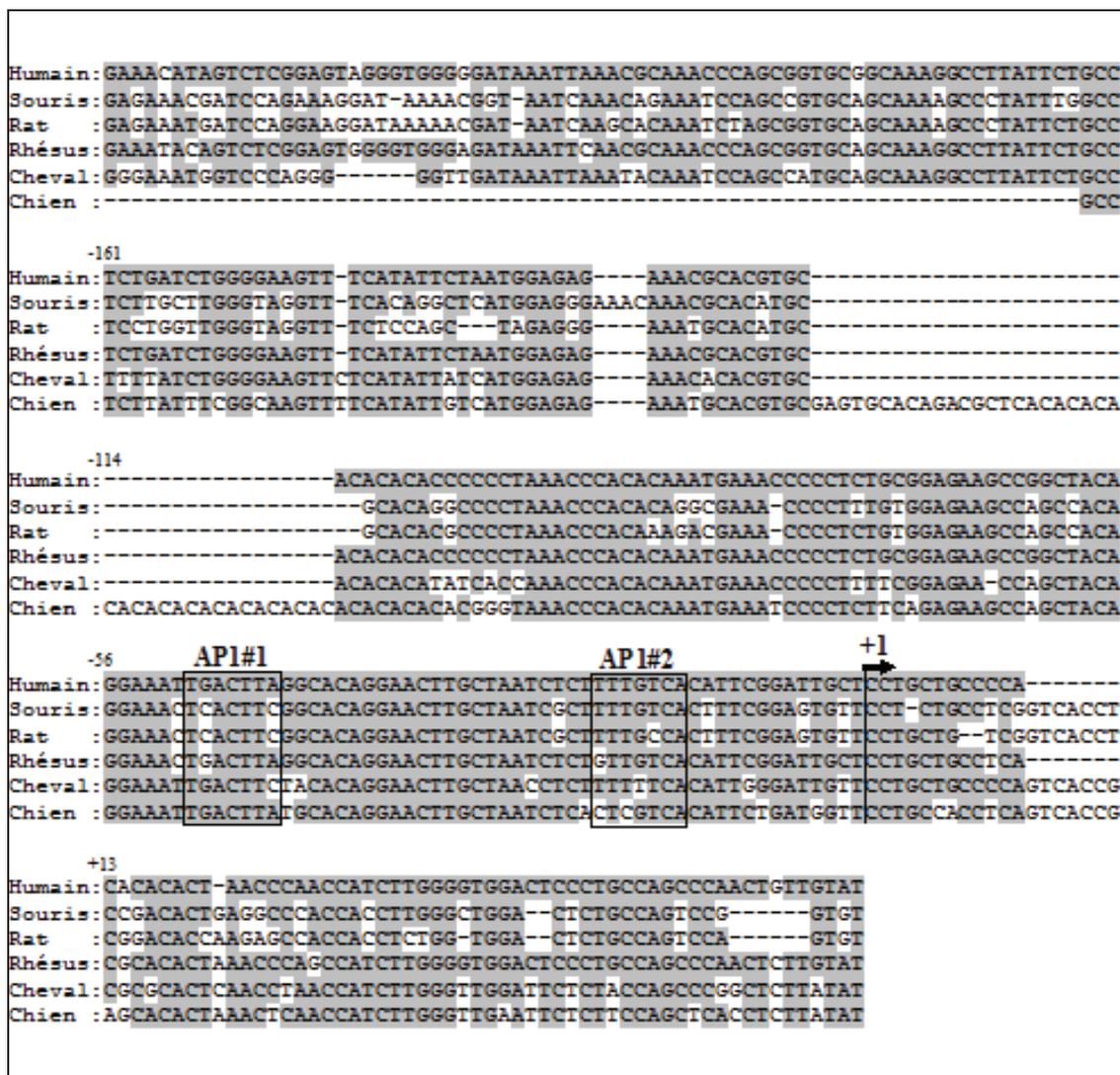


Figure 42 : Le promoteur P3 de *RHOH* contient deux sites putatifs pour le facteur de transcription AP1 conservés au cours de l'évolution [11]. La séquence ADN du promoteur P3 humain, s'étendant des nucléotides -236 à +67 en regard du site d'initiation de la transcription, a été comparée aux séquences des régions équivalentes chez la souris, le rat, le macaque rhésus, le cheval et le chien, avec des identités respectives de 72.3%, 70.3%, 95.7%, 82.8% et 64%, représentées par un surlignage gris. 2 sites de fixation consensus pour le complexe AP1 ont été mis en évidence (AP1#1 et AP1#2), localisés respectivement entre les nucléotides -50 et -44 pour AP1#1 et entre -20 et -14 pour AP1#2, en regard du site d'initiation de la transcription situé à l'extrémité 5' de l'exon 4.

4.2.2.1.2 Implication des sites de fixation potentiels pour AP1 dans la régulation du promoteur P3

La possible implication du complexe AP1 dans la régulation du promoteur P3 du gène *RHOH* a été étudiée en générant des mutations dans la séquence [-236/+67], au niveau des sites de fixation potentiels pour ce facteur de transcription. Nous avons ainsi généré 3 constructions supplémentaires (Δ AP1#1, Δ AP1#2 et Δ AP1#1- Δ AP1#2), où les sites AP1#1 et AP1#2 ont été mutés soit individuellement, soit de façon combinée (respectivement, TGA~~CTTA~~ → CAGCTTA, et TGACA~~AAA~~ → CAGCAAA). L'activité promotrice de ces nouvelles constructions a ensuite été évaluée dans les lignées cellulaires Raji, Daudi et Namalwa, en absence de PMA, et comparée à celle du promoteur sauvage (Figure 43, ci-dessous).

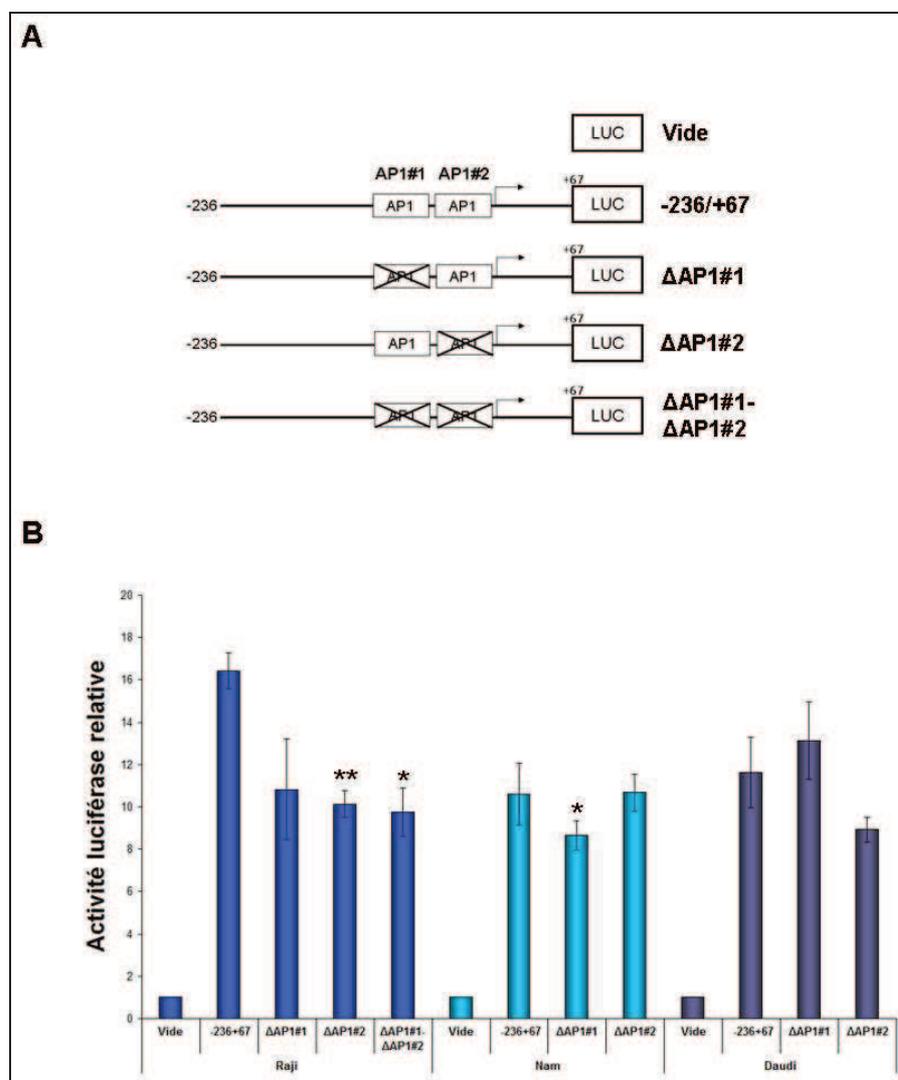


Figure 43 : Etude du rôle des sites consensus du facteur AP1 dans la régulation du promoteur P3 du gène *RHOH*.

A. Représentation des constructions du promoteur P3 dans lesquelles les sites AP1#1 et AP1#2 ont été mutés de façon isolée ou combinée, générant les plasmides Δ AP1#1, Δ AP1#2 ou Δ AP1#1- Δ AP1#2. B. Les différentes constructions représentées en A ont été transfectées dans les lignées cellulaires lymphoïdes B Raji, Namalwa et Daudi. L'activité promotrice a été évaluée comme expliqué Figure 39, page 119.

Nous avons ainsi observé des variations dues à l'effet des mutations. La mutation du site AP1#1 induit une inhibition de l'activité du promoteur P3 dans les cellules Raji et Namalwa, respectivement, de 34% et 18.5% mais pas dans les cellules Daudi. La mutation du site AP1#2 réprime le promoteur P3 dans les cellules Raji et Daudi, respectivement de 38% et 24% mais pas dans les cellules Namalwa. La mutation combinée des deux sites induit une répression identique à celle obtenue en mutant le site AP1#2 dans la lignée cellulaire Raji (soit 40.5% d'inhibition). Même si les effets sont variables, nous pouvons dire que la mutation d'un de ces deux sites réprime le promoteur P3, suggérant que, quelque soit le site étudié, le complexe AP1 régule positivement l'activité promotrice de P3 dans les cellules B et ceci même en absence de PMA. Ces résultats sont corrélés à l'augmentation de l'activité du promoteur observée après stimulation par le PMA (**Figure 41**, page 122) et montrent qu'en présence ou absence de cette molécule, la voie de signalisation du DAG régule positivement le promoteur P3 du gène *RHOH* dans les lignées Raji, Daudi et Namalwa. Notre hypothèse serait que ces voies de signalisation soient déjà stimulées dans les cellules Raji et Daudi, qui sont caractérisées par la présence d'un marqueur d'activation précoce, le CD38, à leur surface cellulaire (**données non montrées**).

Initialement, la forte expression des transcrits totaux du gène *RHOH* a été évaluée dans ces cellules en absence de toute stimulation extérieure. Notre hypothèse est que, dans ces lignées lymphoïdes B, les facteurs régulés par la voie du DAG sont déjà activés et régulent positivement le gène *RHOH* sans stimulation supplémentaire. La suite de notre étude sur l'identification des mécanismes moléculaires régulant le promoteur P3 sera donc effectuée en absence de PMA. L'étape suivante a donc été d'identifier les partenaires composant le complexe AP1 impliqué dans la régulation du promoteur P3. Nous avons alors essayé de mettre en évidence si un des membres de la famille Jun, éléments du complexe AP1, était impliqué dans la régulation du promoteur P3, dans ces cellules B. En effet, le facteur de transcription AP1 existe sous deux formes, soit un homodimère composé exclusivement des membres de la famille Jun (cJun, JunB et JunD, protéines de type *basic Leucine Zipper* ou « fermeture en leucine »), soit un hétérodimère, par association d'un membre de la famille Jun principalement à un membre de la famille Fos (cFos, FosB, Fra-1 et Fra-2) mais aussi à un membre de la famille Maf (*v-Maf MusculoAponeurotic Fibrosarcoma oncogene homolog*, c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K and Nrl) ou de la famille ATF (*Activating Transcription Factor*, ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) [258]. Chacune de ces protéines est exprimée et régulée différemment selon le type cellulaire, ce qui confère des fonctions subtilement différentes selon la nature du complexe AP1. Nous avons tout d'abord étudié

l'implication des membres de la famille Jun et ceux de la famille Fos dans la régulation du promoteur P3 dans les cellules lymphoïdes B.

4.2.2.2.1.3 Influence de l'inhibition des voies de régulation du complexe AP1 sur l'activité du promoteur P3

En parallèle de l'étude des mutations des sites potentiels pour le facteur de transcription AP1 présents sur le promoteur P3, nous avons étudié l'effet de l'inhibition des voies de régulation des protéines Jun et Fos sur l'activité du promoteur P3. Pour cela, nous avons inhibé tout d'abord l'activité de JNK, kinase responsable entre autre de l'activation des membres de la famille Jun, par la molécule SP600125, puis la voie de régulation des familles Fos et Jun par un inhibiteur de MEK1/2, U0126 (**Figure 44**, ci-dessous). Nous avons observé une diminution de 17% de l'activité du promoteur P3 suite à l'inhibition de JNK par le SP600125, corrélée aux résultats obtenus après mutation des sites AP1#1 et AP1#2 (**Figure 43**, page 125). Ceci suggère qu'il existe bien une régulation positive exercée par un membre de la famille Jun sur le promoteur P3. L'inhibition de AP1 (membres Fos et Jun) par U0126, quant à elle, entraîne une répression de 34%, plus intense que celle observée avec SP600125. Un des membres de la famille Fos serait donc partenaire d'un membre de la famille Jun pour réguler positivement le promoteur P3 de *RHOH*.

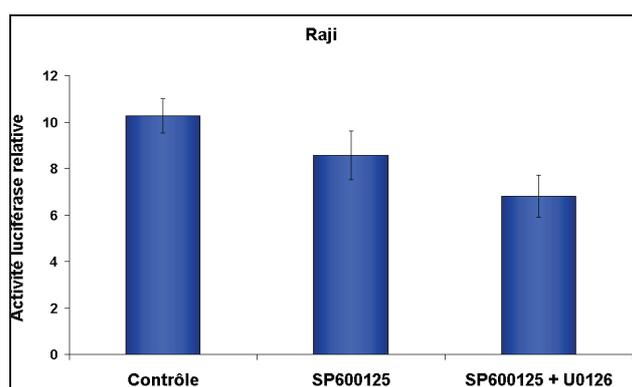


Figure 44 : Etude du rôle des membres des familles Jun et Fos dans la régulation du promoteur P3 du gène *RHOH*. Après transfection du plasmide contenant la séquence minimale du promoteur P3, les cellules Raji ont été mises 48 heures en culture en présence d'un inhibiteur de la Jun Kinase (SP600125, 30 μ M) ou de SP600125 combiné à un inhibiteur de MEK1/2 (U0126, 20 μ M). L'activité promotrice a ensuite été évaluée comme expliqué précédemment.

4.2.2.2.1.4 Rôle des protéines Jun (cJun, JunD et JunB) du complexe AP1 dans la régulation du promoteur P3

Le complexe AP1 est constitué par l'association de deux partenaires, dont font partie les membres de la famille Jun (cJun, JunB et JunD). Ce sont ces protéines qui se fixent à l'ADN au niveau de leurs sites consensus. Pour étudier l'implication des membres de la famille Jun, nous avons tout d'abord utilisé un plasmide exprimant un dominant négatif de la famille Jun (TAM67, correspondant à la séquence cJun sans son domaine transactivateur), puis évalué l'influence de son expression sur l'activité du promoteur P3 de *RHOH* dans la lignée cellulaire Raji, où nos deux mutants Δ AP1#1 et Δ AP1#2 ont montré le plus d'efficacité (**Figure 43**, page 125, [259]). Nous avons alors observé une répression de 10% du promoteur P3, ceci suggérant que les membres de la famille Jun régulerait positivement mais très faiblement l'activité du promoteur P3 de *RHOH* (**Figure 45**, ci-dessous).

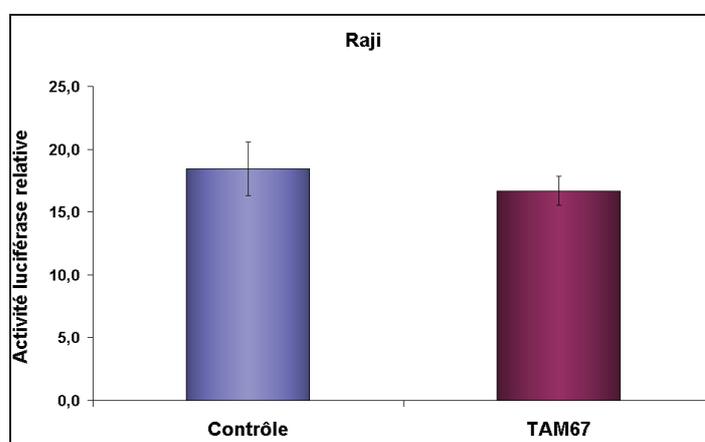


Figure 45 : Etude de la surexpression du dominant négatif de la famille Jun (TAM67) sur l'activité du promoteur P3 de *RHOH* dans la lignée cellulaire B Raji. Nous avons cotransfecté le plasmide soit vide, soit exprimant TAM67 en présence du plasmide pGL4.14[luc2/Hygro] contenant ou non la séquence du promoteur [-236/+67]. Après 48 heures de culture, l'activité du promoteur a été évaluée comme précisé précédemment.

Nous avons voulu approfondir cette étude, soit en invalidant les membres cJun, JunB ou JunD, soit en les surexprimant individuellement et en évaluant l'impact de cette modulation d'expression sur l'activité du promoteur, dans la lignée cellulaire Raji. Les résultats sont montrés **Figure 46**, page suivante.

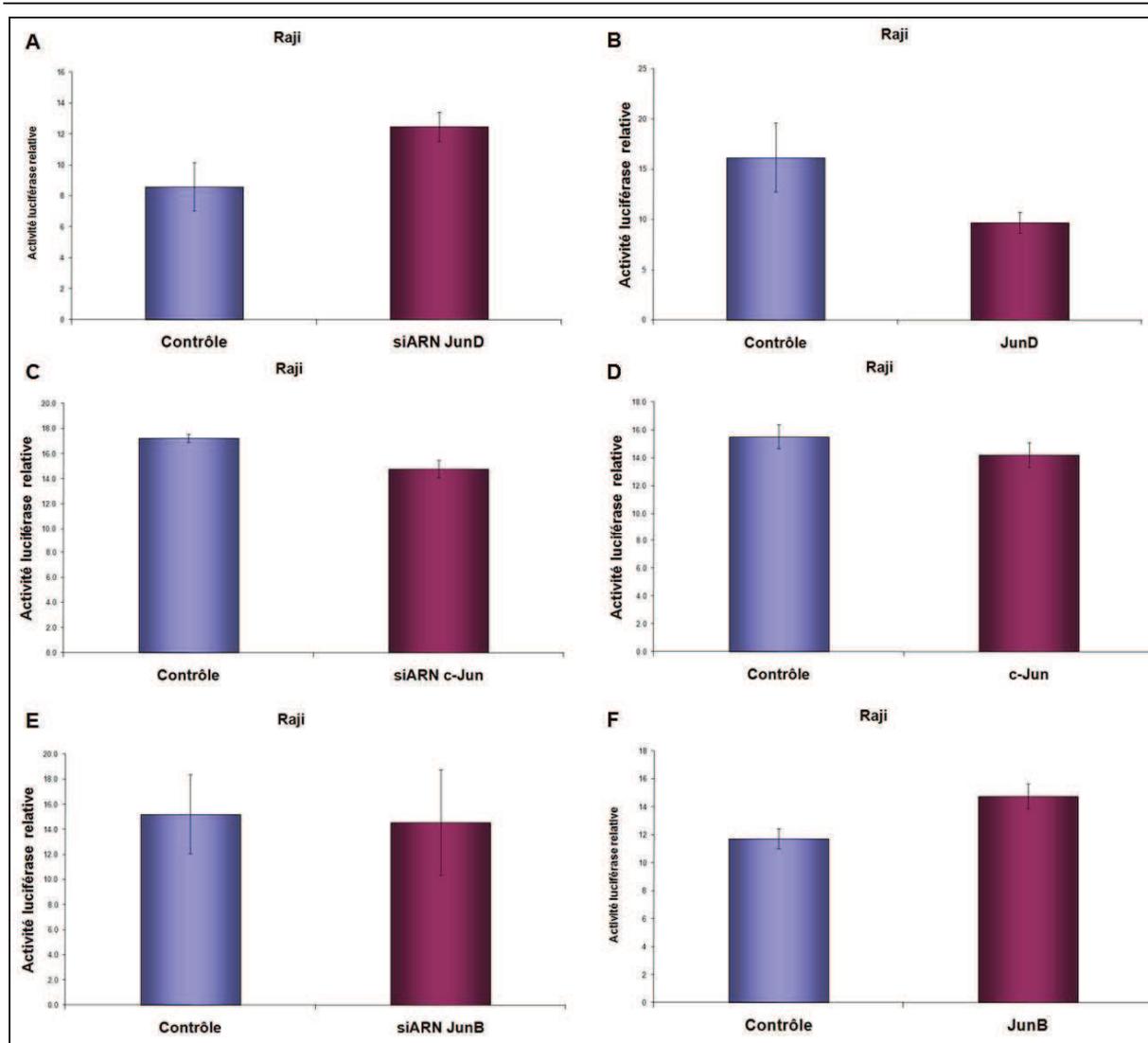


Figure 46 : Etude du rôle de chacun des membres de la famille Jun sur l'activité du promoteur P3 de *RHOH*, par invalidation ou surexpression dans la lignée cellulaire Raji. Des siRNA ciblant JunD (A), cJun (C) ou JunB (E) et des plasmides permettant l'expression de JunD (B), de cJun (D) ou de JunB (F) dont l'efficacité a été confirmée soit par RT-PCR quantitative, soit par Western Blot ont été transfectés dans la lignée Raji. Après 48 heures de culture, nous avons quantifié l'activité du promoteur P3 de *RHOH*.

L'invalidation de JunD augmente de 53% le taux de transcrits *RHOH* endogènes (Figure 46 partie A, ci-dessus). Au contraire, sa surexpression inhibe de 40% l'activité du promoteur P3. Ceci montre que le membre JunD de la famille Jun agit en tant que répresseur sur le promoteur P3 (Figure 46 partie B, ci-dessus). Qu'en est-il des autres facteurs ? De manière surprenante, l'invalidation et la surexpression de cJun conduisent toutes deux à une diminution de l'activité du promoteur P3 (respectivement de 14% et 8%) (Figure 46 parties C et D, ci-dessus). Ces résultats suggèrent que l'implication de cJun dans la régulation du gène *RHOH* est pratiquement nulle. L'étude du rôle de JunB dans le contrôle de l'activité du

promoteur P3 du gène *RHOH*, par invalidation et surexpression, montre que ce facteur de transcription semble agir comme un activateur transcriptionnel : la surexpression de JunB induit une augmentation de 26% de l'activité promotrice (**Figure 46 partie F**, page précédente). Nous pouvons expliquer les résultats obtenus par l'invalidation et la surexpression de JunB : soit ce facteur est exprimé dans ces cellules et l'invalidation n'a pas été suffisamment importante pour influencer l'activité du promoteur P3 ; soit la surexpression de JunB modifie la composition des complexes formés associés aux sites AP1 du promoteur P3, déplaçant ainsi celui constitué de JunD. La première hypothèse reste cependant préférentielle compte tenu de la régulation positive du promoteur P3 par un membre de la famille Jun suggérée par les résultats précédents (page 127). Nous avons donc mis en évidence que JunD régule négativement le promoteur P3 et que JunB interviendrait également dans cette régulation mais de façon plus subtile.

4.2.2.2.1.5 Etude du rôle répresseur de JunD sur la transcription endogène du gène *RHOH*

Compte tenu de nos précédents résultats, nous nous sommes focalisés sur l'implication de JunD dans le contrôle de la région promotrice P3 du gène *RHOH*. Par la méthode utilisée (technique de gène rapporteur), nous avons mis en évidence un phénomène non physiologique. Pour se rapprocher de ce qu'il se passe dans une cellule, nous avons d'abord vérifié si la variation de l'expression du facteur de transcription JunD modifiait la transcription du gène *RHOH* endogène. Par RT-PCR quantitative, nous avons alors pu évaluer que l'invalidation de JunD par ARN interférence n'entraîne pas seulement une augmentation de 45% de l'activité du promoteur P3 mais aussi de 53% de la quantité des transcrits totaux du gène *RHOH* (**Figure 47**, page suivante). Pour prouver qu'il n'existe pas de mécanismes de compensation par les promoteurs P1 et P2, nous avons évalué la quantité des transcrits initiés en amont des exons 1, 2 et 4 par RT-PCR quantitative et chimie SYBR® Green, suite à l'invalidation ou à la surexpression du facteur JunD dans la lignée cellulaire Raji (**données non montrées**) [11]. Nous avons ainsi confirmé que les effets observés sur les ARN messagers *RHOH* suite à la modulation de l'expression du facteur JunD reflètent bien l'action de ce dernier sur les isoformes issues de l'activité du promoteur P3. Le rôle de JunD en tant que répresseur de la transcription du gène *RHOH* a donc été montré par mesure de l'activité promotrice et par quantification des transcrits *RHOH* endogènes. JunD agit-il de manière directe en se fixant sur le promoteur de *RHOH* ?

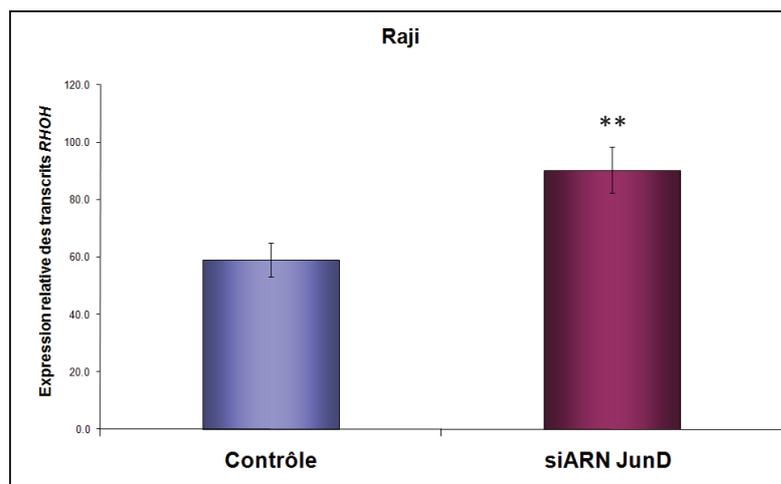


Figure 47 : Etude de l'invalidation de JunD par ARN interférence sur la transcription du gène *RHOH* endogène dans la lignée cellulaire B Raji. Les cellules Raji ont été transfectées par un ARN interférent ciblant les transcrits du gène *JUND* ou un ARN interférent contrôle. Après 48 heures de culture, la quantité de transcrits *RHOH* totaux a été évaluée par RT-PCR quantitative (chimie TaqMan). **, $p < 0.01$.

4.2.2.2.1.6 Etude de la fixation de JunD sur les sites consensus AP1#1 et AP1#2 du promoteur P3 de *RHOH*

Une étude de retard en gel (EMSA) nous a permis de montrer la fixation spécifique de JunD sur les sites AP1#1 et AP1#2. Des extraits protéiques nucléaires de la lignée Raji et un fragment d'ADN double brin de 40 bp radiomarqué à son extrémité 5' et recouvrant le site AP1#1 ou le site AP1#2 du promoteur P3, ont été mis en contact. Le retard de migration de la sonde, visualisé sur gel d'acrylamide non dénaturant indique la fixation d'un facteur de transcription sur sa séquence consensus. Dans cette technique d'EMSA, l'utilisation d'un anticorps spécifique du facteur associé suspecté permet d'observer un retard encore plus marqué, confirmant la nature du facteur. Ici, un retard un peu plus important a été obtenu pour les sondes AP1#1 et AP1#2 après utilisation d'un anticorps anti-JunD, suggérant une fixation potentielle de JunD sur ces sites (**Figure 48**, page suivante).

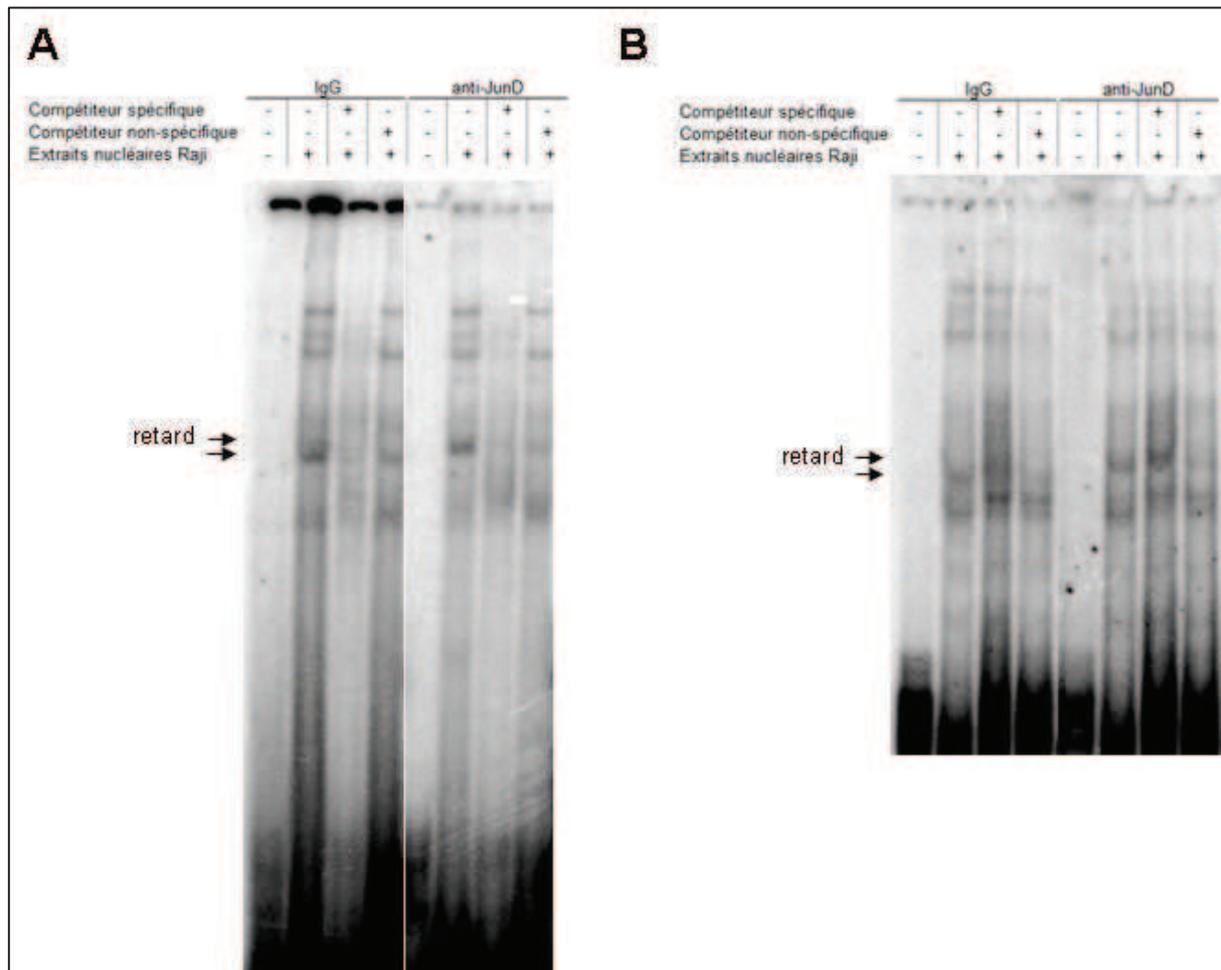


Figure 48 : Etude par retard en gel de la fixation de JunD sur les sites AP1#1 (partie A) et AP1#2 (partie B). Après radiomarquage des sondes double brin, ces dernières sont mises en contact avec les extraits protéiques nucléaires de la lignée Raji, en présence ou non de compétiteurs spécifiques ou non spécifiques du site consensus AP1 et d’une Immunoglobuline G (IgG) ou d’un anticorps dirigé spécifiquement contre JunD. Les flèches indiquent la fixation spécifique de JunD et un retard observé après utilisation de l’anticorps anti-JunD.

En parallèle, nous avons vérifié la fixation de JunD aux sites AP1#1 et AP1#2 du promoteur P3 endogène dans la lignée Raji, par immunoprécipitation de la chromatine. Cette technique permet de détecter des interactions chromatine-protéines dans un contexte cellulaire (**Figure 49**, page suivante).

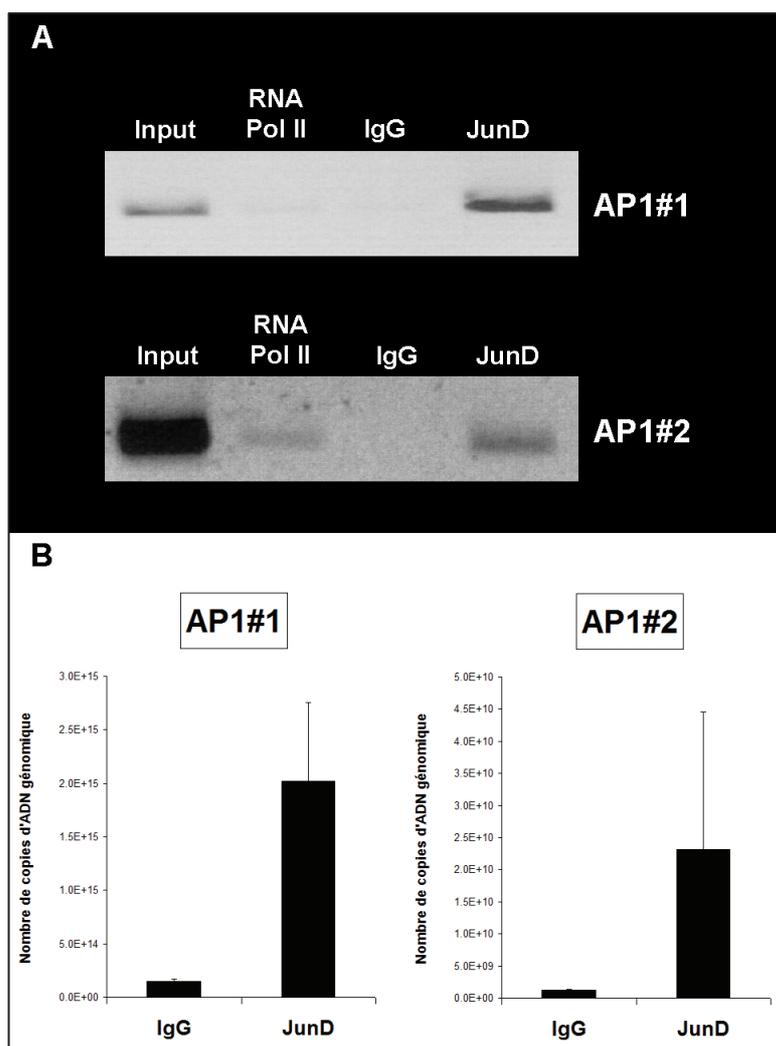


Figure 49 : Etude de la fixation de JunD sur le promoteur P3 endogène par technique

d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Après fixation des interactions chromatine-protéines, l'ADN a été fragmenté en morceaux de 200 à 1000 bp et assujéti à une immunoprécipitation soit dirigée contre JunD, ou RNA Polymérase II, soit effectuée avec une Immunoglobuline G (IgG utilisée comme contrôle négatif). L'ADN fixé par ces protéines a ensuite été analysé pour les sites AP1#1 et AP1#2, par PCR et visualisation sur gel d'agarose (partie A) et par PCR quantitative (partie B). L'*input* est une partie de l'ADN génomique utilisé pour la technique de ChIP, n'ayant pas subi d'immunoprécipitation et servant de contrôle de la qualité du matériel.

Après immunoprécipitation des complexes ADN-protéines par l'utilisation des 3 anticorps spécifiques, l'ADN a été purifié et analysé par les techniques de PCR et de PCR quantitative. De manière intéressante nous avons remarqué une légère fixation de la RNA polymérase II sur le fragment contenant le site AP1#2 soit la séquence [-43/+104], mais aussi de façon moins intense sur le fragment comportant le site AP1#2 [-237/-21]. Ces données montrent que plus on se rapproche du site d'initiation de la transcription, plus la RNA polymérase II est capable de se fixer, ceci est corrélation avec la présence d'un promoteur. Concernant l'étude du facteur JunD de la famille Jun, nous avons également montré sa fixation sur les sites AP1#1 et AP1#2. Ce facteur se fixe donc sur les deux sites AP1 du promoteur P3 de *RHOH* et réprime alors son activité. Or, dans les résultats précédents, la

mutation de ces sites a cependant entraîné une diminution de l'activité de P3 dans la lignée cellulaire Raji (**Figure 43**, page 125). Ces données suggèrent qu'un facteur activateur est préférentiellement fixé aux sites AP1#1 et AP1#2 du promoteur P3. JunD est associé à ces deux sites mais réprime le promoteur P3 endogène. JunB au contraire semble activer P3. JunB pourrait donc jouer également un rôle important dans la régulation du promoteur P3. Nos résultats suggèrent qu'il existerait un état d'équilibre entre la présence de JunD et de JunB sur les sites AP1 du promoteur P3 minimal du gène *RHOH*. Les résultats concernant la surexpression de JunB n'ayant été obtenus que récemment, nous n'avons donc pas pu accentuer nos recherches dans cette direction et vérifier la fixation de JunB au promoteur P3 endogène. Comme l'ont suggéré les résultats du paragraphe page, les membres de la famille Fos semblent également réguler positivement le promoteur P3 dans la lignée cellulaire Raji. Ils pourraient donc être des partenaires des membres de la famille Jun dans la composition du complexe AP1.

4.2.2.2.1.7 Rôle des membres de la famille Fos dans la régulation du promoteur P3

Précédemment, nous avons observé une diminution de l'activité du promoteur P3 suite à l'inhibition des kinases MEK1/2 : un facteur de transcription membre de la famille Fos serait donc un régulateur positif de cette région promotrice (**Figure 44**, page 127). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué une étude préliminaire par surexpression de c-Fos dans la lignée Raji et analysé l'activité du promoteur P3 (**Figure 50**, page suivante). La conséquence de cette augmentation de la protéine c-Fos dans les cellules Raji est une activation plus importante du promoteur P3, soit une induction de 75% de son activité. Ces données nous indiquent que c-Fos serait un régulateur positif de P3. Ceci est bien en accord avec ce que nous avons observé lors de l'inhibition de la kinase MEK1/2. L'étude de l'implication des autres membres de la famille Fos est envisagée au laboratoire, par surexpression des différentes protéines et la fixation de ces dernières sur le promoteur P3 endogène, par immunoprécipitation de la chromatine.

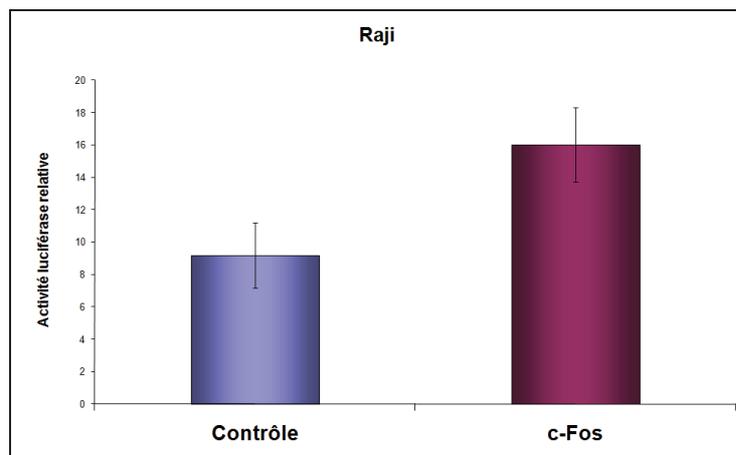


Figure 50 : Etude de la surexpression du facteur c-Fos sur l'activité du promoteur P3 du gène *RHOH* dans la lignée cellulaire Raji. Le plasmide pSG5 vide ou contenant la séquence codante pour le facteur de transcription humain c-Fos a été cotransfecté avec le plasmide pGL4.14[*luc2/Hygro*] vide ou contenant le promoteur P3 [-236/+67] et le plasmide pRSV- β Gal dans la lignée cellulaire Raji. L'activité promotrice a ensuite été évaluée dans trois expériences indépendantes par quantification de l'activité luciférase normalisée par l'activité de la β Galactosidase.

Le complexe AP1 semble donc être impliqué dans la régulation positive et négative du promoteur P3 du gène *RHOH* dans les cellules lymphoïdes B et cela, en fonction de la nature des partenaires composant AP1. JunD intervient plus particulièrement dans la répression du promoteur ; au contraire, les facteurs de transcription JunB et c-Fos l'activent.

4.2.2.2 Recherche d'autres facteurs de transcription impliqués dans la régulation du promoteur P3 de *RHOH*

La régulation du promoteur P3 du gène *RHOH* ne résulte probablement pas uniquement de l'activité du complexe AP1. Pour mettre en évidence l'implication d'autres facteurs dans le contrôle de P3 dans les cellules B, nous avons utilisé une approche bioinformatique et effectué une analyse *in silico*. En étudiant ainsi la séquence nucléotidique du promoteur P3 (sites *TFSearch*, *Match-P* et *Genomatix*), nous avons obtenu des listes de sites consensus de fixation pour des facteurs de transcription. Parmi ces facteurs, nous avons relevé les protéines RREB1 ou *Ras Responsive Element Binding protein 1* et NF κ B ou *Nuclear Transcription kappa B*, régulées par la voie du DAG.

4.2.2.2.1 Etude du rôle du facteur de transcription RREB1 dans la régulation du promoteur P3

RREB1 est régulé positivement par la voie Ras. Il s'agit d'un facteur de transcription à doigt de Zinc, exprimé de façon ubiquiste et reconnaissant l'élément de réponse à Ras (ou

RRE) présent dans la séquence promotrice de certains gènes. Cette protéine est soit un potentiateur, soit un répresseur de la transcription, selon le contexte cellulaire [71, 260]. La séquence consensus du site de reconnaissance de ce facteur est CCCACACCATCCT. Dans la séquence du promoteur P3 du gène *RHOH*, nous avons observé la présence de trois sites potentiels pour RREB1, situés respectivement entre les nucléotides [-223/-209] en antisens (CCCACCTACTCC, RREB1#1), [-105/-92] en sens (CCCCTAAACCCACA, RREB1#2) et [+8/+21] en sens (CCCACACACACTA, RREB1#3) (Figure 51, ci-dessous).

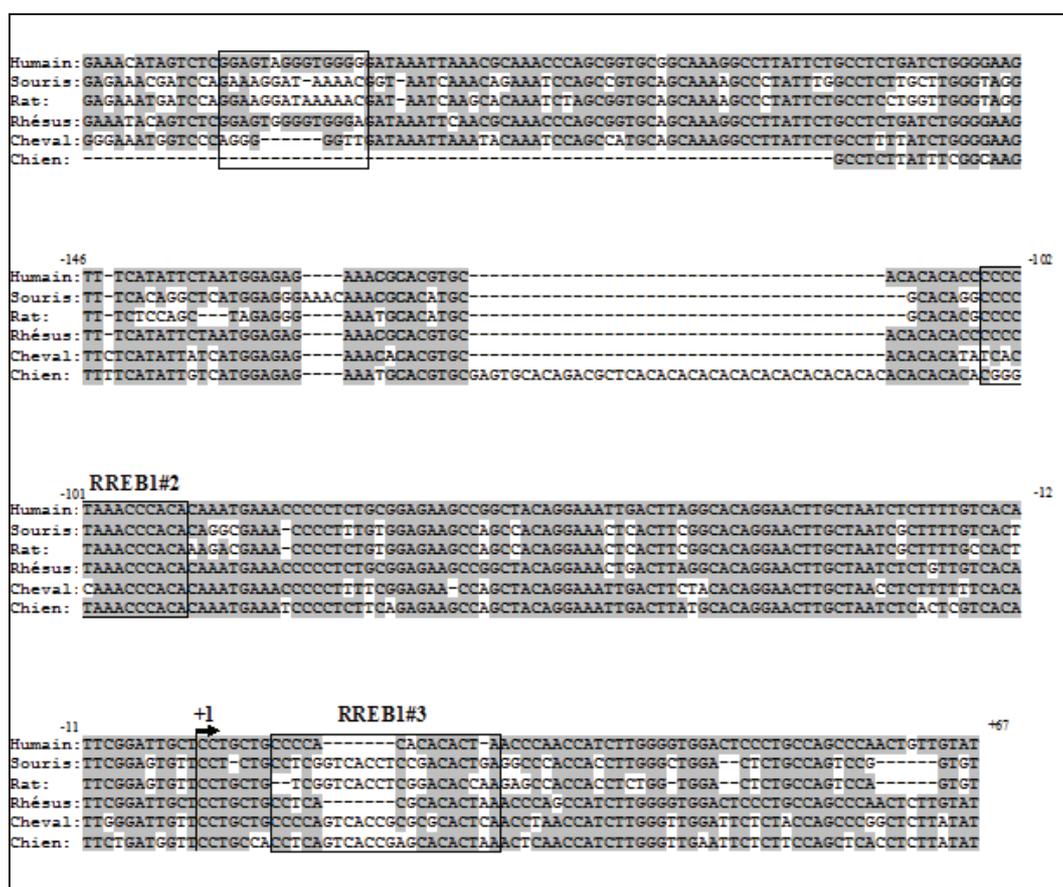


Figure 51 : Le promoteur P3 de *RHOH* contient trois sites putatifs pour le facteur de transcription RREB1, conservés au cours de l'évolution. La séquence ADN du promoteur P3 humain, s'étendant des nucléotides -236 à +67 en regard du site d'initiation de la transcription, a été comparée aux séquences des régions équivalentes chez la souris, le rat, le macaque rhesus, le cheval et le chien, avec des identités respectives de 72.3%, 70.3%, 95.7%, 82.8% et 64%, représentées par un surlignage gris. 3 sites de fixation consensus pour le complexe RREB1 ont été mis en évidence (RREB1#1, RREB1#2 et RREB1#3), localisés respectivement entre les nucléotides [-223/-209], [-105/-92] et [+8/+21], en regard du site d'initiation de la transcription situé à l'extrémité 5' de l'exon 4.

Compte tenu de l'expression de RREB1 dans les lymphocytes B, que nous avons vérifiée (données non montrées), de son action possible de régulateur positif de la

transcription et du fait que, suite à la stimulation par le PMA des voies qui régulent ce facteur, une augmentation de l'activité promotrice de P3 est observée, notre hypothèse serait que RREB1 soit un régulateur positif de ce promoteur dans les cellules lymphoïdes B. Pour essayer de mettre en évidence l'implication des sites consensus pour RREB1 dans la régulation de P3, nous y avons muté les nucléotides correspondant à ces séquences (en faisant attention à ne pas former ainsi d'autres sites de fixation potentiels pour d'autres facteurs de transcription) et avons étudié l'activité des versions mutantes dans la lignée cellulaire Raji (Figure 52, ci-dessous).

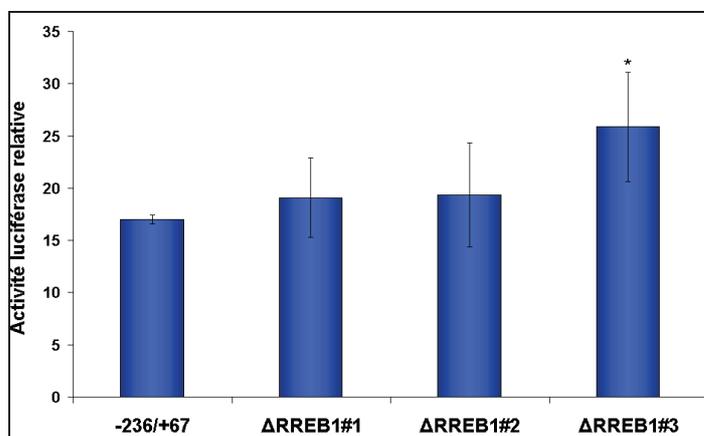


Figure 52 : Etude du rôle des sites consensus de fixation pour le facteur RREB1 (*Ras Responsive Element Binding protein 1*) dans la régulation du promoteur P3 du gène *RHOH*. Trois constructions du promoteur P3 [-236/+67] ont été générées par mutagenèse dirigée de chacun des sites de fixation pour RREB1 (Δ RREB1#1, Δ RREB1#2 et Δ RREB1#3). Les plasmides ainsi obtenus ont été transfectés dans la lignée cellulaire Raji et l'activité promotrice évaluée. Les histogrammes représentent une moyenne de trois expériences. *, $p < 0.05$.

La mutation des sites RREB1#1 et RREB1#2 n'entraîne pas de variation concluante de l'activité du promoteur P3. En revanche, la mutation du site RREB1#3 induit une augmentation de 34% de l'activité promotrice. Ces résultats montrent que si RREB1 n'interagit plus avec son site de fixation RREB1#3, cela permet une meilleure activité du promoteur P3 et donc ce facteur serait un répresseur possible de P3. Ces données préliminaires sont en contradiction avec notre hypothèse de départ, mais nécessitent d'être approfondies. Nous avons effectué des retards en gel (**données non montrées**), mais l'utilisation d'un anticorps dirigé contre RREB1 n'a pas permis de certifier la nature du facteur fixé impliqué.

4.2.2.2.2 Etude du rôle du facteur de transcription NFκB dans la régulation du promoteur P3

Les facteurs de transcription de la famille Rel/NFκB (RelA, RelB, c-Rel, NFκB1 et NFκB2) sont des protéines clés dans la régulation de la prolifération, de la survie et du développement des lymphocytes B [261]. Ces facteurs de transcription reconnaissent le site GGGA_GNNT_CCC. Dans la séquence du promoteur P3 du gène *RHOH*, deux sites de fixation potentiels pour les facteurs de la famille NFκB ont été observés, situés en position [-152/-144] en sens (GGGAAGTTT) et [-78/-86] en antisens (GGGGTTTCA) (Figure 53, ci-dessous).

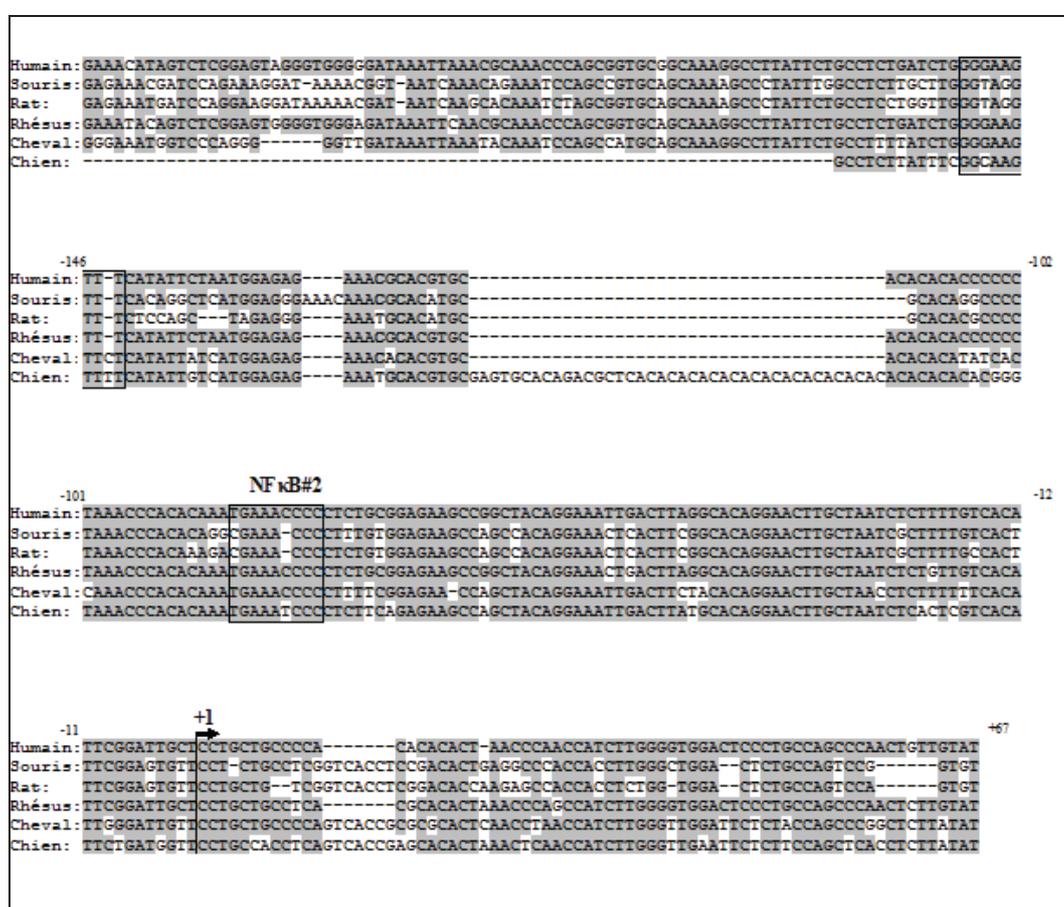


Figure 53 : Le promoteur P3 de *RHOH* contient deux sites putatifs pour le facteur de transcription NFκB, conservés au cours de l'évolution. La séquence ADN du promoteur P3 humain, s'étendant des nucléotides -236 à +67 en regard du site d'initiation de la transcription, a été comparée aux séquences des régions équivalentes chez la souris, le rat, le macaque rhésus, le cheval et le chien, avec des identités respectives de 72.3%, 70.3%, 95.7%, 82.8% et 64%, représentées par un surlignage gris. 2 sites de fixation consensus pour le complexe NFκB ont été mis en évidence (NFκB#1 et NFκB#2), localisés respectivement entre les nucléotides [-152/-144] et [-78/-86], en regard du site d'initiation de la transcription situé à l'extrémité 5' de l'exon 4.

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un des facteurs de cette famille pouvait être impliqué dans la régulation du gène *RHOH* dans les lymphocytes B. Pour étudier cela, nous avons utilisé un inhibiteur de l'activation de NFκB, dans les cellules Raji et Daudi. En utilisant un peptide bloquant l'interaction des protéines IKKα et IKKβ avec IKKγ, le complexe IKK ne peut être formé, ce qui prévient l'activation des facteurs de la famille NFκB. Nos résultats préliminaires (une seule expérience) ont montré que l'activité du promoteur est réduite de 24% et 18%, respectivement, dans les cellules Daudi et Raji (**Figure 53**, ci-dessous). Ces résultats restent à confirmer mais suggèreraient que NFκB régulerait positivement le promoteur P3 dans les cellules B, par un mécanisme direct ou indirect.

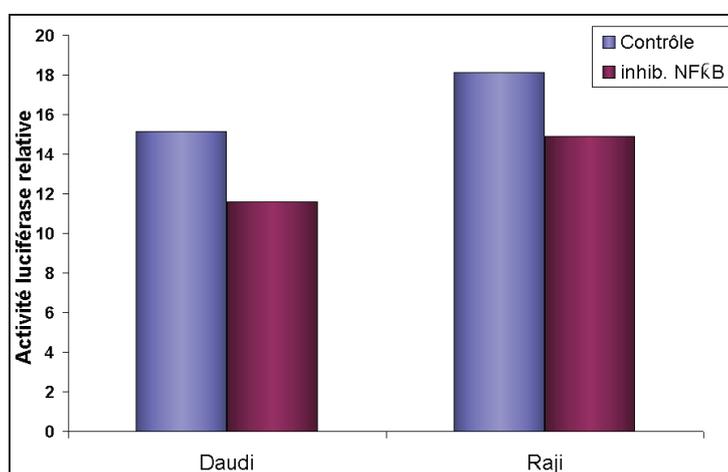


Figure 53 : Etude préliminaire du rôle de NFκB dans la régulation du promoteur P3 du gène *RHOH* (une seule expérience). L'activation des facteurs de la famille NFκB a été bloquée dans les cellules lymphoïdes B Raji et Daudi par l'utilisation d'un peptide bloquant l'interaction entre NEMO et le complexe IκB kinase. L'influence de cette inactivation sur l'activité du promoteur a été analysée après 48 heures de culture.

4.2.2.2.3 Schéma récapitulatif

La totalité de nos résultats obtenus sur la caractérisation du promoteur P3 du gène *RHOH* dans les cellules lymphoïdes B Raji, Daudi et Namalwa, ont été récapitulés dans la figure suivante :

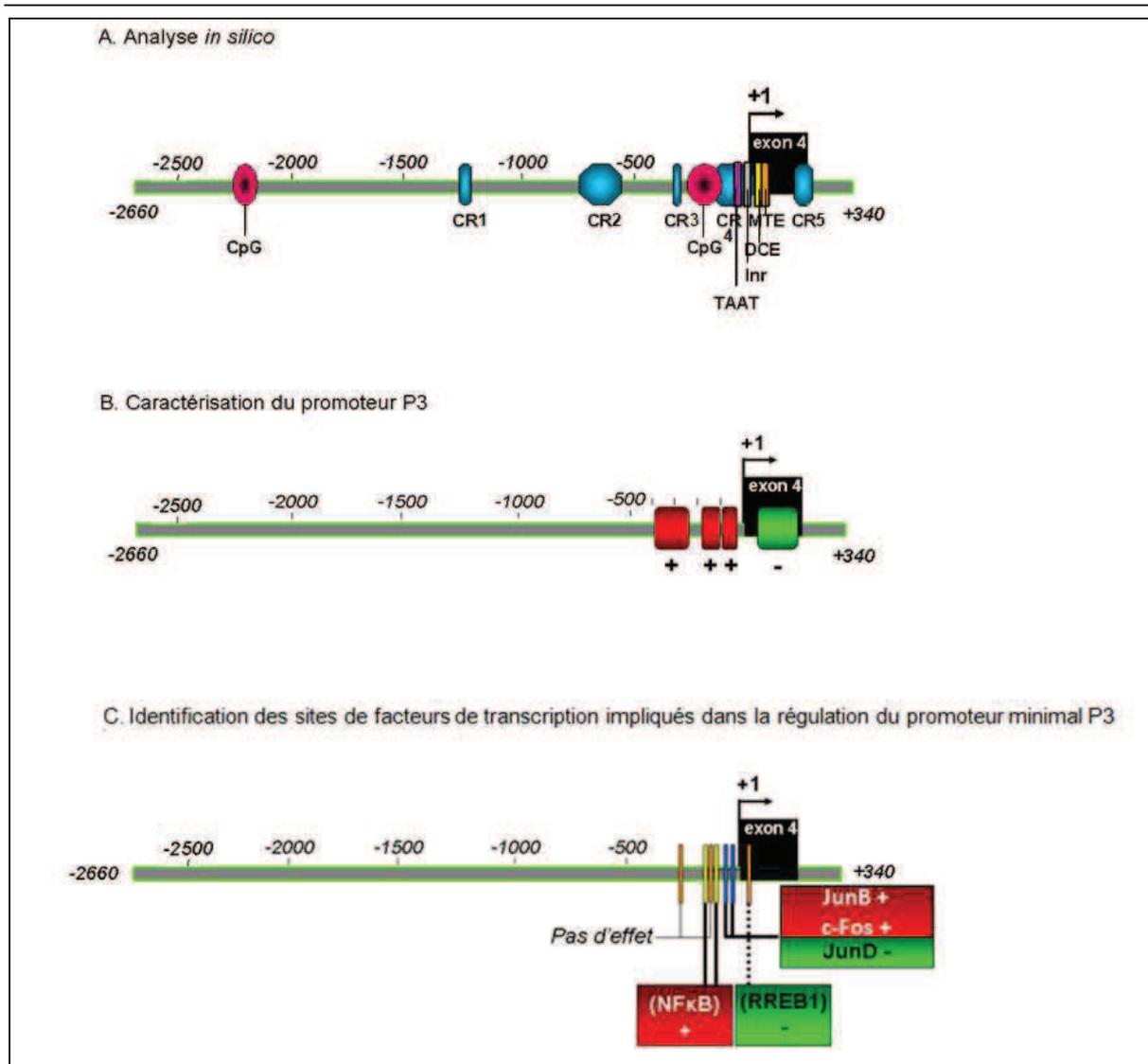


Figure 54 : Schéma récapitulatif des informations obtenues lors de la caractérisation du promoteur P3 dans les cellules B. *A.* L'analyse *in silico* de la région [-2260/+340] a permis de mettre en évidence 2 îlots CpG (CpG) entre les nucléotides [-2250/-2150] et [-270/-120]. 5 zones très conservées entre espèces (*Conserved Region*, CR) sont situées entre [-1270/-1220], [-740/-560], [-330/-300], [-175/+20] et [+190/+275]. De plus des motifs potentiels correspondant à une boîte TATA, à l'élément Initiateur (Inr), aux motifs MTE (*Motif Ten Element*) et DCE I ; II et III (*Downstream Core Element*) localisés, respectivement, en -28, -2, +18, +5, +19 et +30 ont été représentés sur la figure. *B.* La caractérisation du promoteur P3 minimal dans les cellules B a été réalisée par transfection transitoire de constructions plasmidiques de fragments du promoteur dans les lignées Raji, Daudi et Namalwa. Nous avons ainsi déterminé la présence d'un élément « cis » répresseur entre les nucléotides +67 et +245, de deux séquences activatrices entre les nucléotides [-167/-103] et [-103/-24]. De plus, la séquence [-380/-236] semble contenir des sites activateurs du promoteur, uniquement dans le cas de la lignée Namalwa. Ces résultats nous ont permis d'identifier la région [-236/+67] comme la séquence du promoteur P3 minimal dans les cellules lymphoïdes B. *C.* L'étude des facteurs de transcription régulant le promoteur P3 minimal [-236/+67] a permis de montrer que les sites RREB1#1 et RREB1#2 situés en [-209/-223] et [-105/-92] n'interviennent pas dans la régulation de P3. Au contraire, les sites AP1#1 et AP1#2, en [-50/-44] et [-20/-14], régulent positivement P3, tout comme semblent faire les sites NFκB [-152/-144] et [-78/-86]. Le site RREB1#3 en [+8/+21], quant à lui, régule négativement le promoteur P3. La mutation des deux autres sites RREB1 n'entraîne aucune variation de l'activité du promoteur P3. Ces sites sont indiqués sur la figure par les termes « pas d'effet ». Nous noterons que JunD se fixe sur les sites AP1#1 et AP1#2 et réprime le promoteur P3.

4.2.2.3 Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la répression du gène *RHOH* dans la leucémie à tricholeucocytes

Au laboratoire, notre équipe, en collaboration avec le Dr Carl Simon Shelley (La Crosse, WI, USA), a mis en évidence la répression du gène *RHOH* dans les cellules leucémiques de patients atteints de leucémie à tricholeucocytes. La restitution de l'expression de *RHOH* contrecarre le phénotype de la maladie [223]. En déterminant des mécanismes responsables de cette répression, nous pourrions mettre en évidence des facteurs impliqués et en modulant leur expression, restituer l'expression du gène *RHOH* dans ces cellules tumorales.

Nous avons mis en évidence que cette dérégulation du gène *RHOH* dans l'HCL était corrélée à une forte diminution des transcrits initiés en amont de l'exon 4 par le promoteur P3 (**données non montrées**). Les mécanismes moléculaires responsables de cette répression peuvent être soit des événements transcriptionnels (promoteur), soit post-transcriptionnels (stabilité des ARN messagers). Des études préliminaires du laboratoire ont montré que la stabilité des transcrits *RHOH* initiés en amont de l'exon 4 (issus de l'activité du promoteur P3) n'est pas différente dans les cellules HCL comparés aux cellules non-HCL. Nous avons donc axé notre étude sur la régulation du promoteur P3 de *RHOH* dans les cellules HCL. Notre hypothèse était que l'activité de ce promoteur soit fortement inhibée dans ces cellules conduisant à la répression du gène *RHOH*.

4.2.2.3.1 Etude du promoteur P3 dans les cellules de la leucémie à tricholeucocytes

Pour l'étude du promoteur P3 dans la leucémie à tricholeucocytes, nous disposons de plusieurs lignées cellulaires modèles de cette maladie (EH, JOK1, HC1, Eskol) et de la lignée Mo, modèle de la forme variante de la leucémie à tricholeucocytes (paragraphe 3.1.1.2.2, page 75). Il s'agit d'une forme particulière de la leucémie à tricholeucocytes dont les caractéristiques font qu'il est nécessaire de l'individualiser de l'HCL. Les cellules sont intermédiaires entre les tricholeucocytes et les prolymphocytes, mais présentent, tout comme les cellules de l'HCL, de nombreuses extensions cytoplasmiques et un faible taux d'expression du gène *RHOH* [223]. Pour mettre en évidence une modification de l'activité du promoteur P3, nous avons transfecté les constructions plasmidiques contenant les fragments du promoteur (décrites **Figure 38**, page 118) dans les cellules HCL (**Figure 55**, page suivante).

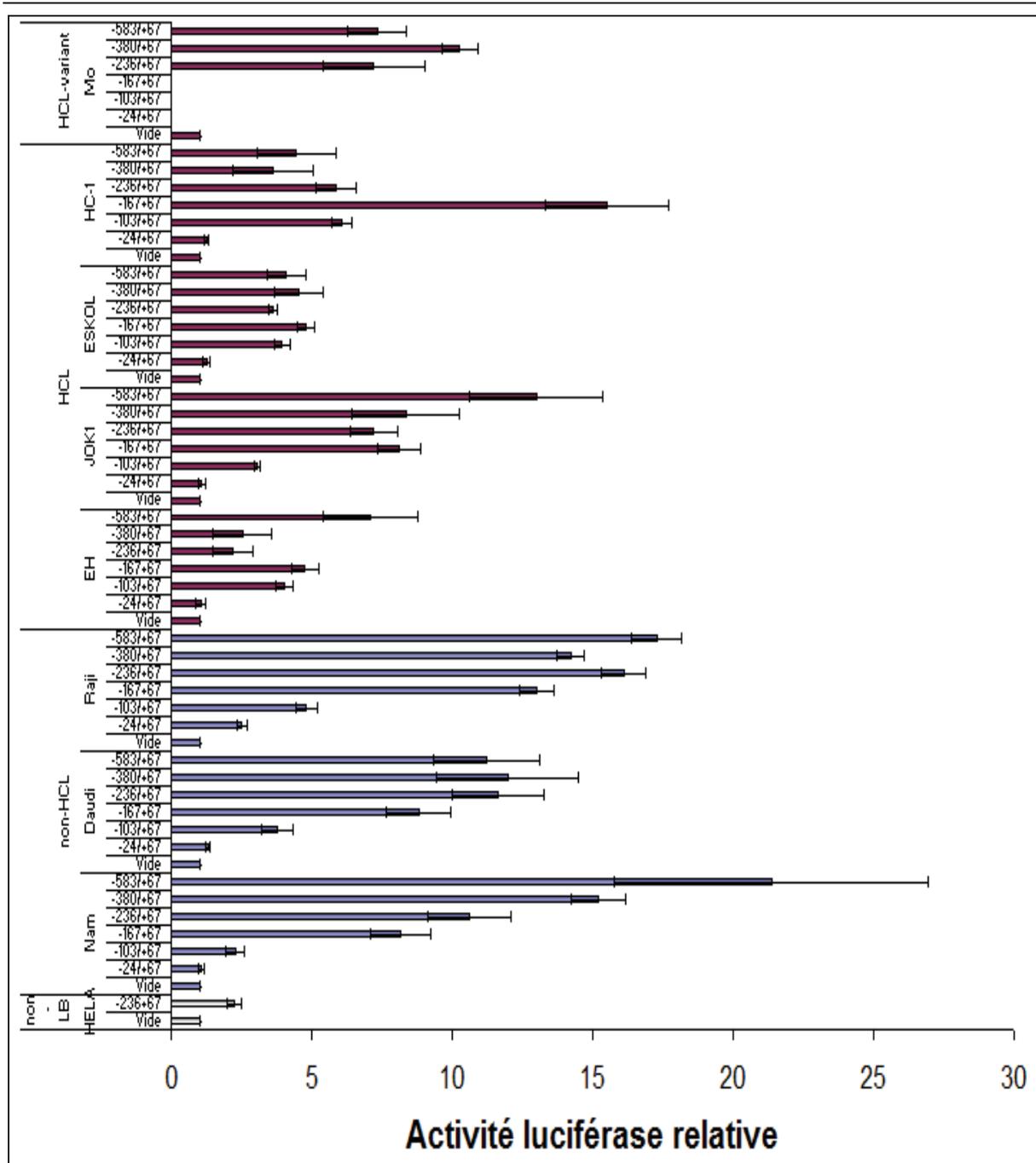


Figure 55 : Etude du promoteur P3 de *RHOH* dans les cellules de la leucémie à tricholeucocytes (HCL) et des lignées non-HCL. Les constructions plasmidiques générées (détaillées **Figure 38**, page 118) ont été transfectées par électroporation dans les lignées EH, JOK1, Eskol, HC1, modèles de l'HCL et la lignée Mo, modèle du variant de l'HCL. Après 48 heures de culture, les cellules ont été récupérées et l'activité promotrice évaluée. Pour quantifier celle-ci et prendre en compte l'efficacité de chaque transfection, un plasmide exprimant la β -galactosidase (pRSV- β GAL) a été transfecté en présence des constructions étudiées. L'activité promotrice a été calculée en faisant le quotient des activités enzymatiques de la luciférase et la β -galactosidase, pour chaque échantillon et représentée par rapport au plasmide vide, dont l'activité a été fixée arbitrairement à 1. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus dans les cellules lymphoïdes B Raji, Daudi et Namalwa (Nam) et dans la lignée épithéliale, HeLa. Les constructions contenant les fragments d'ADN les plus courts [-24/+67], [-103/+67] et [-167/+67] n'ont pas été analysées dans la lignée cellulaire Mo.

Dans ces lignées HCL, nous avons observé des activités promotrices d'une tendance plus faible en moyenne comparées aux activités du promoteur dans les cellules non-HCL, de 4.7 (HCL) à 8.5 unités (non-HCL). Cette diminution d'un facteur 1.8 de l'activité promotrice dans les lignées HCL met en évidence une répression du promoteur P3. La construction [-236/+67] représente la séquence minimale du promoteur P3. On observe pour ce fragment des activités pour les lignées EH, JOK1, Eskol, HC1 et Mo, respectivement de 2.5, 7.5, 4, 6 et 8 unités soit une répression de 77.3%, 31.8%, 63.6%, 45.5% ou 27.3% par rapport à l'activité du promoteur dans la lignée non-HCL Raji. Nous pouvons également observer que la lignée Mo présente la même tendance que les lignées EH, JOK1, Eskol et HC1. Ceci suggère que les cellules leucémiques de l'HCL ou de l'HCL-V (variant de l'HCL) sont toutes caractérisées par une répression du promoteur P3. Celle-ci serait responsable du faible taux de transcrits *RHOH* observé dans ces cellules.

Ces résultats ont également permis de supposer la présence d'un élément « cis » activateur entre les nucléotides -380 et -583 du promoteur P3, uniquement dans les lignées EH et JOK1, et entre -167 et -103, dans la lignée HC1. Un élément « cis » répresseur est également suggéré entre les nucléotides -167 et -236 dans cette même lignée. Nous noterons, d'autre part, la très faible activité promotrice obtenue après transfection du promoteur dans la lignée épithéliale HeLa, ces cellules n'exprimant pas de transcrits *RHOH*. La comparaison des résultats obtenus entre lignées montre que nous sommes bien en présence d'une répression du promoteur P3 dans les cellules HCL et suggère que les éléments activateurs mis en évidence sont spécifiques des cellules lymphoïdes B.

4.2.2.3.2 Recherche de facteurs de transcription induisant une levée de répression du promoteur P3 dans les cellules de la leucémie à tricholeucocytes

Puisque nous avons montré précédemment que le promoteur P3 minimal [-236/+67] est régulé positivement par la voie du DAG dans les cellules B et plus précisément par deux sites AP1 et par NFκB, nous avons émis l'hypothèse qu'en stimulant encore plus cette voie de signalisation, nous pourrions lever la répression du promoteur P3 dans les cellules de la leucémie à tricholeucocytes. Nous avons donc utilisé un analogue du diacylglycérol, le PMA, pour activer cette voie dans les lignées HCL et en étudier l'impact sur l'activité du promoteur

P3 [-236/+67]. En parallèle, nous avons également étudié l'effet de l'activation de la voie calcique par le ionophore du calcium, la ionomycine. Nous avons évalué l'activité du promoteur en présence de ces molécules chimiques (**Figure 56**, ci-dessous).

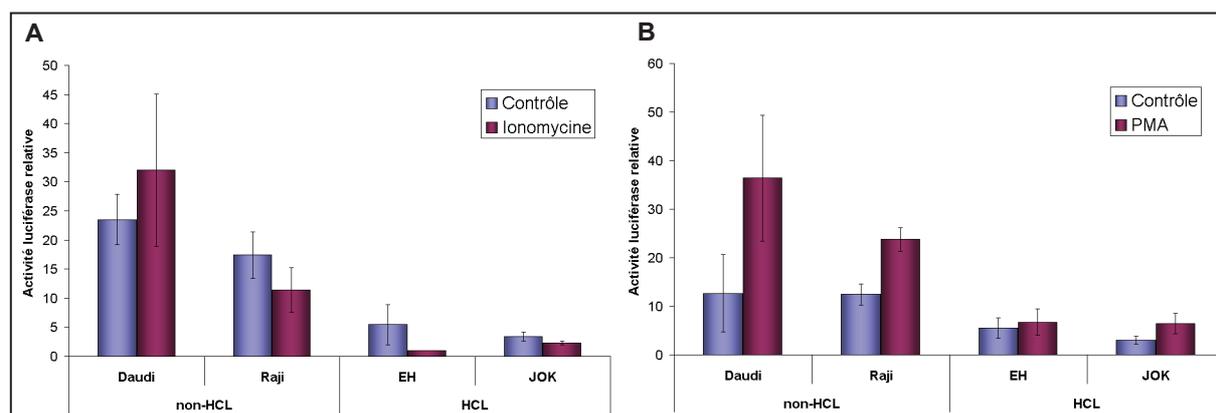


Figure 56 : Régulation du promoteur P3 de *RHOH* suite à la stimulation des voies calcique et du diacylglycérol dans les cellules HCL et non-HCL. Après transfection du plasmide contenant la séquence du promoteur P3 ou du plasmide vide dans les lignées cellulaires EH et JOK1 (JOK), les cellules ont été mises en culture 48 heures en présence soit de DMSO (Contrôle), soit de ionomycine (5 μ M) (partie A), soit de PMA (100ng/mL) (partie B). L'activité promotrice a ensuite été évaluée comme expliqué **Figure 39**, page 119. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux des lignées lymphoïdes B non-HCL (Raji et Daudi).

D'une part, l'activation de la voie calcique dans les cellules HCL par la ionomycine induit un même effet dans les lignées HCL EH et JOK1 : une plus forte répression du promoteur P3 (de 5.8 fois pour EH et 1.5 fois pour JOK1). Nous avons également observé une diminution d'un facteur 1.7 de l'activité de P3 dans les cellules HC1. En revanche, nous n'avons observé qu'une tendance à diminuer mais pas véritablement marquée dans les cellules HCL Eskol (**données non montrées**). Compte tenu de l'état « activé » des cellules leucémiques de la leucémie à tricholeucocytes, nous émettons l'hypothèse que les lignées cellulaires modèles de l'HCL utilisées dans notre étude, présentent déjà une induction la voie de signalisation calcique, même en absence de tout stimuli extérieur. Le fait qu'une induction encore plus importante de cette voie par l'utilisation de ionomycine entraîne une répression encore plus importante du promoteur P3 signifie que des facteurs de transcription régulés par cette voie contrôlent négativement l'activité du promoteur P3. Nous pourrions supposer qu'au

contraire, en inhibant cette voie par de la cyclosporine A, par exemple, nous pourrions lever cette répression.

D'autre part, la stimulation de la voie du DAG par le PMA dans les cellules HCL entraîne une augmentation de l'activité du promoteur P3, respectivement, de 1.22 et 2.15 fois dans les lignées EH et JOK1. Une augmentation de l'activité de P3 a également été observée dans les lignées HCL Eskol (1.85 fois) et HC1 (1.44 fois) (**données non montrées**). Des facteurs de transcription régulés par cette voie de signalisation doivent donc contrôler positivement l'activité du promoteur P3 dans les cellules HCL. En modulant spécifiquement un de ces facteurs impliqués, nous pourrions peut être optimiser dans ces cellules cette levée de répression observée. Comme nous pouvons aussi le voir, l'effet du PMA n'est pas spécifique des lignées HCL et se retrouve aussi dans les lignées non-HCL. Il semble donc que nous ayons un mécanisme commun de régulation du promoteur P3 du gène *RHOH* par la voie du DAG dans les cellules B. Il serait important de vérifier que cette levée de répression affecte bien l'expression de la protéine dans les cellules B. Nous possédons au laboratoire plusieurs anticorps ciblant chacun un peptide de la protéine RhoH et utilisables en Western Blot. La mise au point de cette expérimentation est en cours au laboratoire.

Compte tenu de nos avancées sur la régulation du promoteur P3 par la voie du DAG dans les lignées lymphoïdes B Raji, Daudi et Namalwa et de l'effet obtenu par l'utilisation du PMA (levée de répression), nous nous sommes focalisés sur la recherche de facteurs de transcription régulés par la voie du DAG et pouvant contrôler positivement le promoteur P3 dans les cellules HCL. Nos résultats sur la régulation du promoteur P3 dans les cellules non-HCL (Raji, Daudi et Namalwa) ont montré que les sites consensus pour AP1 (AP1#1 et AP1#2) contrôlent positivement l'activité de P3. Nous nous sommes donc intéressés au rôle des deux sites AP1 dans la dérégulation de ce promoteur dans les cellules HCL.

4.2.2.3.2.1 Etude par mutagenèse dirigée de l'implication des sites de fixation potentiels pour AP1 dans la dérégulation du promoteur P3 dans l'HCL

L'activité promotrice des 3 constructions (représentées **Figure 43**, page 125) dans lesquelles les sites AP1#1 et AP1#2 ont été mutés soit individuellement soit simultanément, ne présente pratiquement aucune variation dans les lignées HCL EH, Eskol et HC1, comparativement au promoteur sauvage. Ces résultats suggèrent que le complexe AP1

n'intervient pas dans la répression du promoteur P3 du gène *RHOH*. Seule la construction Δ AP1#1 entraîne une augmentation de l'activité du promoteur P3 de 2.33 fois (de 2.54 à 5.92 unités) (Figure 57, ci-dessous). Ces résultats suggèrent que le site AP1#1 intervient dans le contrôle négatif du promoteur P3 dans la lignée HCL EH ; mais cependant l'effet est annulé lors de la mutation du second site.

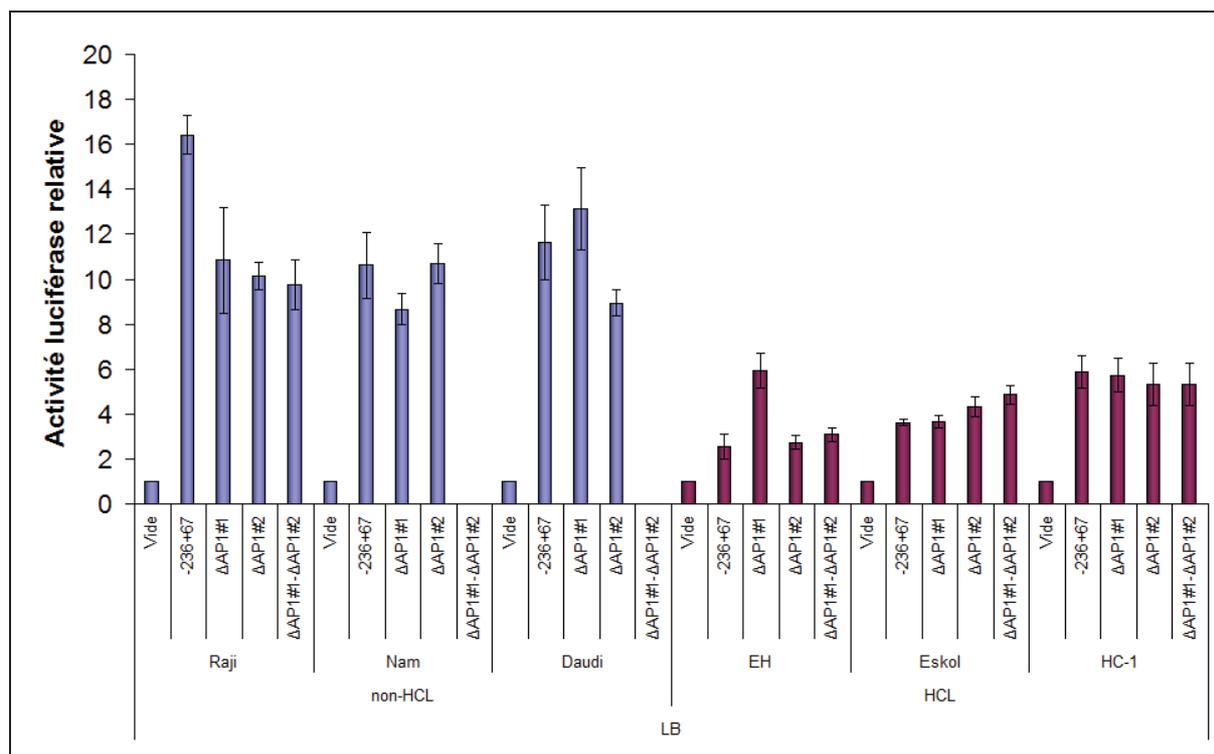


Figure 57 : Etude du rôle des sites consensus du facteur AP1 dans la répression du promoteur P3 du gène *RHOH* dans les lignées modèles de l'HCL et des lignées non-HCL. Les différentes constructions représentées Figure 38 (page 118) ont été transfectées dans les lignées cellulaires EH, Eskol et HC1. L'activité promotrice a ensuite été évaluée comme expliqué Figure 39 (page 119). Les résultats obtenus ont été comparés à ceux des lignées lymphoïdes B non-HCL Raji, Namalwa (Nam) et Daudi (déjà présentées Figure 49, page 118).

Comme nous avons montré précédemment que JunD se fixe aux sites AP1#1 et AP1#2 et réprime le promoteur P3 dans la lignée non-HCL Raji, notre hypothèse est que JunD se fixerait au site AP1#1 et réprimerait aussi le promoteur P3 dans la lignée HCL EH. Nous avons donc tout d'abord approfondi cette étude en utilisant le dominant négatif de la famille Jun, TAM67, et en modulant l'expression de cJun, JunB et JunD par surexpression et invalidation par ARN interférence.

4.2.2.3.2 Etude de l'implication des protéines Jun du complexe AP1 dans la dérégulation du promoteur P3 dans la lignée HCL EH

Pour étudier le rôle des membres de la famille Jun dans la dérégulation du promoteur P3, nous avons surexprimé le dominant négatif TAM67, et évalué l'influence de son expression sur l'activité du promoteur P3 du gène *RHOH* dans la lignée HCL EH (**Figure 58**, ci-dessous). Nous avons observé, contrairement à la lignée cellulaire non-HCL Raji, une faible augmentation de l'activité du promoteur P3 (1.3 fois). Ces données suggèrent qu'un facteur de transcription de la famille Jun réprime légèrement le promoteur P3. Ces résultats sont corrélés à l'augmentation de l'activité promotrice observée dans la lignée HCL EH suite à la mutation du site AP1#1 du promoteur P3.

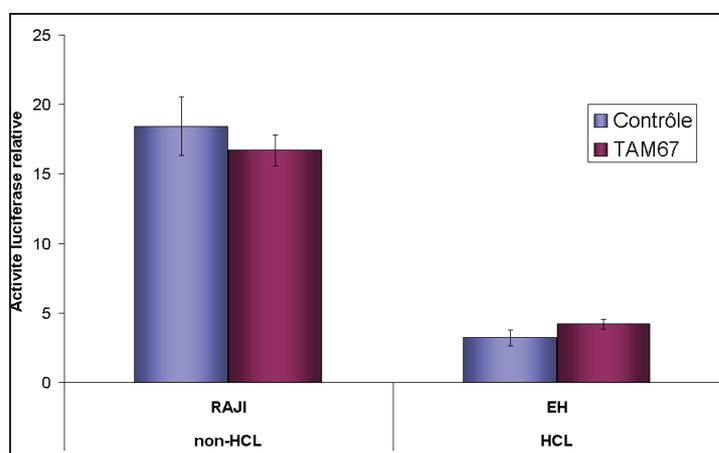


Figure 58 : Etude de la surexpression du dominant négatif de la famille Jun, TAM67, sur l'activité promotrice de P3 dans la lignée HCL EH, comparée à la lignée non-HCL Raji. Les cellules ont été cotransfectées par le plasmide soit vide soit exprimant TAM67 en présence du plasmide pGL4.14[*luc2/Hygro*] contenant ou non la séquence du promoteurP3 [-236/+67]. Après 48 heures de culture, l'activité promotrice a été évaluée comme expliqué **Figure 39** (page 119).

Pour comprendre plus précisément les évènements contrôlant la régulation du promoteur P3, nous avons ensuite modulé individuellement l'expression des facteurs cJun, JunB et JunD dans la lignée HCL EH (**Figure 59**, page suivante). En invalidant ou surexprimant JunD dans cette lignée, aucune variation de l'activité du promoteur P3 n'a été observée, suggérant que JunD n'interviendrait pas dans la dérégulation du promoteur P3 dans la lignée HCL EH, contrairement à la lignée Raji. En invalidant cJun ou JunB, nous n'avons pas détecté non plus de variation de l'activité du promoteur ; en revanche, la surexpression de cJun entraîne une faible répression du promoteur de 1.28 fois. Ces résultats suggèrent que cJun régulerait négativement le promoteur P3. On pourrait se demander pourquoi l'invalidation de cJun ne conduit-elle pas à une levée de répression du promoteur P3, bien que l'efficacité du siRNA ait été vérifiée ? Du même fait, JunB ne pourrait-il pas également

réprimer le promoteur ? Il serait important de surexprimer JunB et d'observer l'effet produit sur l'activité du promoteur P3 dans la lignée HCL EH.

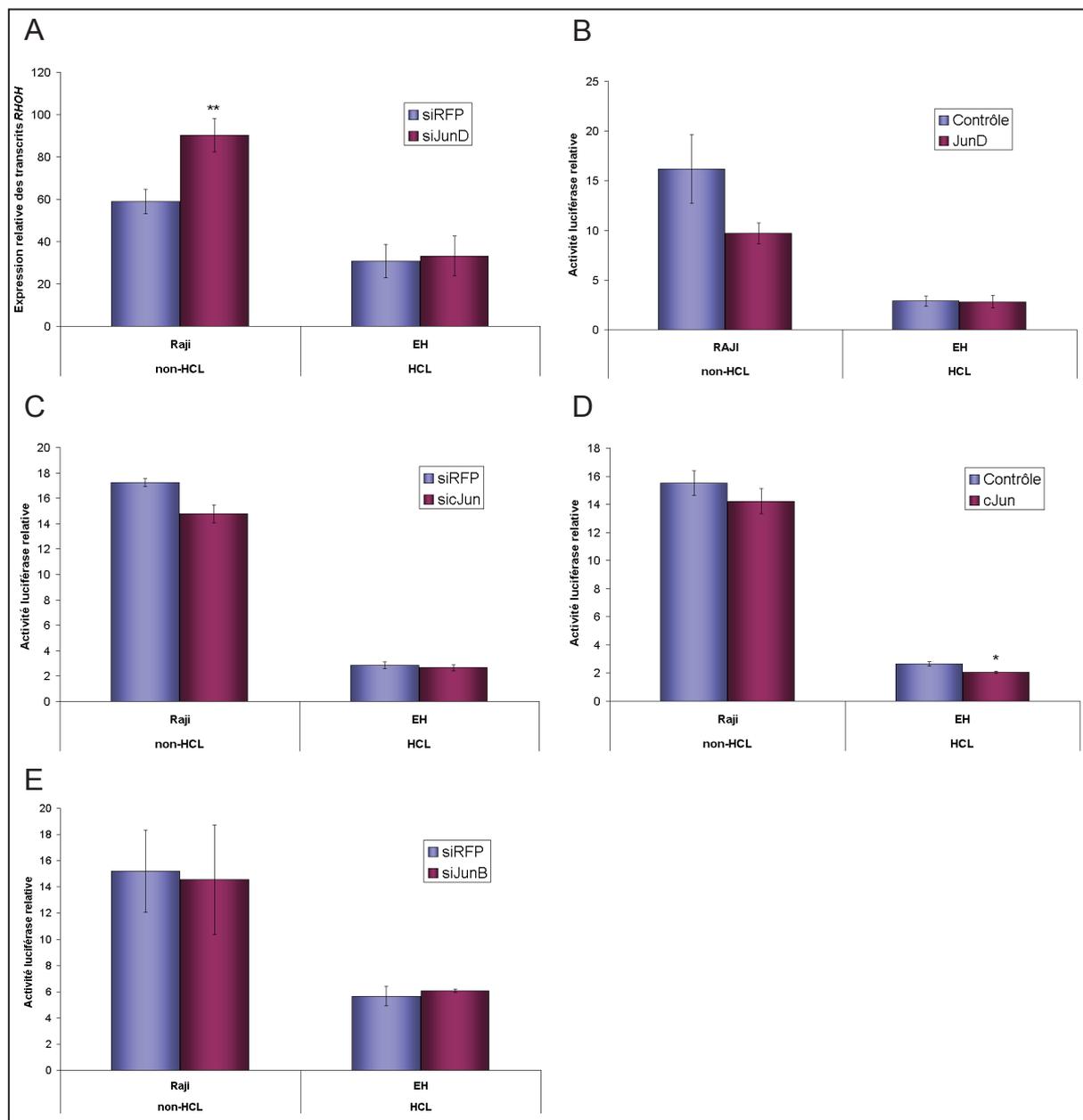


Figure 59 : Etude du rôle de chacun des membres de la famille Jun sur l'activité du promoteur P3 de *RHOH*, par invalidation ou surexpression dans une lignée HCL, EH et la lignée non-HCL Raji. Des siRNA ciblant JunD (A), cJun (C) ou JunB (E) et des plasmides permettant l'expression de JunD (B) ou de cJun (D), dont l'efficacité a été confirmée soit par RT-PCR quantitative, soit par Western Blot ont été transfectés dans la lignée Raji. Après 48 heures de culture, nous avons quantifié soit le taux de transcrits *RHOH* par RT-PCR quantitative (A), soit l'activité du promoteur P3 de *RHOH* (comme indiqué sur cette figure) (B, C, D, E). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Les faibles variations obtenues par invalidation ou surexpression des membres de la famille Jun dans la lignée HCL EH remettent notre hypothèse en question. Pour vérifier que nous sommes sur une bonne piste en étudiant AP1 et plus précisément les facteurs de transcription cJun, JunB et JunD, nous avons inhibé JNK par l'utilisation de SP600125 et JNK et MEK1/2 par SP600125 combiné à U0126, dans cette lignée HCL (**Figure 60**, ci-dessous). Nous avons ainsi observé, en présence de SP600125, une levée de répression du promoteur P3 significative, de 1.57 fois, et en utilisant le SP600125 combiné à U0126, de 1.46 fois. Ces données suggèrent donc que le facteur AP1 régule négativement le promoteur P3 de *RHOH* dans la lignée HCL EH, résultats corrélés à ceux des mutants des sites AP1 et à la surexpression de TAM67. Ces résultats sont à l'opposé de ceux observés dans la lignée Raji. Cette étude incomplète devra donc être approfondie par surexpression de JunB ou d'autres partenaires protéiques de la famille AP1 comme les membres de la famille Fos. Rappelons le fait que le complexe AP1 ne régule le promoteur P3 minimal que dans la lignée HCL EH mais pas dans les autres lignées cellulaires modèles de l'HCL (**Figure 57**, page 146). Si l'on identifiait le ou les facteurs impliqués dans la lignée EH, ces derniers ne pourraient pas servir de cible pour l'ensemble des cellules leucémiques de la leucémie à tricholeucocytes.

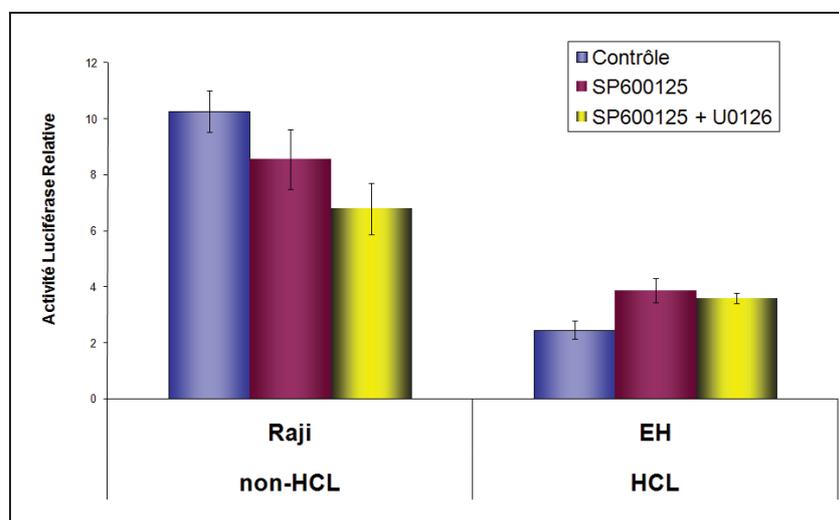


Figure 60 : Etude du rôle des membres des familles Jun et Fos dans la dérégulation du promoteur P3 du gène *RHOH* dans la lignée HCL EH, comparée à la lignée non-HCL Raji. Après transfection du plasmide contenant la séquence minimale du promoteur P3, les cellules ont été mises 48 heures en culture en présence d'un inhibiteur de la Jun Kinase (SP600125, 30µM) ou de SP600125 combiné à un inhibiteur de MEK1/2 (U0126, 20µM). L'activité promotrice a ensuite été évaluée comme expliqué précédemment. *, $p < 0.05$.

4.2.2.3.2.3 Etude d'autres facteurs de transcription permettant une levée de répression du promoteur P3 dans les lignées cellulaires HCL.

4.2.2.3.2.3.1 Etude du facteur de transcription RREB1

Nous nous sommes intéressés au facteur RREB1, puisque la mutation des sites consensus pour ce facteur entraîne une augmentation de l'activité du promoteur P3 dans la lignée cellulaire non-HCL Raji. Nous avons donc étudié l'effet de la mutation des sites RREB1#1, RREB1#2 et RREB1#3 sur l'activité du promoteur P3 de *RHOH* dans la lignée HCL EH (**Figure 61**, ci-dessous). Contrairement à ce qui a été observé dans la lignée Raji (pas d'effets des mutants Δ RREB1#1 et Δ RREB1#2, et une augmentation de l'activité de P3 avec Δ RREB1#3), la mutation de ces sites entraîne une diminution de l'activité du promoteur (1.65 et 1.90 fois, respectivement pour RREB1#2 et RREB1#3). Or, si RREB1 est bien le facteur associé à ces sites, ce facteur devrait être ici fortement activé puisque dans les cellules HCL, la voie de signalisation de Ras est fortement stimulée [262]. Ces sites ne sont donc pas d'un intérêt immédiat pour notre étude.

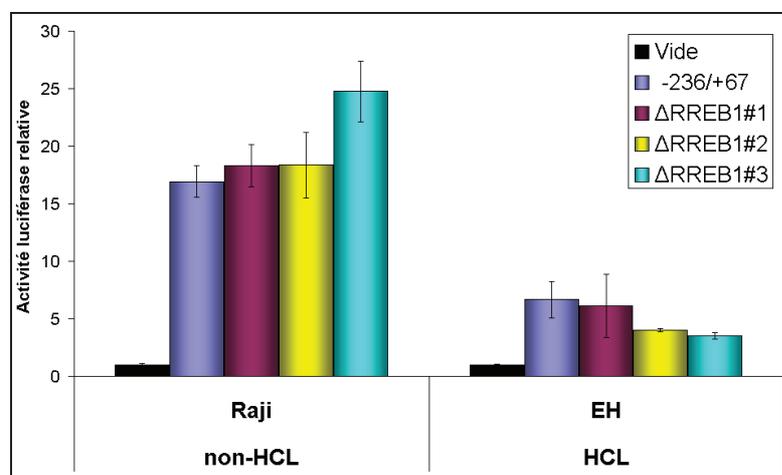


Figure 61 : Etude du rôle des sites consensus de fixation pour le facteur RREB1 (*Ras Responsive Element Binding protein1*) dans la dérégulation du promoteur P3 du gène *RHOH* dans la lignée HCL EH comparativement à la lignée non-HCL Raji. Trois constructions du promoteur P3 [-236/+67] ont été générées par mutagenèse dirigée de chacun des sites de fixation pour RREB1 (Δ RREB1#1, Δ RREB1#2 et Δ RREB1#3). Les plasmides ainsi obtenus ont été transfectés dans les deux lignées et l'activité promotrice évaluée et comparée à celle du promoteur sauvage.

4.2.2.3.2.3.2 Etude du facteur de transcription NFκB

Le facteur de transcription NFκB présente également un intérêt pour notre étude. En effet, l'inhibition de son activité par un peptide bloquant entraîne une diminution de l'activité du promoteur P3 dans la lignée non-HCL Raji (**données préliminaires**, **Figure 62**, page suivante). Nous avons donc inhibé l'activité de NFκB dans les lignées modèles de l'HCL EH et Eskol, et avons observé une augmentation de l'activité du promoteur (respectivement 1.23

et 2.56 fois) (**données préliminaires**). Dans la lignée HCL HC1, nous avons observé au contraire une plus forte répression du promoteur de 1.3 fois (**données non montrées**). Ces résultats, quoique préliminaires, montrent que NFκB semble activer le promoteur P3 dans les cellules HC1 et au contraire le réprimer dans les lignées EH et Eskol. Ces données mettent également en évidence une hétérogénéité des événements moléculaires conduisant à la répression du promoteur P3 du gène *RHOH* au sein des lignées cellulaires HCL.

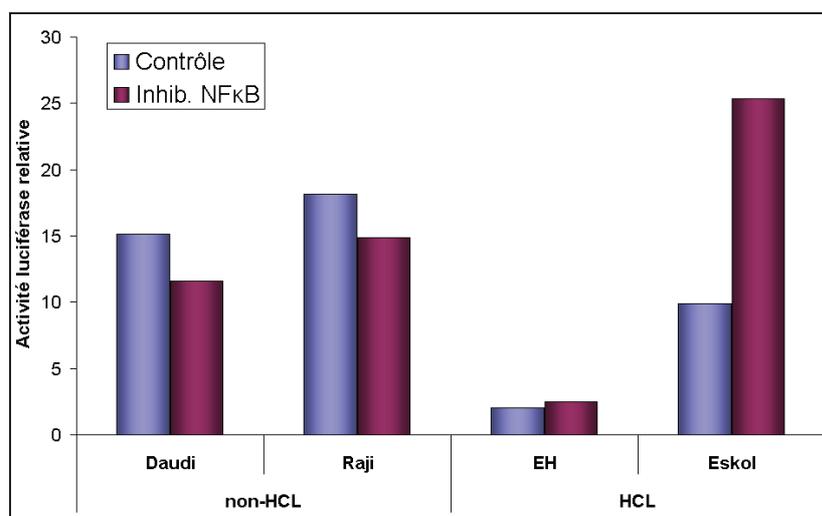


Figure 62 : Etude du rôle de NFκB dans la dérégulation du promoteur P3 du gène *RHOH* dans les lignées HCL EH et Eskol, comparées aux lignées non-HCL Daudi et Raji. L'activation des facteurs de la famille NFκB a été bloquée dans les cellules lymphoïdes B par l'utilisation d'un peptide bloquant l'interaction entre NEMO et le complexe IκB kinase. L'influence de cette inactivation sur l'activité du promoteur a été analysée 48 heures après culture.

Nos résultats montrent que les sites AP1#1 et AP1#2 n'interviennent pas dans un mécanisme de répression du promoteur P3 qui serait commun à toutes les lignées cellulaires modèles de la leucémie à tricholeucocytes. Seul le site AP1#1 semble être impliqué dans la régulation du promoteur P3 et cela, uniquement dans la lignée EH. Le facteur de transcription associé n'a cependant pas encore été identifié. Les sites consensus de fixation de RREB1 semblent quant à eux intervenir dans le contrôle positif du promoteur P3 dans la lignée cellulaire EH. Certes, ces résultats ne semblent pas engageants pour l'identification d'un mécanisme commun de régulation de l'activité de P3 dans les différentes lignées HCL. Nos recherches ont cependant permis de montrer des résultats préliminaires intéressants et plus prometteurs : l'inhibition de l'activation des facteurs de la famille NFκB semble permettre de lever la répression de P3 dans certaines des lignées HCL ; au contraire, une répression de l'activité de P3 est observée dans les cellules de Burkitt suite à cette inhibition. Ceci suggèrerait

que la nature du facteur de la famille NFκB impliqué dans la régulation du promoteur serait différente selon le type de lignée étudiée.

4.2.3 Etude de la régulation du gène *RHOH* dans les lymphocytes T et de sa répression dans la leucémie T de l'adulte

4.2.3.1 Etude de la régulation du gène *RHOH* au cours de l'activation lymphocytaire

4.2.3.1.1 Activation lymphocytaire T

Dans cette seconde partie des résultats, nous avons voulu comprendre comment le gène *RHOH* est régulé au cours de l'activation lymphocytaire T. La compréhension de ces événements nous permettrait peut être d'identifier des mécanismes moléculaires impliqués dans la répression de *RHOH* dans la leucémie T de l'adulte, pathologie caractérisée par une prolifération anormale de lymphocytes T et présentant l'expression de marqueurs d'activation (comme CD69) à la surface cellulaire [263]. Pour étudier l'expression du gène *RHOH* lors de l'activation lymphocytaire T, nous avons travaillé sur des lymphocytes T isolés de sang périphérique : nous avons donc purifié les cellules mononucléées à partir de sang provenant de donneurs volontaires sains, puis isolé par déplétion les lymphocytes T (soit 25-55% des leucocytes). Les cellules CD3⁺ ainsi obtenues sont un ensemble de populations T de type CD4⁺ *T-Helper* (40-60%), CD8⁺ cytotoxique (20-30%), mémoire CD4⁺ ou CD8⁺, régulatrice ou Treg (jusqu'à 5%), *Natural Killer T* (jusqu'à 10%) et $\gamma\delta$ T (jusqu'à 5%). Au cours de leur passage dans le sang, les cellules T vont interagir par leur TCR avec les cellules présentatrices d'antigène, par leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) soit de type I (CD8⁺ avec les cellules du corps) soit de type II (CD4⁺ avec les cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes B). C'est la formation d'une synapse immunologique qui va entraîner l'activation lymphocytaire T [264]. Cette activation se déroule en deux étapes : la première, reconnaissance entre le TCR et le CMH présentant l'antigène ; la seconde, co-stimulation de récepteurs à la surface des lymphocytes T comme la famille B7 dont fait partie CD28, protéine la plus fortement stimulatrice du TCR.

4.2.3.1.2 Expression du gène *RHOH* au cours de l'activation lymphocytaire T

Pour reproduire cette activation du TCR des cellules T *in vitro*, plusieurs techniques sont possibles. La première méthode nécessite la mise en contact *in vitro* de cellules présentatrices d'antigène (CPA) avec des lymphocytes T. Il s'agit d'une expérimentation qui nécessite la maîtrise de la culture des CPA et une reconnaissance entre les CPA et les cellules T. Une seconde méthode consiste en l'utilisation de billes couplées à des anticorps anti-CD3 et à des anticorps anti-CD28, récepteurs présents à la surface des cellules T et intervenant dans la formation de la synapse immunologique [265, 266]. Pour commencer cette étude, nous avons choisi d'étudier la régulation du gène *RHOH* au cours d'une cinétique d'activation de lymphocytes T normaux, en utilisant des billes couplées à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (**Figure 65**, ci-dessous). En se servant de telles billes, certes, nous ne reproduisons pas tous les signaux engagés au cours de cette synapse, mais nous en activons les voies principales. Après vérification de l'état activé de nos cellules par l'expression du marqueur CD69, nous avons quantifié le taux des transcrits totaux du gène *RHOH* par RT-PCR quantitative (chimie TaqMan). Nous avons ainsi pu observer une expression triphasique de *RHOH* : tout d'abord, une augmentation d'un facteur 5 après 6 heures d'activation, suivie d'une diminution allant jusqu'à 50% en deçà du contrôle à 24 heures, puis d'un retour à un taux normal à 48 heures.

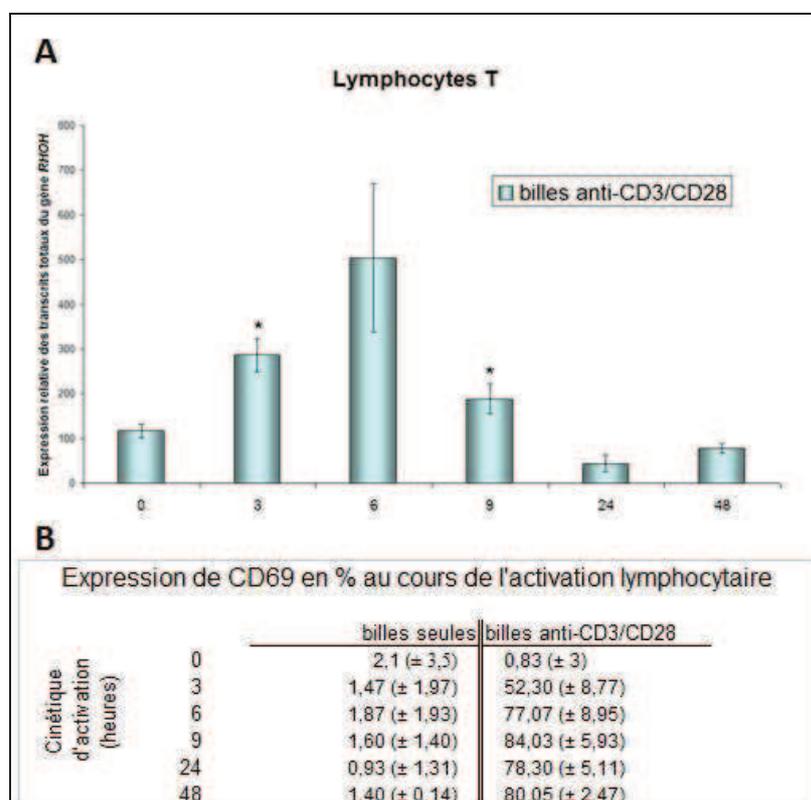


Figure 65 : Etude de l'expression du gène *RHOH* au cours de l'activation lymphocytaire T. *A.* Des lymphocytes normaux isolés du sang périphérique de donneurs sains ont été mis en contact, durant 48 heures, soit avec des billes seules, soit avec des billes couplées à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. L'expression du gène *RHOH* a été quantifiée au cours de cette cinétique par RT-PCR quantitative (chimie TaqMan). Représentation de la moyenne de 3 expériences. *B.* Au cours de la cinétique d'activation par les billes, l'expression du marqueur CD69 par les cellules T a été vérifiée par cytométrie en flux. Représentation de la moyenne de 3 expériences.

4.2.3.1.3 Expression du gène *RHOH* après stimulation des lymphocytes T par des cytokines

Nous avons voulu vérifier si la variation de l'expression du gène *RHOH* dépendait d'autres facteurs que la formation de la synapse immunologique. Par exemple, les lymphocytes T-Helper naïfs du sang périphérique peuvent se différencier soit en T-Helper de type 1 en présence d'interleukine 12 et d'interleukine 18 (favorisant l'immunité cellulaire), soit en T-Helper de type 2 en présence d'interleukine 4 (stimulant la production d'anticorps IgA et IgE par les cellules B) [267, 268]. Nous avons donc stimulé des lymphocytes T par de l'interleukine 12 (10 ng/mL) et de l'interleukine 18 (100 ng/mL) durant 24 heures (**Figure 66**, ci-dessous). La quantification des transcrits totaux du gène *RHOH* n'a pas montré de variation d'expression au cours de cette cinétique. La fonctionnalité des cytokines a été vérifiée sur des *Natural Killer*, cellules répondant à ces cytokines, et détectée par l'expression du marqueur CD69 (**données non présentées**).

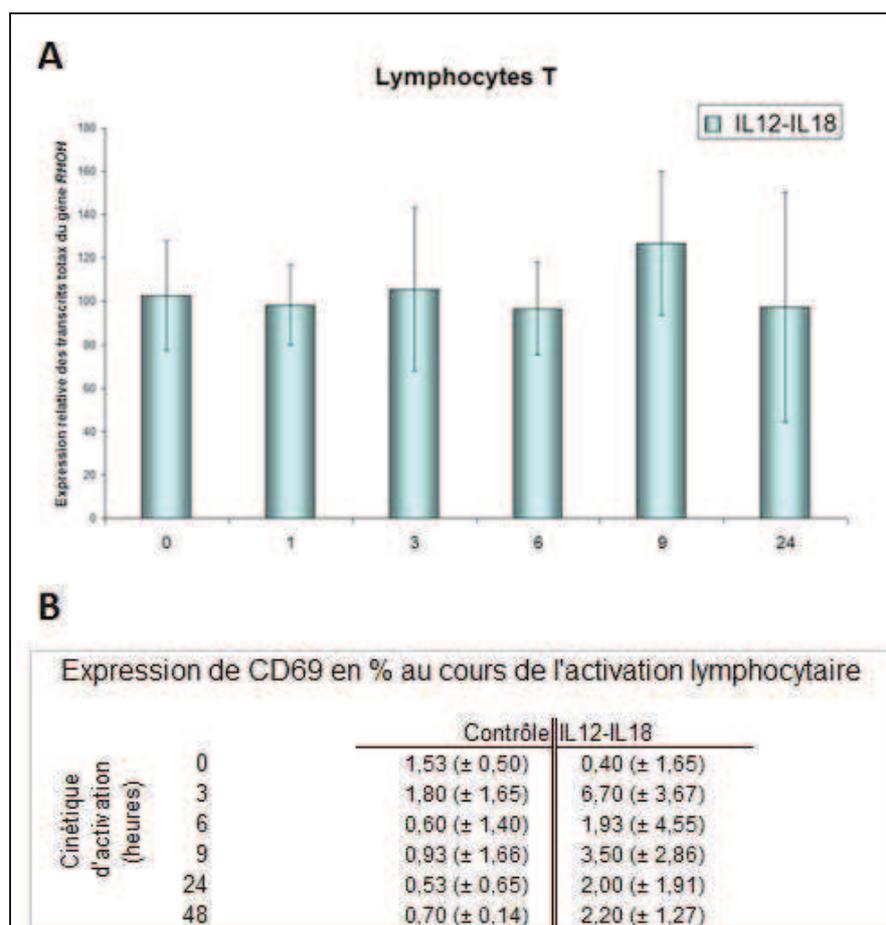


Figure 66 : Etude de l'expression du gène *RHOH* au cours de la stimulation des lymphocytes T normaux par les interleukines 12 et 18. *A.* Des lymphocytes T normaux isolés du sang périphérique de donneurs sains ont été mis en culture en présence ou non d'interleukines 12 (10 ng/mL) et 18 (100 ng/mL) durant 24 heures. L'expression du gène *RHOH* a été quantifiée au cours de cette cinétique par RT-PCR quantitative (chimie TaqMan). Représentation de la moyenne de 3 expériences. *B.* Au cours de la cinétique d'activation par les cytokines, l'expression du marqueur CD69 a été vérifiée par cytométrie en flux. Représentation de la moyenne de 3 expériences.

4.2.3.1.3.1 Etude des voies de signalisation régulant l'expression du gène *RHOH* au cours de l'activation lymphocytaire T

L'activation des cellules T par formation de la synapse immunologique ou par les billes couplées à des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, fait intervenir des molécules comme les protéines PLC γ , Vav, Sos, régulant principalement les voies calcique et du diacylglycérol (DAG) et des facteurs de transcription tels AP1, NF κ B et NFAT [269, 270]. Pour déterminer quelles sont les voies de signalisation impliquées dans la variation d'expression du gène *RHOH* au cours de l'activation lymphocytaire T, nous avons décidé d'utiliser des molécules chimiques comme le PMA et la ionomycine, pour induire séparément chacune de ces deux voies. Nous avons donc réalisé une cinétique de stimulation soit par le PMA soit par la ionomycine et quantifié l'expression du gène *RHOH* au cours du temps (Figure 67, ci-dessous).

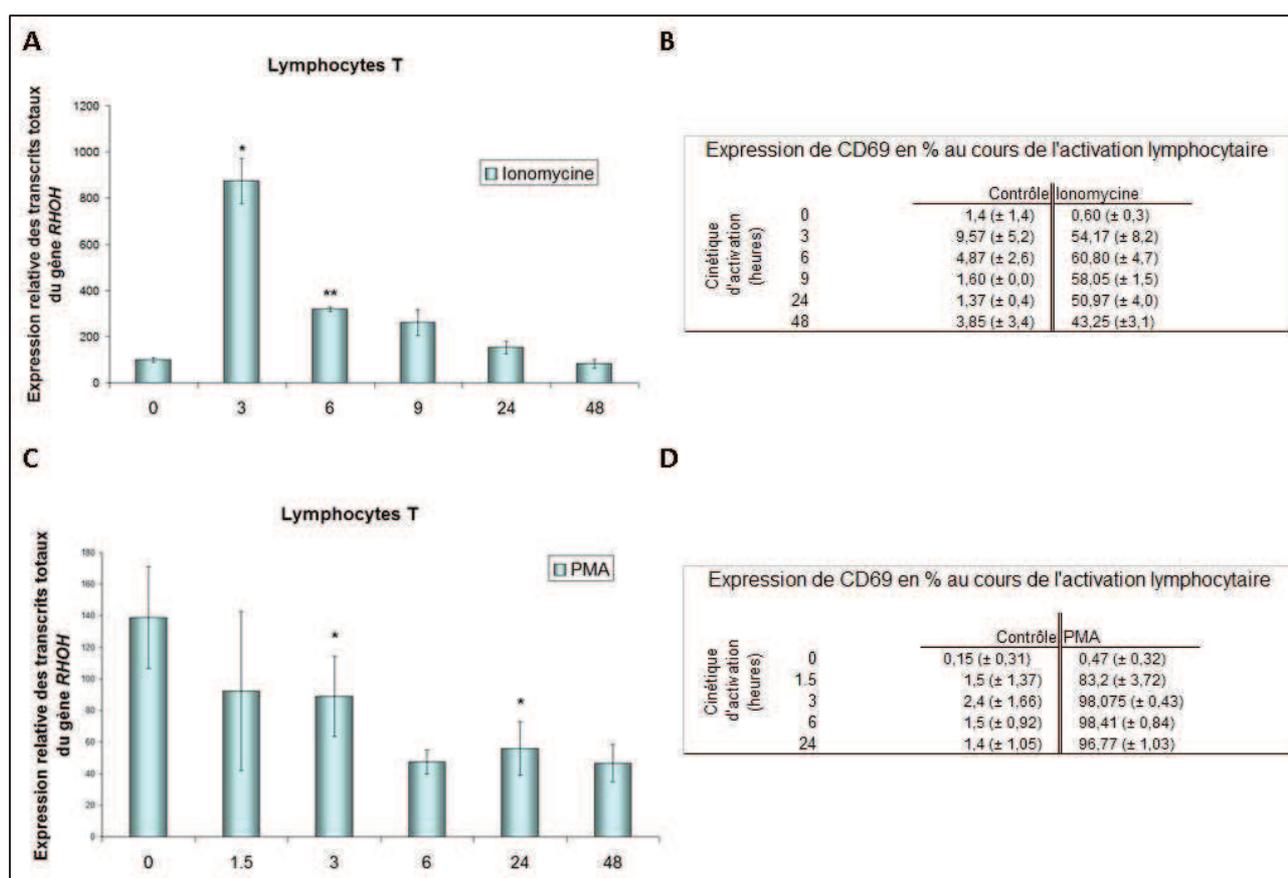


Figure 67 : Etude de l'expression du gène *RHOH* au cours de la stimulation des lymphocytes T normaux par la ionomycine ou le PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acétate). Des lymphocytes T normaux isolés du sang périphérique de donneurs sains ont été mis en culture en présence de DMSO (DiMéthylSulOxide, contrôle négatif), ionomycine (5 μ M) (A) ou PMA (100ng/mL) (C) durant 48 heures. L'expression du gène *RHOH* a été quantifiée au cours de ces cinétiques par RT-PCR quantitative (chimie TaqMan). L'expression du marqueur CD69 a été vérifiée par cytométrie en flux, au cours des cinétiques d'activation par la ionomycine (B) ou par le PMA (D).

Nous avons ainsi montré que la ionomycine induit une augmentation d'un facteur 9 de l'expression du gène *RHOH*, dès 3 heures de stimulation. Le taux de transcrits décroît ensuite pour un retour presque à la normale à 48 heures. En revanche, la stimulation par le PMA entraîne une répression, observée dès 3 heures de stimulation et se stabilisant à environ 50% du seuil du contrôle dès 6 heures. Ces résultats suggèrent que la première phase d'augmentation de l'expression du gène *RHOH* observée au cours de l'activation lymphocytaire T serait due à l'activation de la voie calcique et la seconde phase, responsable de la répression de *RHOH*, serait majoritairement due à l'action de la voie du DAG.

Dans nos expériences, nous avons quantifié tous les ARN messagers du gène *RHOH*. Précédemment, nous avons montré que des 3 promoteurs, P3 est celui qui gouverne l'expression de ce gène dans les lymphocytes T ou B (*paragraphe 4.1, page 103*). Nous avons donc voulu quantifier les transcrits spécifiques de chaque site d'initiation de la transcription afin de déterminer si les autres promoteurs (P1 et P2) jouent un rôle dans la variation d'expression des ARN messagers totaux du gène *RHOH*, suite à la stimulation des voies de signalisation du calcium et du DAG.

4.2.3.1.3.2 Expression des transcrits issus des promoteurs P1, P2 ou P3 dans les lymphocytes T stimulés par le PMA ou la ionomycine

Nous avons réalisé des RT-PCR semiquantitatives et quantitatives afin d'analyser les transcrits initiés spécifiquement par P1, P2 ou P3, à partir d'échantillons d'ADNc de lymphocytes T stimulés soit 3 heures par de la ionomycine, temps où un pic d'expression du gène *RHOH* est observé, soit 24 heures par du PMA, temps pour lequel une répression maximale de *RHOH* a été décrite (**Figures 68 et 69**, pages 157 et 158).

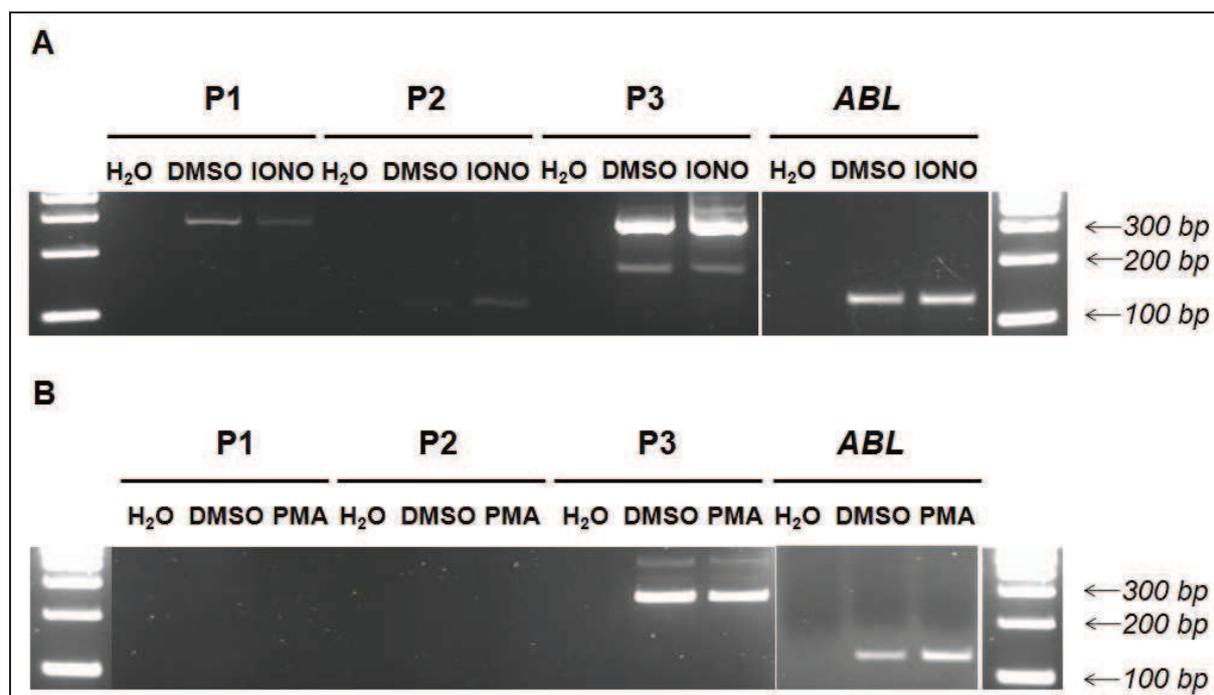


Figure 68 : Expression semiquantitative des ARN messagers du gène *RHOH* initiés en amont des exons 1, 2 et 4 dans des lymphocytes T cultivés en présence de PMA (24h) ou de ionomycine (3h). L'évaluation de la présence de ces transcrits a été réalisée par PCR semiquantitative et l'utilisation des amorces décrites **Figure 28**, page 104. L'expression des ARN messagers *RHOH* issus de l'activité du promoteur P1, P2 ou P3 et des transcrits *ABL* est présentée sur cette figure. Contrairement à l'analyse de RT-PCR analytique présentée dans la partie 4.2.2, ici, les amorces utilisées sont identiques à celles employées dans l'analyse de RT-PCR quantitative (**Figure suivante**).

Nous montrons ainsi (**Figure 68**) que les transcrits initiés en amont de l'exon 2 (promoteur P2) et ceux issus du promoteur P1 sont très faiblement exprimés comparativement aux isoformes initiées en amont de l'exon 4 (promoteur P3).

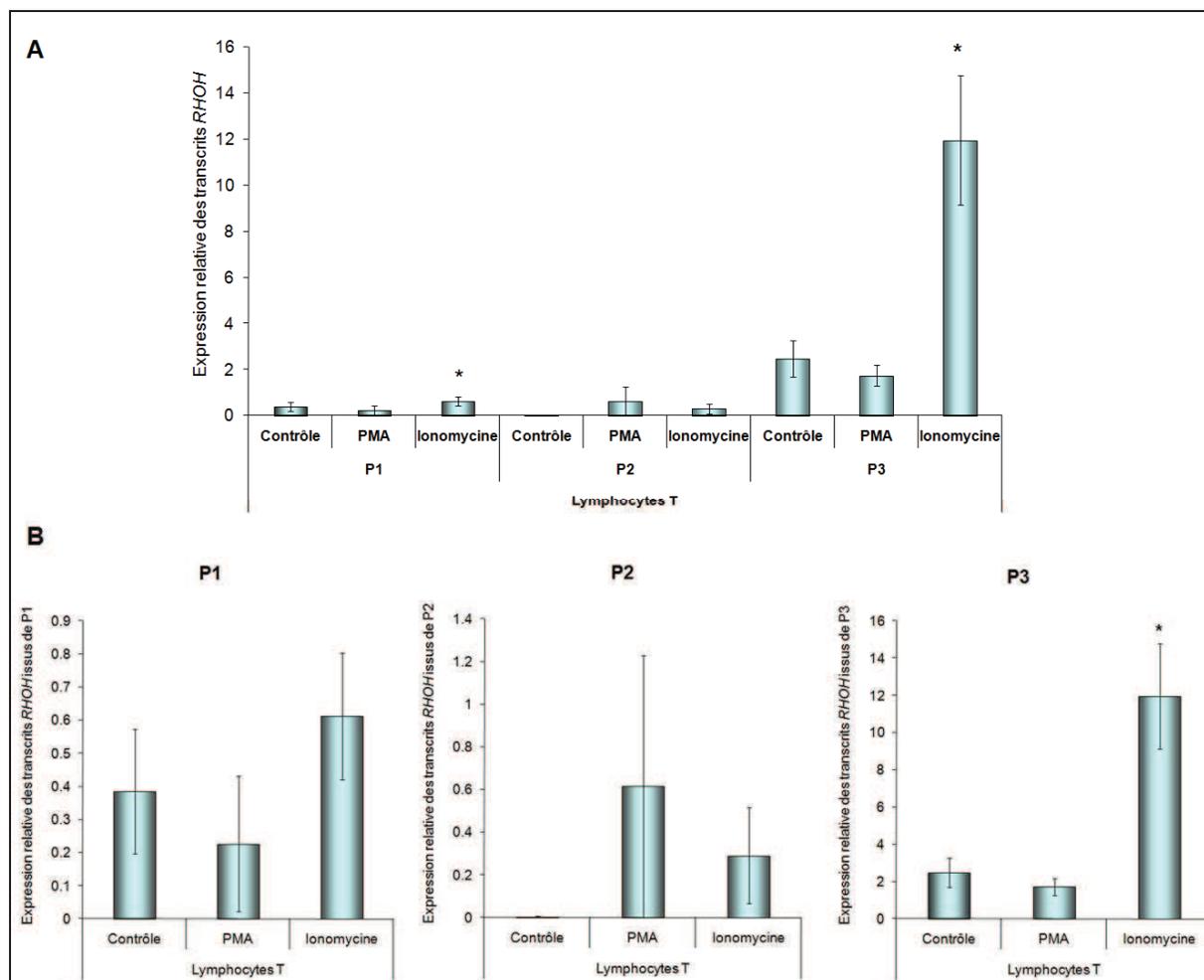


Figure 69 : Expression quantitative des ARN messagers du gène *RHOH* initiés en amont des exons 1, 2 et 4 dans des lymphocytes T cultivés 3 heures avec de la ionomycine ou 24 heures en présence de PMA. Les lymphocytes T ont été cultivés 3 heures en présence de ionomycine (5 μ M) ou de DMSO, ou 24 heures en présence de PMA (100ng/mL) ou de DMSO. L'évaluation de la présence de ces transcrits a été réalisée par PCR quantitative et l'utilisation des amorces décrites dans la **Figure 28**, page 104. L'expression des ARN messagers *RHOH* initiés en amont de l'exon 1 a été représentée en (P1), ceux initiés en amont de l'exon 2 en (P2) et les transcrits initiés en amont de l'exon 4 en (P3), relativement au taux des ARN messagers du gène *ABL*. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expérimentations. *, $p < 0.05$. A. Représentation de la moyenne de 3 expériences à la même échelle. B. Représentation de la moyenne de 3 expériences à une échelle adaptée selon la quantité de chaque type de transcrits.

Cette figure indique que la stimulation par du PMA à 100ng/mL a tendance à diminuer le taux de transcrits issus de P1 et P3, respectivement de 40% et 30%. Au contraire, une augmentation des ARN messagers initiés en amont de P2 est observée (160 fois), quoique

l'expression de ces transcrits reste très faible comparativement à ceux issus de l'activité du promoteur P3 (**Figure 69 Partie A**, page précédente). La culture des lymphocytes T en présence de 5 μ M de ionomycine entraîne une augmentation du taux des isoformes issues de P1 d'un facteur 1.6, de P2 d'un facteur 75 et P3 d'un facteur 4.9. L'augmentation des ARN messagers *RHOH* observée après traitement par la ionomycine correspondrait donc à une induction de la quantité des transcrits initiés en amont des exons 2 et 4, mais principalement de ce dernier (**Figure 69 Partie A**, page précédente). La répression observée par le PMA serait quant à elle due à la réduction du taux des isoformes issues de l'activité de P1 mais surtout de celles issues de P3. Ainsi au cours de l'activation lymphocytaire, les modulations d'expression des transcrits *RHOH* concernent majoritairement ceux initiés en amont de l'exon 4 et ce sont ces ARN messagers qui sont diminués dans la leucémie T de l'adulte. Nous avons décidé de nous focaliser sur l'étude de leur variation au cours de l'activation lymphocytaire T. Ces modifications d'expression peuvent être dues à des événements transcriptionnels (activité du promoteur P3) ou posttranscriptionnels (stabilité des ARN messagers). Dans un premier temps, nous allons nous focaliser sur l'étude du promoteur P3.

4.2.3.1.4 Caractérisation du promoteur P3 du gène *RHOH* dans les lymphocytes T

L'étude d'un promoteur n'est pas chose aisée dans des lymphocytes T isolés de sang et manipulés le jour du prélèvement. Un modèle cellulaire pourrait donc faciliter cette étude. Pour se dire être en possession d'un modèle cellulaire de l'activation lymphocytaire T, dans notre cas, il est nécessaire que les variations de l'expression du gène *RHOH* soit les mêmes lors de la stimulation du modèle cellulaire et lors de l'activation de lymphocytes T normaux. L'identification de facteurs de transcription régulant alors l'activité du promoteur P3 dans ce modèle cellulaire devrait bien entendu ensuite être validée dans les lymphocytes T normaux.

4.2.3.1.4.1 Mise en place du modèle cellulaire Jurkat CD69⁻

Nous avons sélectionné tout d'abord la lignée cellulaire Jurkat détenue au laboratoire, caractérisée par une population CD4⁺, CD25⁻ et CD11c⁻ et ne présentant qu'un faible pourcentage d'expression du marqueur CD69⁺ (15 %) (contrairement à d'autres lignées cellulaires T comme HSB2 ou CEM). Pour ne pas être influencés par les cellules activées et positives pour l'expression du CD69, nous avons décidé de trier la population cellulaire et de

séparer les cellules CD69⁻ des cellules CD69⁺, pour ne travailler que sur des cellules non activées. Nous avons ainsi obtenu un ensemble de cellules Jurkat CD69⁻. Nous avons alors stimulé ces cellules soit par du PMA (100ng/mL) soit par de la ionomycine (5μM), et avons quantifié les transcrits totaux du gène *RHOH* (Figure 70, ci-dessous).

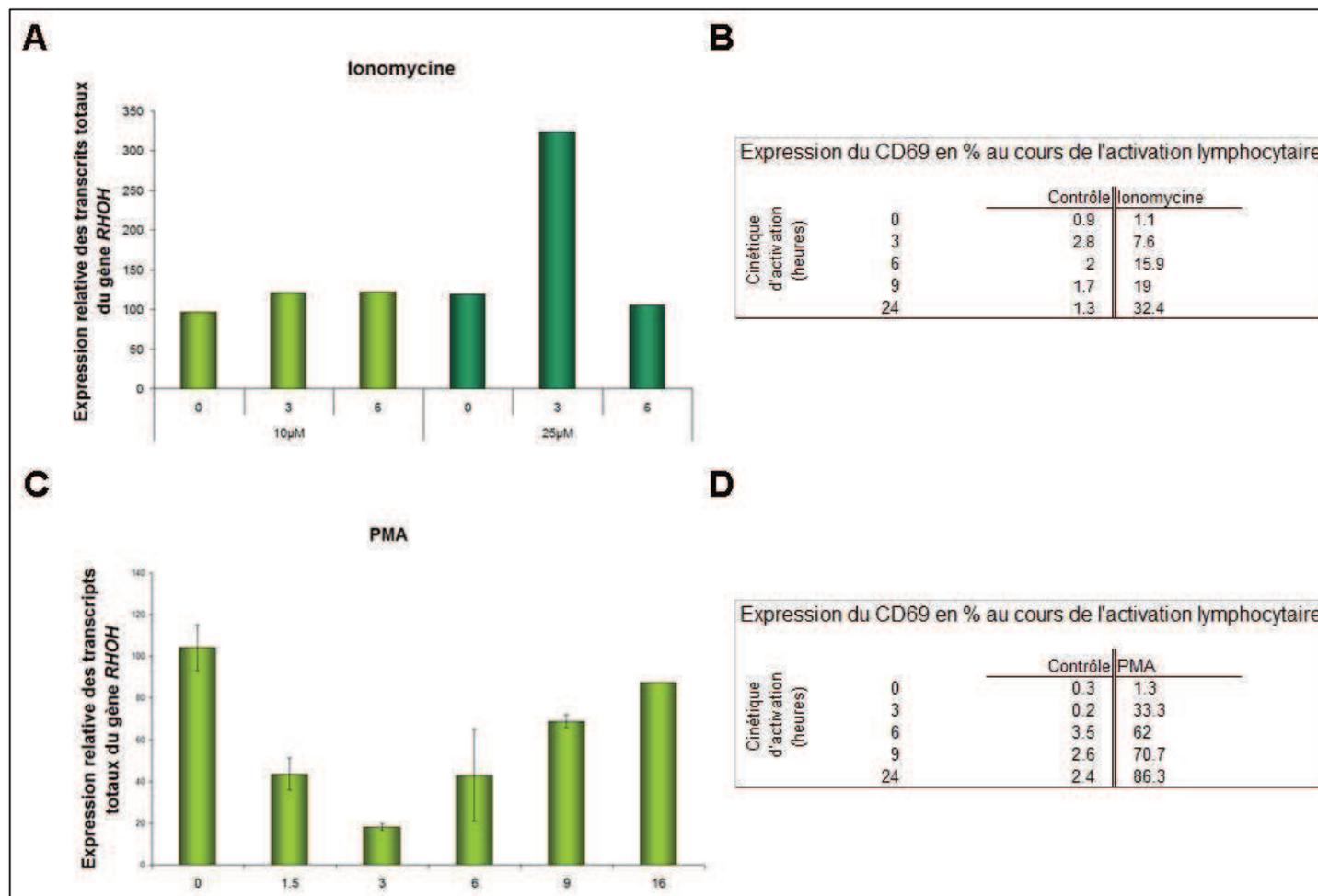


Figure 70 : Étude de l'expression du gène *RHOH* au cours de la stimulation de la lignée cellulaire Jurkat triée CD69⁻ par la ionomycine ou le PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acétate). Les cellules Jurkat CD69⁻ ont été mises en culture en présence de DMSO (DiMéthylSulOxide, contrôle négatif) ou de ionomycine à 5μM durant 24 heures. L'expression du CD69 est montrée dans la partie B. Compte tenu du fait qu'aucune variation de l'expression de *RHOH* n'a été observée à 5μM, nous avons donc stimulé les cellules Jurkat à 10 et 25μM durant 6 heures (partie A, une seule expérience). La stimulation de la lignée Jurkat par du PMA (100ng/mL) a été effectuée durant 16 heures (partie C). Les histogrammes représentent la moyenne de 3 expériences. L'expression du gène *RHOH* a été quantifiée au cours de ces cinétiques par RT-PCR quantitative (chimie TaqMan). L'expression du marqueur CD69 a été vérifiée par cytométrie en flux (partie D).

Nous avons constaté qu'un traitement par 5 et 10μM de ionomycine n'induit aucune variation des ARN messagers *RHOH*, malgré l'expression de CD69 à la surface des cellules dès 5μM de traitement (Figure 70 Partie B, ci-dessus). Nous avons poussé la concentration de ionomycine jusqu'à 25μM. Certes, cette concentration induit une augmentation d'un

facteur 3 du niveau des transcrits *RHOH* à 3 heures ; cependant, la mortalité des cellules est alors tellement importante qu'elle remet en cause les résultats obtenus. Nous pouvons donc conclure que la lignée cellulaire *CD69⁻* n'est pas un bon modèle d'étude pour l'activation lymphocytaire en général, plus particulièrement pour l'étude de la voie de signalisation calcique. En revanche, les variations d'expression du gène *RHOH* observées dans les lymphocytes T après stimulation par du PMA sont retrouvées dans la lignée Jurkat *CD69⁻*. En effet, la stimulation par du PMA à 100ng/mL entraîne une répression du gène *RHOH* dès 1.5 heures jusque 16 heures avec un maximum d'inhibition (80 %) à 3 heures. Ces différences d'expression induites par le PMA dans cette lignée sont-elles dues à la répression du promoteur P3, comme nous l'avons observée dans les lymphocytes T normaux ?

4.2.3.1.4.2 Expression des transcrits issus des promoteurs P1, P2 ou P3 dans la lignée cellulaire Jurkat *CD69⁻* stimulée par le PMA

Pour valider le choix du modèle Jurkat *CD69⁻* pour la suite de notre étude de régulation du promoteur P3 par la voie de signalisation du DAG dans les cellules T, nous avons vérifié dans ce modèle les variations d'expression des ARN messagers *RHOH* spécifiquement initiés en amont des exons 1, 2 ou 4. Nous avons donc cultivé les cellules 3 heures en présence de PMA, quantifié les transcrits *RHOH* et ainsi validé notre modèle (**Figure 71**, page suivante). En effet, la stimulation des cellules Jurkat *CD69⁻* par le PMA entraîne une diminution du taux d'ARN messagers issus des trois promoteurs P1, P2 et P3 ; cependant, l'activité majoritaire est celle du promoteur P3, respectivement 20 et 41 fois plus importante que celles de P1 et de P2 . La lignée cellulaire Jurkat *CD69⁻* peut donc être utilisée comme modèle d'étude pour la régulation de P3 par la voie de signalisation du DAG.

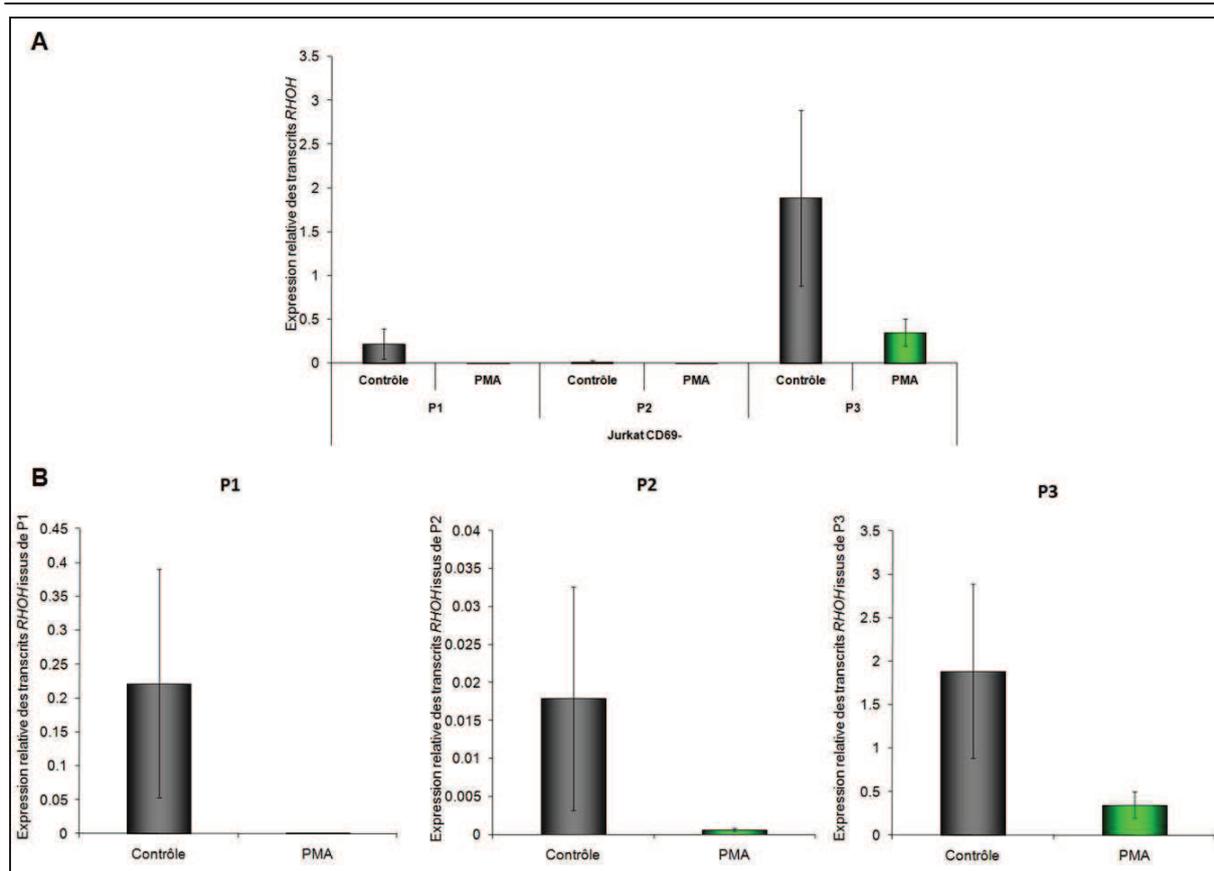


Figure 71 : Expression quantitative des ARN messagers du gène *RHOH* initiés en amont des exons 1, 2 et 4 dans la lignée cellulaire Jurkat CD69⁻ cultivée en présence de PMA (100ng/mL). L'évaluation de la présence de ces transcrits a été réalisée par RT-PCR quantitative. L'expression des ARN messagers *RHOH* initiés en amont de l'exon 1 a été représentée en (P1), ceux initiés en amont de l'exon 2 en (P2) et les transcrits initiés en amont de l'exon 4 en (P3), relativement au taux des ARN messagers du gène *ABL*. Les résultats ont été obtenus à partir de trois expérimentations. A. Représentation de la moyenne de 3 expériences à la même échelle. B. Représentation de la moyenne de 3 expériences à une échelle adaptée à la quantité de chaque type de transcrits issus de chacun des 3 promoteurs étudiés.

4.2.3.1.4.3 Détermination de la séquence minimale du promoteur P3 dans la lignée cellulaire Jurkat CD69⁻

Pour mieux comprendre la régulation du promoteur P3 dans les lymphocytes T, nous avons isolé la séquence minimale possédant la meilleure activité promotrice dans les cellules Jurkat CD69⁻. En transfectant les constructions décrites dans la première partie des résultats et une construction supplémentaire, [-201/+67], dans la lignée Jurkat CD69⁻, nous avons ainsi mis en évidence que la construction [-167/+67] est la séquence pour laquelle un maximum d'activité promotrice a été observée (25 unités au lieu de 15 pour les autres constructions) (**Figure 72**, page suivante). Ces données montrent que dans ces cellules T le promoteur P3 minimal est contenu dans la région -167/+67 (rappelons que dans les cellules B, il s'agissait de la région -236/+67).

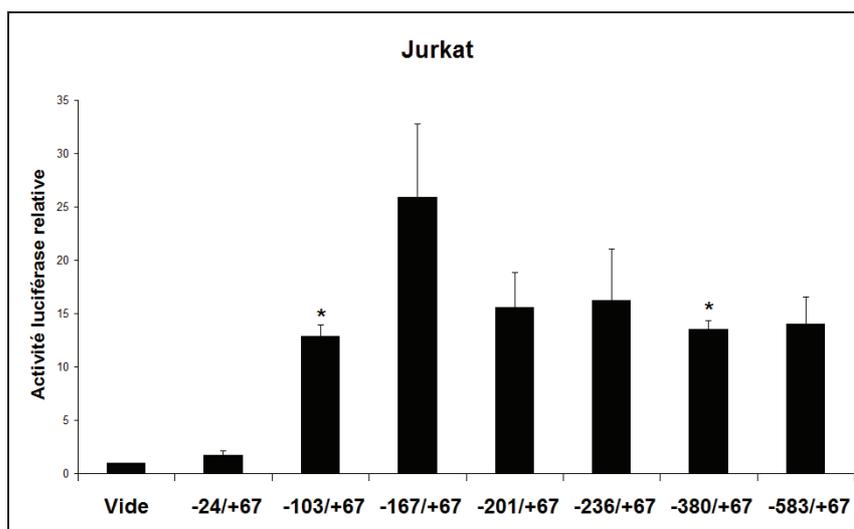


Figure 72 : Etude du promoteur P3 du gène *RHOH* dans la lignée cellulaire Jurkat CD69⁻. 6 constructions utilisées dans la partie 4.1 des Résultats ainsi qu'une nouvelle construction [-201/+67] ont été transfectées dans les cellules. 48 heures après culture, les cellules ont été récupérées et l'activité promotrice évaluée. *, $p < 0.05$.

4.2.3.1.4.4 Régulation du promoteur en présence de PMA dans la lignée cellulaire Jurkat CD69⁻

Nous avons testé l'activité promotrice des constructions précédentes qui a été évaluée dans la lignée Jurkat CD69⁻ 3 heures après transfection, nous avons alors observé une activité luciférase faible. Compte tenu de la diminution du taux de transcrits initiés en amont de l'exon 4 après stimulation par le PMA, notre hypothèse serait que le promoteur P3 soit réprimé. Si l'activité luciférase mesurée pour P3 est déjà faible sans modification des voies de signalisation, il sera difficile de voir une différence lors de la stimulation de la voie du DAG par le PMA. Pour palier ce problème, nous avons généré 5 lignées Jurkat CD69⁻ exprimant chacune de manière stable une construction de promoteur, grâce à la cassette de résistance à l'hygromycine présente dans le plasmide pGL4.14[*luc2/Hygro*] (utilisé pour nos constructions), et une lignée transfectée par le plasmide vide. Pour toujours travailler sur des cellules non stimulées, nous avons trié chaque lignée stable obtenue afin d'obtenir des populations CD69⁻. Nous avons ainsi pu évaluer l'impact de 3 heures de stimulation par le PMA sur l'activité promotrice des différents fragments du promoteur P3, en quantifiant l'activité promotrice en fonction de l'activité de la luciférase et de la quantité de protéines présentes dans chaque échantillon. Nous avons ensuite représenté les résultats en % du contrôle négatif (plasmide pGL4.14[*luc2/Hygro*] vide dont l'activité a été fixée à 100%) (**Figure 73**, page suivante).

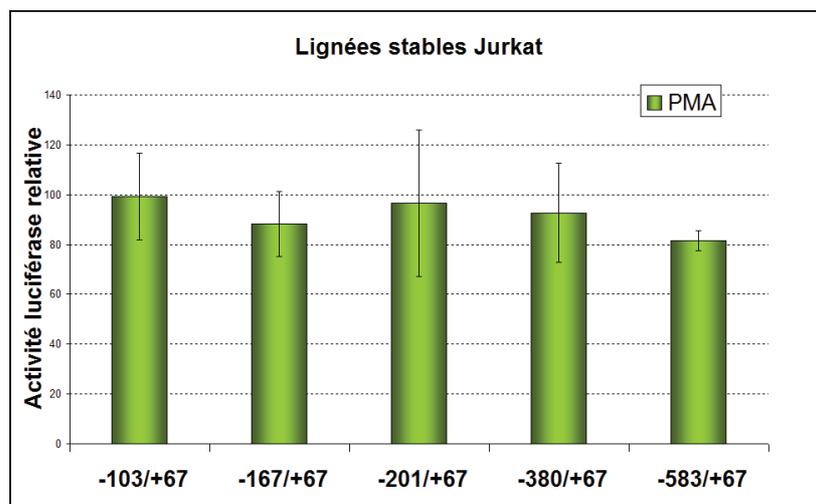


Figure 73 : Etude du promoteur P3 du gène *RHOH* à partir des lignées cellulaires Jurkat CD69⁺ exprimant de manière stable chaque construction. Les cellules de chaque lignée cellulaire Jurkat CD69⁺ exprimant de manière stable un fragment du promoteur P3 ont été stimulées 3 heures par du PMA puis l'activité promotrice a été évaluée (activité luciférase normalisée par la quantité de protéines présentes dans chaque échantillon). Les résultats ont été représentés en pourcentage d'activité du contrôle négatif (cellules exprimant chaque construction cultivées en présence de DMSO). Les histogrammes représentent une moyenne de 3 expériences.

Nous avons ainsi observé au maximum une diminution de l'activité promotrice de 20% et ceci pour la construction -583/+67. Nous suggérons donc qu'un site potentiel pour un facteur de transcription sensible à la voie du DAG soit situé principalement entre les nucléotides -583 et -380, en regard du site d'initiation de la transcription situé en amont de l'exon 4. Par une approche bioinformatique, nous avons étudié cette séquence [-583/-380] et mis en évidence 1 site potentiel pour la fixation de NFκB dont la séquence consensus est GGGA_GNNT_CT_CCC, 1 site pour le facteur GATA dont la séquence est A_TGATAA_G, et environ 10 sites pour le facteur C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) interagissant avec la séquence consensus TTGGCGAA. Ces facteurs de transcription sont régulés et activés par la voie du DAG et se présentent comme des régulateurs négatifs potentiels du promoteur P3 dans les cellules T. En effet, il a été décrit que les facteurs NFκB, GATA et C/EBPβ sont des répresseurs transcriptionnels des gènes *TNFA*, *CBFB* et de la transcription du virus de l'Hépatite B, respectivement [271-273]. Ces facteurs pourraient donc réprimer le promoteur P3 du gène *RHOH* dans la lignée lymphoïde T Jurkat.

4.2.3.1.4.5 Régulation du promoteur P3 par stimulation par la ionomycine dans les lymphocytes T normaux

Puisque la lignée cellulaire Jurkat CD69⁻ ne peut être un modèle d'étude de la régulation du promoteur P3 dans les cellules T suite à l'activation de la voie calcique par la ionomycine, nous avons entrepris d'étudier le promoteur P3 dans les lymphocytes T. Nous avons donc transfecté les lymphocytes T avec 8 différentes constructions et mis en culture les cellules en présence de ionomycine. Trois heures après, l'activité promotrice a été évaluée pour chaque construction (**Figure 74**, ci-dessous). Bien qu'il s'agisse de résultats préliminaires, nous avons observé une augmentation de l'activité de la région [-236/+67] suite à l'activation de la voie calcique, suggérant la présence d'un élément régulateur entre les nucléotides [-236/-201]. Nous avons effectué une analyse bioinformatique de cette région et nous avons observé deux sites pour les facteurs de transcription GATA et SRY, activés suite à la stimulation de la voie calcique [274, 275] (**Figure 75**, page suivante). Ces sites pourraient donc être des éléments cis régulateurs du promoteur P3 au cours de la stimulation lymphocytaire T. En effet, les facteurs de transcription GATA et SRY sont impliqués dans la régulation positive de la transcription des gènes *IL4*, *IL13*, *IL5* (GATA). Ils pourraient donc réguler positivement le promoteur P3 dans les lymphocytes T dans lesquels la voie calcique a été activée.

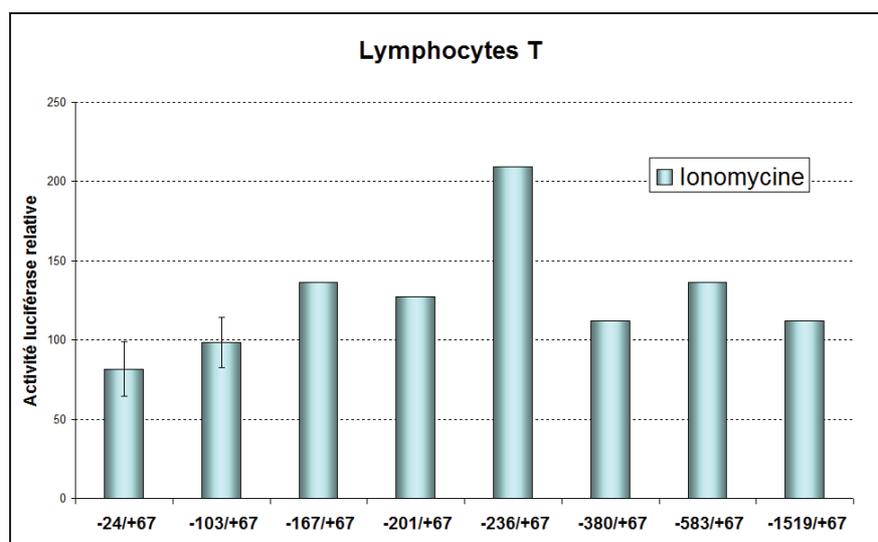


Figure 74 : Etude préliminaire de l'activité du promoteur P3 du gène *RHOH* dans les lymphocytes T normaux cultivés en présence de ionomycine (une seule expérience). Après isolement, les cellules T ont été cotransfectées par chacune des constructions du promoteur P3 et du plasmide pRSV- β gal, puis mis 3 heures en culture en présence de ionomycine (5 μ M). L'activité promotrice a ensuite été évaluée comme décrit dans la **Figure 73**, page précédente.

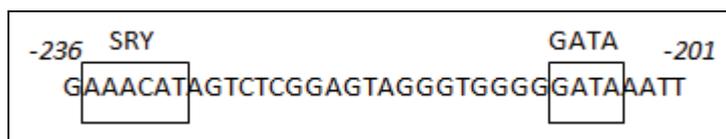


Figure 75 : Analyse bioinformatique de la région -236/-201 du promoteur P3 du gène *RHOH*. La séquence a été étudiée par les programmes TFSearch et Match-P pour la recherche de sites de fixation de facteurs de transcription.

En résumé, nos recherches nous ont donc permis de montrer que le gène *RHOH* est induit pendant les 6 premières heures de l'activation lymphocytaire T, puis qu'il est réprimé pour retourner à un niveau basal d'expression. Ces variations correspondent principalement à une modification de la transcription des ARN messagers initiés en amont de l'exon 4, c'est-à-dire ceux issus de l'activité du promoteur P3. L'augmentation de ces transcrits dans les lymphocytes T est mimée par l'activation de la voie calcique et semble être la conséquence de la modulation de l'activité de facteurs de transcription régulés par cette voie, dont les motifs sont présents entre les nucléotides -236 et -201 du promoteur P3 du gène *RHOH*. Nos données suggèrent également que la répression des isoformes initiées en amont de l'exon 4 dans la lignée lymphoïde T Jurkat, suite à l'activation de la voie du DAG, serait le résultat de l'activité de facteurs de transcription régulés par cette voie et dont les motifs sont présents entre les nucléotides -583 et -380. La nature des protéines régulatrices impliquées n'a pas encore été déterminée à ce jour.

4.2.3.2 Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans la répression du gène *RHOH* dans la leucémie T de l'adulte

Au laboratoire, notre équipe, en collaboration avec le Dr Carl Simon Shelley (La Crosse, WI, USA) a mis en évidence la répression du gène *RHOH* dans les cellules leucémiques de certains patients atteints de la leucémie T de l'adulte et plus particulièrement dans les lignées cellulaires modèles de l'ATL (**données du laboratoire**). La restitution de l'expression de RhoH dans les cellules de la leucémie à tricholeucocytes contrecarre le phénotype de la maladie [223]. Nous avons donc exprimé de manière ectopique RhoH dans la lignée cellulaire ATL KK1. Les conséquences phénotypiques de cette restitution d'expression sont en cours d'analyse au laboratoire. En parallèle, nous avons voulu comprendre les

mécanismes responsables de cette répression de *RHOH* dans la leucémie ATL. L'identification des facteurs impliqués et la modulation de leur expression pourrait nous permettre de restituer l'expression du gène *RHOH* dans ces cellules tumorales.

Nous avons récemment mis en évidence que cette régulation négative du gène *RHOH* dans l'ATL était corrélée à une forte diminution des transcrits initiés en amont de l'exon 4, par le promoteur P3 (**données non montrées**). Les mécanismes moléculaires responsables de cette répression peuvent être soit des évènements transcriptionnels (promoteur), soit post-transcriptionnels (stabilité des ARN messagers). Nous avons axé notre étude sur la régulation du promoteur P3 de *RHOH* dans les cellules ATL. Notre hypothèse était que l'activité de ce promoteur soit fortement inhibée dans ces cellules, conduisant à la répression du gène *RHOH*. Pour l'étude du promoteur, nous avons choisi la lignée cellulaire KK1 comme modèle de la leucémie T de l'adulte. Pour mettre en évidence une modification de l'activité du promoteur P3, nous avons voulu transfecter dans la lignée KK1 des constructions plasmidiques de P3 détenues au laboratoire (décrites **Figure 38**, page 118). Pour débiter ces expériences, nous avons voulu avoir une idée de la répression du promoteur P3 en considérant les séquences les plus longues de celui-ci. Il s'agit des fragments ([-1519/+245], [-583/+245] et [-583/+67] (**Figure 76**, ci-dessous). En parallèle, nous avons transfecté ces mêmes constructions dans la lignée lymphoïde T Jurkat, caractérisée par une expression plus forte de *RHOH*, afin de vérifier la spécificité d'éventuelles variations de l'activité promotrice observées dans la lignée KK1.

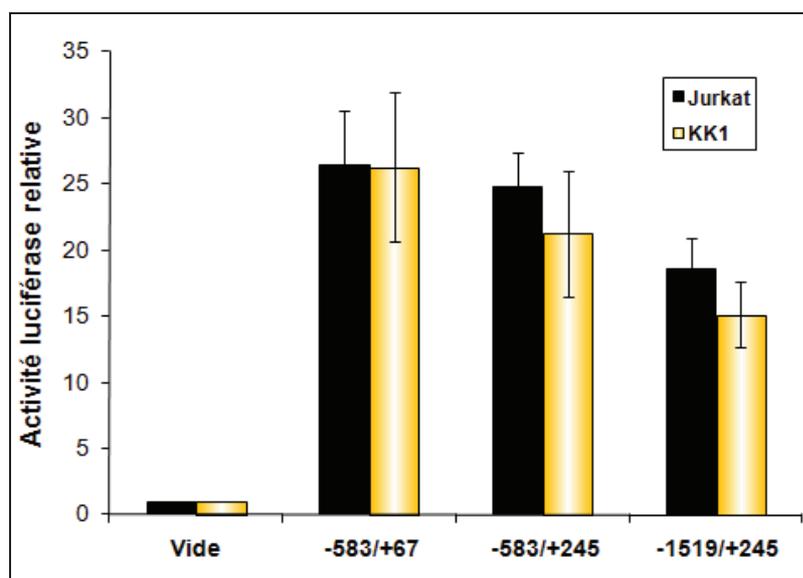


Figure 76 : Etude du promoteur P3 de *RHOH* dans la lignée cellulaire KK1, modèle de la leucémie T de l'adulte comparée à une lignée lymphoïde T contrôlée, Jurkat. Les séquences indiquées [-583/+67], [-583/+245] et [-1519/+245] contenues dans le plasmide pG14.14[*luc2/Hygro*] (détaillées **Figure 38**, page 118) ont été transfectées dans les lignées Jurkat et KK1 par électroporation. Après 48 heures de culture, les cellules ont été récupérées et l'activité promotrice évaluée comme expliquée **Figure 39**, page 119.

Dans la lignée ATL KK1, nous avons observé des activités promotrices identiques à celles observées dans la lignée non-ATL Jurkat, de 15 ([-1519/+245]) à 25 unités ([-583/+67]). Cette absence de différence est certainement due au fait que nous n'avons pas étudié l'ensemble des constructions plasmidiques du promoteur P3. Il serait intéressant d'étudier l'activité promotrice des séquences [-24/+67], [-103/+67], [-167/+67], [-236/+67] dans ces deux lignées (KK1 et Jurkat). Rappelons que l'activité promotrice maximale dans la lignée Jurkat a été observée pour la construction [-167/+67]. La répression du promoteur P3 dans la lignée ATL est peut être donc visualisable avec cette séquence. Nos résultats nous permettent tout de même de mettre en évidence que les séquences comprises entre les nucléotides -1519 et -583 et entre +67 et +245 contiennent des motifs répresseurs. En effet, une diminution d'environ 20% est observée entre les activités promotrices des constructions [-583/+67] et [-583/+245]. De même, une diminution de 25% est observée entre les activités promotrices des constructions [-583/+245] et [-1519/+245]. Si nous comparons les activités promotrices de ces constructions plasmidiques de P3 dans les lignées KK1 et Jurkat à celles obtenues dans les cellules lymphoïdes B, nous observons des similarités : des éléments répresseurs de la transcription sont présents entre les nucléotides [-1519/-583] et [+67/+245].

4.3 Identification de potentielles nouvelles cibles de RhoH dans les cellules lymphoïdes B et T

4.3.1 Recherche de nouvelles cibles potentielles de la protéine RhoH dans les cellules lymphoïdes B

Récemment, il a été montré que dans des cellules proB murines, RhoH régule négativement la prolifération cellulaire dépendante de l'IL3 [200]. Les mécanismes signalétiques font intervenir la voie JAK/STAT : l'inactivation de RhoH entraîne une activation de STAT5 et sa surexpression augmente l'activation de STAT1 et l'expression du récepteur à l'IL3 à la surface cellulaire. Au laboratoire, nous disposons d'un modèle cellulaire (JOK-1) caractérisé par une faible expression du gène *RHOH*. Ce modèle a été précédemment utilisé par notre équipe, en collaboration avec le Dr Carl Simon Shelley, pour l'étude du rôle physiopathologique de RhoH dans la leucémie à tricholeucocytes. L'expression de RhoH a été restituée de manière ectopique dans ce modèle cellulaire, entraînant une diminution de la prolifération, de l'adhésion et de la migration cellulaires [223]. La restitution de cette expression contrecarre également le phénotype leucémique dans un modèle murin de

xénogreffe, en réduisant la taille des tumeurs, la splénomégalie et en augmentant la survie des souris. Le mécanisme signalétique par lequel la protéine RhoH agit dans ces cellules n'a pas encore été établi à ce jour. Compte tenu des caractéristiques du modèle JOK-1, nous avons tenté de mettre en évidence les voies de signalisation modulées par l'expression de la protéine RhoH dans ces cellules lymphoïdes B. Pour avoir une vue d'ensemble de ces modifications, notre équipe a réalisé une comparaison de l'expression des gènes dans ce modèle cellulaire (JOK-1) exprimant stablement la protéine RhoH exogène (JOK-RhoH) ou ne l'exprimant pas (JOK-Contrôle) (cellules transfectées par le plasmide vide).

4.3.1.1 Analyse transcriptomique suite à la restitution de l'expression de RhoH dans la lignée lymphoïde B JOK-1

Cette analyse transcriptomique a été effectuée par la Plateforme AGILENT-AFFYMETRIX de la Plateforme de Génomique, Protéomique et Bioinformatique de l'Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique-Institut Fédératif de Recherche 114. Les puces ont été hybridées par Sabine Quief et Céline Villenet, et les analyses effectuées par le Dr Jean-Pierre Kerckaert et le Dr Martin Figeac. Nous avons ainsi obtenu une liste de gènes pour lesquels une variation de la transcription a été statistiquement observée, avec une valeur de $p < 0.05$, dans les cellules JOK-RhoH comparativement aux cellules JOK-Contrôle. Une liste de plus de 300 gènes présentant une variation d'expression d'un facteur 1.5 au minimum entre les lignées a été obtenue par cette analyse. Compte tenu des travaux récemment publiés, nous avons regardé dans cette liste si des variations de la voie JAK-STAT étaient observées dans nos expériences. Nous avons ainsi vu à notre tour que la restitution de l'expression de RhoH dans notre modèle entraîne une augmentation du taux de transcrits du gène du récepteur α de l'IL3, résultats en accord avec la récente publication évoquée plus haut, page précédente. En relation avec la voie JAK-STAT, la transcription du gène *CD127* (ou récepteur à l'IL7) est également induite en présence de RhoH. Au laboratoire, nous avons tenté de mettre en évidence de potentielles nouvelles cibles de RhoH, grâce à notre analyse transcriptomique. Treize gènes ont été sélectionnés sur la base de leur variation d'expression et de leur rôle dans certaines voies de signalisation : soit RhoH induit une augmentation de leur expression (gènes *GAS7*, *RAMP1*, *C/EBPB*, *NMU* et *PRKCA*), soit au contraire ils sont réprimés par RhoH (gènes *GPR30*, *CASP1*, *KYNU*, *MARCH1*, *CSF1R*, *BCHE*, *SAMSNI* et *FCRL2*) (**Figure 63**, page suivante).

Gène	JOK-RhoH vs JOK-Contrôle	Description	Accession	Locus
GAS7	5.44	Growth Arrest-Specific 7	NM_201433.1	17p13.1
RAMP1	4.73	Receptor (G protein-coupled) Activity Modifying Protein 1	NM_005855.2	2q36-q37.1
C/EBPB	1.98	CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP), Beta	NM_005194.2	20q13.1
NMU	1.75	Neuromedin U	NM_006681.2	4q12
PRKCA	1.56	Protein Kinase C, Alpha	NM_002737	17q22-q23.2
GPR30	0.47	G Protein-coupled Receptor 30	NM_001039966.1	7p22.3
CASP1	0.47	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase	NM_033292.2	11q23
KYNU	0.36	Kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	NM_003937.2	2q22.2
MARCH1	0.34	Membrane-Associated Ring finger (C3HC4) 1	NM_001136373.1	4q32.3
CSF1R	0.34	Colony Stimulating Factor 1 Receptor	NM_005211.3	5q33-q35
BCHE	0.33	Butyrylcholinesterase	NM_000055.2	3q26.1-q26.2
SAMSN1	0.32	SAM domain, SH3 domain and Nuclear localization signals 1	NM_022136.3	21q11
FCRL2	0.21	Fc receptor-like 2	NM_030764.3	1q21

Figure 63 : Liste de 13 gènes présentant une variation d'expression induite par la protéine RhoH dans les cellules HCL JOK-1. Les ARN totaux isolés de deux couples de lignées lymphoïdes B JOK-RhoH et JOK-Contrôle ont été analysés sur puces à ADN *Human Whole Genome Agilent 44K* sur lesquels sont fixés des oligonucléotides 60-mer, après amplification, marquage, fragmentation, hybridation et lavage, étapes recommandées par le protocole *Two-Color Microarray-Based Gene Expression* du fournisseur (*Agilent technologies*). Les puces ont été analysées en « flip-flop » par un scanner *Agilent DNA Microarray G2505B*. Les données d'expression ont été extraites par le logiciel *Feature Extraction* (version 9.1.3.1) et traitées par le programme *GeneSpring* version 7.3 (*Agilent Technologies*). Les analyses statistiques ont été effectuées selon le *student t-test*, les valeurs obtenues sont significatives avec une valeur de p inférieure à 0.05.

4.3.1.2 Etude de l'expression des gènes *GAS7*, *RAMP1*, *PRKCA*, *CASP1*, *KYNU*, *GPR30* et *SAMSN1* dans la lignée cellulaire Raji où la protéine *JunD* a été soit invalidée, soit surexprimée

Pour vérifier le rôle de RhoH sur la régulation de ces gènes, nous avons utilisé un second modèle cellulaire : la lignée Raji, dans laquelle nous avons soit invalidé le facteur de transcription JunD, ceci entraînant une augmentation de l'expression de *RHOH*, soit surexprimé cette protéine, ceci induisant une diminution des transcrits *RHOH*. Bien que nous n'ayons pas encore pu vérifier la variation du taux d'expression de la protéine RhoH dans ces conditions, nous avons évalué la quantité des ARN messagers dans ces cellules pour certains des treize gènes précédemment sélectionnés, dans l'objectif de trouver des variations communes aux deux modèles Raji et JOK1 (**Figure 64**, page suivante).

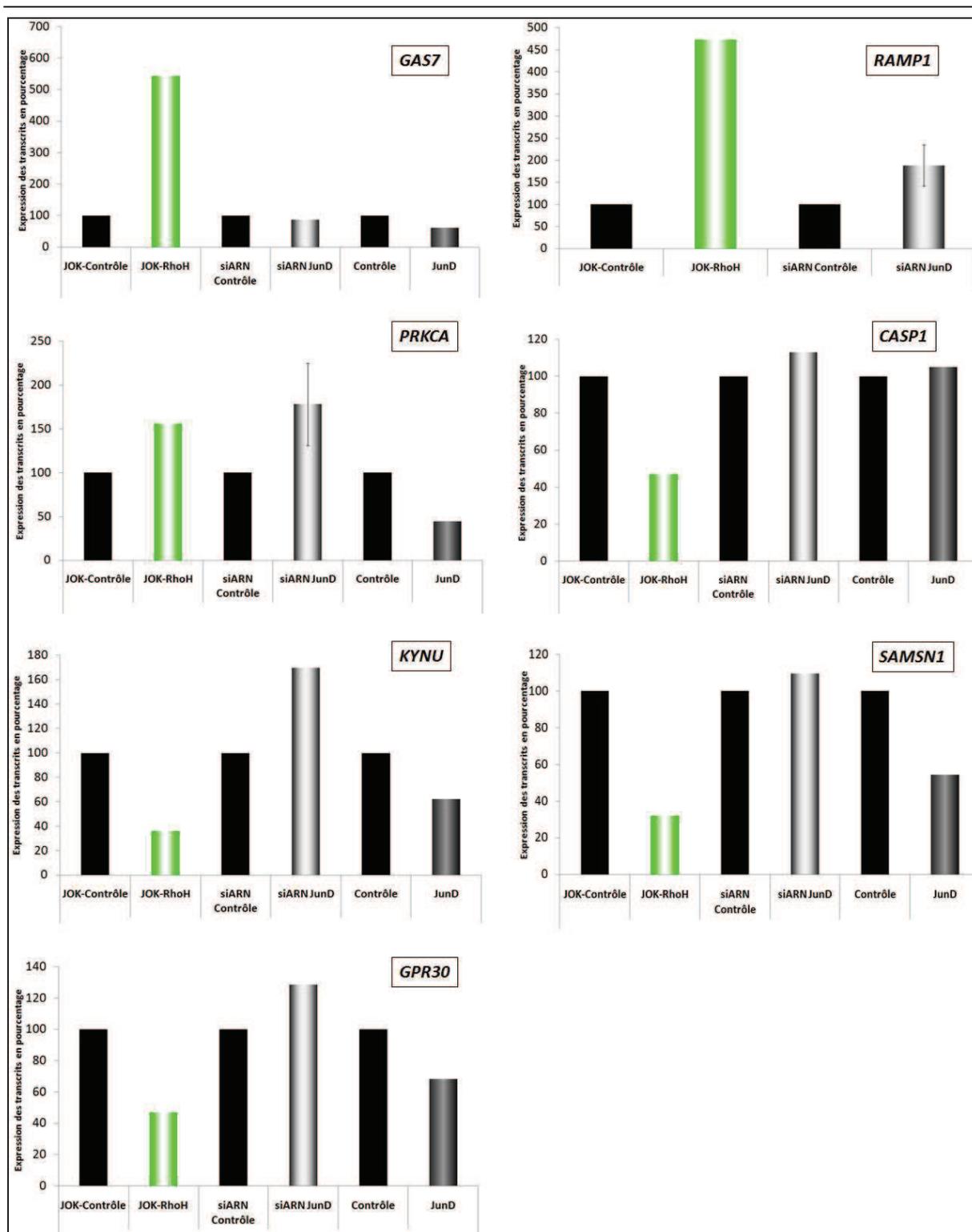


Figure 64 : Représentation du pourcentage de l’expression des gènes *GAS7*, *RAMP1*, *PRKCA*, *CASP1*, *KYNU*, *SAMSNI* et *GPR30* dans les cellules JOK-1 exprimant la protéine RhoH de manière exogène (JOK-RhoH) comparées aux cellules JOK-Contrôle, et dans la lignée cellulaire Raji dans laquelle le facteur de transcription JunD a été soit invalidé, soit surexprimé. Les variations d’expression de ces gènes observées dans les cellules JOK-RhoH comparées aux cellules JOK-Contrôle par l’analyse sur puces à ADN (Figure 63, page précédente) ont été représentées en pourcentage du contrôle sur ces graphiques. Dans les cellules Raji, le facteur de transcription JunD a été invalidé par transfection d’un ARN interférent (en parallèle avec un ARN interférent contrôle) ou ce facteur JunD a été surexprimé dans ces mêmes cellules par transfection du plasmide pRSV-hJD (en parallèle avec le plasmide vide contrôle) (Figure 46, page 129). Après 48 heures de culture, l’expression des gènes *GAS7*, *RAMP1*, *PRKCA*, *CASP1*, *KYNU*, *SAMSNI* et *GPR30* a été quantifiée. Les résultats ont été représentés en pourcentage d’expression du contrôle pour chaque condition. Il s’agit de données préliminaires obtenues d’une seule transfection soit de siARN ciblant JunD, soit de JunD ; hormis pour la quantification de *PRKCA* et *RAMP1* réalisée pour deux expériences de transfection.

Rappelons les résultats observés précédemment : l'invalidation de JunD dans les cellules Raji entraîne une augmentation du taux de transcrits *RHOH* et à l'inverse, la surexpression de ce facteur de transcription dans ces cellules conduit à une diminution d'expression des transcrits *RHOH*. Nous disposons donc de deux modèles : le premier est la lignée JOK-1 où l'expression de RhoH a été restituée, le second la lignée Raji où le niveau d'expression des transcrits *RHOH* a été soit augmenté (par invalidation de JunD), soit diminué (par surexpression de JunD). L'identification d'une cible potentielle de la protéine RhoH dans ces cellules B est conditionnée par l'observation d'une variation similaire de ce gène à la fois dans les cellules JOK-RhoH et dans les cellules Raji transfectées par un siARN ciblant les transcrits *JUND*. A l'inverse, nous devrions observer une variation opposée dans les cellules Raji où la protéine JunD a été surexprimée. L'analyse de l'expression des gènes *GAS7*, *RAMPI*, *PRKCA*, *CASPI*, *KYNU*, *SAMSNI* dans ces deux modèles (JOK-RhoH et Raji-siARN JunD) nous a permis d'observer des variations comparables pour deux des gènes : *PRKCA* et *RAMPI*. Le taux des ARN messagers du gène *RAMPI* est augmenté de 4.73 et de 1.89 fois, respectivement, dans les cellules JOK-RhoH et les cellules Raji transfectées par un siARN ciblant *JUND*. Malgré le fait que nous n'ayons pas encore pu quantifier les transcrits de ce gène dans les cellules Raji où la protéine JunD a été surexprimée, ces résultats préliminaires suggèrent que *RAMPI* pourrait être un effecteur potentiel de RhoH. D'autre part, une induction d'un facteur 1.76 du taux des transcrits *PRKCA* est obtenue dans les cellules Raji où JunD a été invalidée, valeur proche du facteur 1.56 observé dans les cellules JOK-RhoH. De plus, l'expression ectopique de JunD dans la lignée cellulaire Raji entraîne une diminution d'un facteur 2.27 de l'expression des ARNm de *PRKCA*. Ces données préliminaires semblent indiquer que les gènes *RAMPI* et plus particulièrement *PRKCA* sont des cibles potentielles de la protéine RhoH, dans les cellules lymphoïdes B [11].

4.3.2 Recherche d'effecteurs protéiques de RhoH dans les lymphocytes T

Pour les lymphocytes T, il a été montré que RhoH joue un rôle important dans l'activation du TCR : elle régule la fonction de Lck, la phosphorylation de ZAP70, LAT et de PLC γ 1. Dans d'autres conditions, elle inhibe NF κ B, l'activation de p38, Rac1, RhoA et Cdc42. Nous disposons au laboratoire d'un modèle cellulaire de lymphocytes T exprimant

faiblement le gène *RHOH* (lignée KK1). Dans notre équipe, ces cellules ont été utilisées pour générer soit une lignée exprimant de manière stable la protéine RhoH (cellules KK1 transfectées par le plasmide pMEP-RhoH et appelées KK1-RhoH), soit une lignée contrôle similaire à la parentale et exprimant un taux faible de RhoH (cellules KK1 transfectées par le plasmide vide pMEP4 et appelées KK1-Contrôle) (mêmes plasmides que ceux utilisés dans la lignée JOK-1 [223]). L'analyse de l'expression de l'ensemble des gènes dans ces cellules pourrait nous aider à identifier de nouvelles voies de signalisation modulées en présence de RhoH et ainsi des cibles potentielles de cette protéine.

4.3.2.1 Analyse transcriptomique suite à la restitution de l'expression de RhoH dans la lignée lymphoïde T KK1

Après avoir généré, en collaboration avec le Dr Carl Simon Shelley les deux lignées cellulaires KK1 exprimant ou non la protéine RhoH, l'équipe a mis en place une analyse transcriptomique de ces dernières, qui a été effectuée par la plateforme AGILENT-AFFYMETRIX de la plateforme de Génomique, Protéomique et Bioinformatique de l'Institut de Médecine Préventive et de la Recherche Thérapeutique – Institut Fédératif de Recherche 114. Les lames ont été hybridées par Sabine Quief et Céline Villenet, et les analyses effectuées par les Drs Jean-Pierre Kerckaert et Martin Figeac. Nous avons ainsi obtenu une liste de gènes pour lesquels une variation d'expression a été statistiquement observée, avec une valeur de $p < 0.05$, dans les cellules KK1-RhoH comparativement aux cellules KK1-Contrôle. Une liste de 130 gènes présentant une variation d'un facteur minimum de 1.5 fois a été obtenue par cette analyse. Compte tenu du rôle de RhoH dans l'activation de la voie du TCR, nous avons porté notre attention sur des gènes présentant des variations d'expression en présence de RhoH et impliqués dans la voie de signalisation du TCR, la voie calcique, dans l'expression de cytokines, de chémokines et de leurs récepteurs et dans la voie du TNF (**Figure 77**, page suivante). Nous avons également observé une variation d'expression de certains gènes de récepteurs couplés aux protéines G et de facteurs de transcription, tel Runx1 (**Figure 77**, page suivante). D'autres gènes, comme *MAGEB2*, *PASD1*, *SLA*, *SH2D1B*, *MAGEA9*, *LPHN3*, *BCHE*, *CFHR1*, *IQCG*, présentent chacun une importante modulation de leur expression induites par RhoH. C'est pour cette raison que nous les avons également étudiés (**Figure 77**, page suivante).

Gène	KK1-RhoH vs KK1-Contrôle, n=2	Description	Accession	Locus
Voie du TCR				
LAT	2.51	linker for activation of T cells, transcript variant 1	NM_014387	16p11.2
PLCG2	2.49	phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)	NM_002661	16q23.3
Voie calcique				
NMU	7.64	neuromedine U	NM_006681	4q12
CAMK2N1	1.61	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	NM_018584	1p36.12
CAMK2D	0.66	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta, NM_001221	NM_001221	4q26
CAMK1D	0.57	calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID, transcript variant 2	NM_153498	10p13
Cytokines				
IL16	3.51	interleukine 16 (facteur chémoattractant), transcript variant 1	NM_004513	15q25.1
IL4	2.73	interleukine 4, transcript variant 1	NM_000589	5q31.1
IL26	0.37	interleukine 26	NM_018402	12q15
IL13	0.14	interleukine 13	NM_002188	5q31.1
IL23A	0.11	interleukine 23, sous-unité alpha p19	NM_016584	12q13.2
Chémokines				
CCL23	0.55	chémoquine (C-C motif) ligand 23, transcript variant CKbeta8-1	NM_005064	17q12
CCL4	0.51	chémoquine (C-C motif) ligand 4, transcript variant 1	NM_002984	17q12
CCL3	0.51	mRNA for pLD78 peptide, complete cds	D00044	17q12
CCL1	0.15	chémoquine (C-C motif) ligand 1	NM_002981	17q12
Récepteurs aux chémokines				
CCRL2	2.88	chémoquine (C-C motif) récepteur-like 2	NM_003965	3p21.31
CCR5	0.49	chémoquine (C-C motif) récepteur 5	NM_000579	3p21.31
CXCR7	0.41	chémoquine (C-X-C motif) récepteur 7, transcript variant 2	NM_020311	2q37.3
CCR4	0.29	chémoquine (C-C motif) récepteur 4	NM_005508	3p22.3
Voie du TNF				
LTA	0.36	lymphotoxine alpha (superfamille du TNF, member 1)	NM_000595	6p21.33
TNF	0.20	tumor necrosis factor (superfamille du TNF, member 2)	NM_000594	6p21.33
Récepteurs couplés aux protéines G				
GPR84	0.44	Récepteur 84 couplé aux protéines G	NM_020370	12q13.13
GPR56	0.38	Récepteur 56 couplé aux protéines G, transcript variant 3	NM_201525	16q13
GPR30	0.35	Récepteur 30 couplé aux protéines G, transcript variant 2	NM_001505	7p22.3
GPR171	0.24	Récepteur 171 couplé aux protéines G	NM_013308	3q25.1
Facteurs de transcription				
RUNX1	1.80	runt-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene), transcript variant 2	NM_001001890	21q22.12
Les 9 plus grandes variations				
MAGEB2	28.04	melanoma antigen family B, 2	NM_002364	Xp21.2
PASD1	15.23	PAS domain containing 1	NM_173493	Xq28
SLA	12.49	Src-like-adaptor, transcript variant 3	NM_006748	8q24.22
SH2D1B	12.45	compléter		
MAGEA9	12.33	melanoma antigen family A, 9	NM_005365	Xq28
LPHN3	0.08	latrophilin 3	NM_015236	4q13.1
BCHE	0.08	butyrylcholinesterase	NM_000055	3q26.1
CFHR1	0.06	complement factor H-related 1	NM_002113	1q31.3
IQCG	0.04	IQ motif containing G	NM_032263	3q29

Figure 77 : Liste de gènes dont l'expression varie en présence de la protéine RhoH dans les cellules KK1. Les ARN totaux isolés de deux couples de lignées lymphoïdes T KK1-RhoH et KK1-Contrôle ont été analysés comme décrit dans la **Figure 62**, page 157. Les analyses statistiques ont été effectuées selon le *student t-test*, et les valeurs obtenues sont significatives avec une valeur de p inférieure à 0.05.

4.3.2.2 Etude de l'expression de ces gènes dans des lymphocytes T activés

Pour vérifier le rôle de RhoH sur la régulation de ces gènes, nous avons utilisé un second modèle cellulaire : des lymphocytes T de sang périphérique stimulés durant 3 heures par 5 μ M de ionomycine. Ce traitement les active, entraînant une augmentation du taux de transcrits *RHOH*. Bien que nous n'ayons pas encore pu confirmer la variation d'expression

de la protéine dans ces cellules T stimulées par la ionomycine, nous avons tout de même utilisé ce modèle d'activation pour évaluer l'expression de nos gènes d'intérêt soit par RT-PCR quantitative, soit en quantifiant le taux de protéines correspondantes, cette dernière approche nous permettant de nous rapprocher de l'état fonctionnel du gène dans la cellule. Nos attentes étaient d'identifier des variations d'expression similaires dans les deux modèles (KK1-RhoH et lymphocytes T activés) et de mettre ainsi en évidence de potentielles nouvelles cibles de RhoH. Ce travail est une étude préliminaire : les résultats obtenus seront à valider par la suite, afin de confirmer la véracité de nos hypothèses.

4.3.2.2.1 Analyse de la voie du TCR

RhoH intervient positivement dans l'activation du TCR en interagissant directement avec les protéines ZAP70 et Lck et en régulant l'activité de LAT et PLCG2 (paragraphe page). Dans notre modèle KK1-RhoH, les taux des transcrits des gènes *LAT* et *PLCG2* sont augmentés, respectivement d'un facteur de 2.51 et 2.49. Aucune quantification n'a pu être effectuée au laboratoire pour ces deux gènes. Cependant, au laboratoire, nous disposions d'un anticorps ciblant la protéine ZAP70 humaine. Compte tenu des variations d'expression des gènes *LAT* et *PLCG2* impliqués dans la voie du TCR, en présence de RhoH, le taux de ZAP70 pourrait peut être également être modulé. Nous avons donc effectué une détection immunologique de cette protéine. Une faible variation de ZAP70 a été observée dans les cellules KK1 alors que nous notons une diminution importante de celle-ci dans les lymphocytes T stimulés 3 H par la ionomycine (**Figure 78**, page suivante). Aucune phosphorylation de ZAP70 n'a été détectée dans les deux modèles. Les effets observés ne sont donc pas comparables dans ces deux systèmes cellulaires. Nos résultats confirment donc l'analyse transcriptomique, au cours de laquelle aucune variation marquée de ZAP70 n'a été mise en évidence en présence de RhoH dans les cellules KK1. Dans ces conditions, RhoH n'interviendrait que très peu dans les mécanismes de régulation d'expression de la protéine ZAP70 dans les cellules lymphoïdes T. L'importante diminution du taux de ZAP70 dans les lymphocytes T stimulés par la ionomycine pourrait être la conséquence de l'influx calcique dans les cellules.

Il nous reste donc à confirmer les variations observées pour les gènes *LAT* et *PLCG2* dans les deux modèles pour montrer si RhoH agit sur l'expression de ces deux protéines.

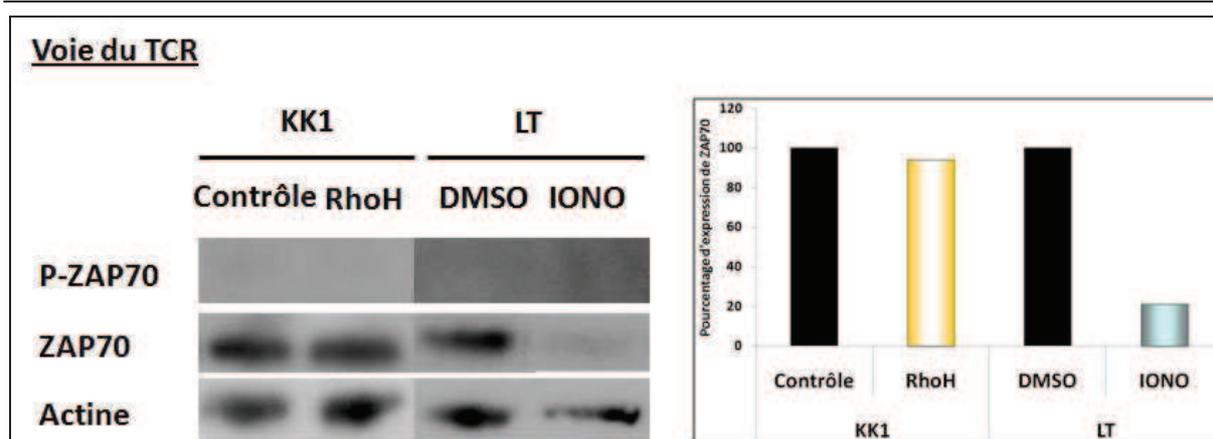


Figure 78 : Expression protéique de ZAP70 et détection de sa phosphorylation dans les lignées KK1-Contrôle et KK1-RhoH et dans les lymphocytes T cultivés 3 H en présence soit de DMSO, soit de ionomycine (5µM). La protéine ZAP70 et sa phosphorylation ont été détectées en utilisant la technique de Western Blot à partir de 30µg de lysats protéiques totaux des cellules étudiées. L'actine B a également été visualisée et est utilisée comme contrôle de la quantité protéique des échantillons déposés. Les expériences ont été produites à partir de deux couples de cellules. La quantification sur gel a été réalisée et présentée à droite de la figure. Les histogrammes représentent les valeurs de l'expérience montrée ici et correspondent aux pourcentages d'expression de la protéine ZAP70 normalisée par la quantité d'actine B et par rapport aux contrôles (mis à 100%).

4.3.2.2.2 Analyse de la voie calcique

L'expression ectopique de RhoH dans la lignée cellulaire KK1 entraîne une modulation de l'expression de *NMU* (de 7.64), *CAMK2N1* (1.61), *CAMK2D* et *CAMK1D* (0.66 et 0.57, respectivement) (**Figure 77**, page 174). NmU est un neuropeptide ayant un rôle immunomodulateur et pro-inflammatoire. Il est exprimé par les monocytes et les cellules dendritiques alors que son récepteur est retrouvé à la surface des cellules T et NK [276]. L'activation des récepteurs de NmU par ce dernier entraîne un influx calcique dans les lymphocytes T, suivi de la synthèse et la sécrétion des interleukines 4, 5, 6, 10 et 13 dans ces mêmes lymphocytes [277]. *CAMK1D* et *CAMK2D* sont les chaînes δ des Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein Kinases 1 et 2, respectivement : il s'agit de sérine/thréonine kinases régulées par le complexe Ca^{2+} /Calmoduline, impliquées dans la transduction du signal de la voie calcique par activation de RacGEFs telles β PIX et Tiam1 [278]. *CAMK2N1* est un inhibiteur de la *CAMK2*, interagissant avec la chaîne β de cette dernière.

L'expression des gènes *CAMK2D* et *NMU* a été vérifiée dans nos deux modèles T, soit en visualisant le taux et l'activation de la protéine *CAMK2* par immunodétection, soit par RT-PCR quantitative pour *NMU* (**Figure 79**, page suivante).

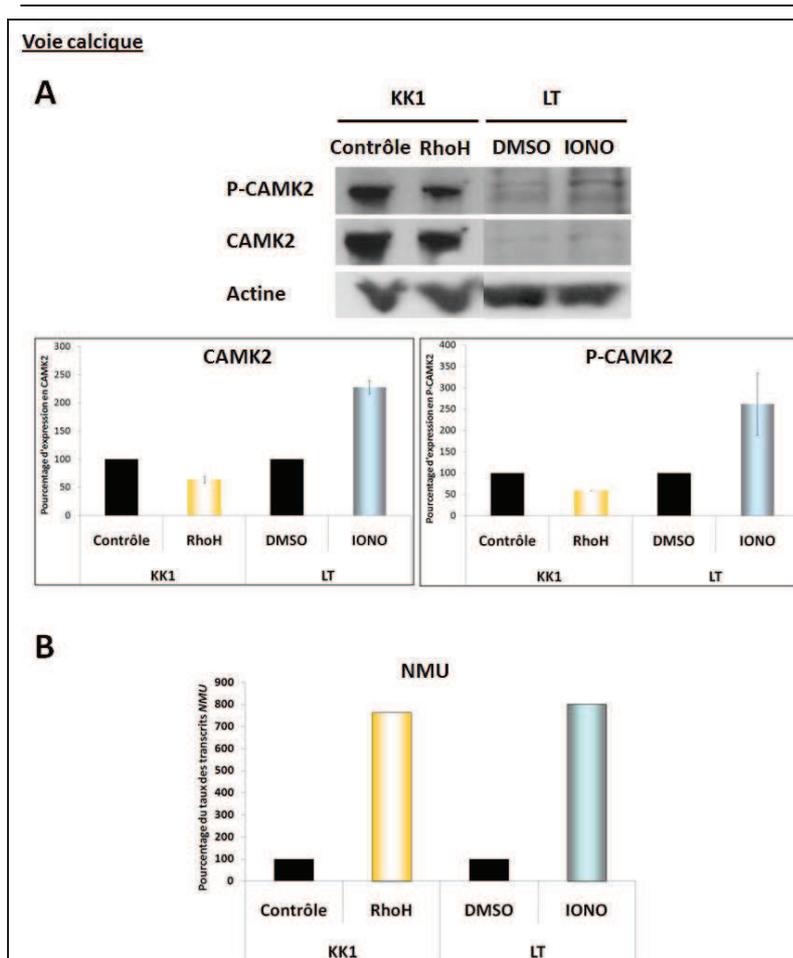


Figure 79 : Analyse de l'expression protéique de CAMK2 et de sa phosphorylation en Tyr231, ainsi que du taux de transcrits du gène *NMU* dans les lignées KK1-Contrôle et KK1-RhoH et dans les lymphocytes T cultivés 3 H en présence soit de DMSO, soit de ionomycine (5µM). **A**. La protéine CAMK2 et CAMK2 phosphorylée ont été détectées comme décrit **Figure 78**, page précédente. Les histogrammes représentent la quantification sur gel de ces expressions obtenues de 2 expériences et correspondent aux pourcentages d'expression de la protéine CAMK2 (Partie A, gauche) ou CAMK2 phosphorylée (Partie A, droite) normalisée par la quantité d'actine B et par rapport aux contrôles (mis à 100%). **B**. L'évaluation des transcrits du gène *NMU* dans les lymphocytes T a été effectuée par RT-PCR quantitative. L'expression des transcrits a ensuite été représentée en pourcentage par rapport aux contrôles. Les résultats des lignées KK1 proviennent de l'analyse transcriptomique et ceux des lymphocytes T de l'analyse d'une seule expérience d'activation de lymphocytes T.

L'étude de l'expression protéique nous permet de corrélér les variations des taux des transcrits à un effet fonctionnel de la protéine. Dans les cellules KK1-RhoH, l'expression et l'activité de CAMK2 sont réduites (d'un facteur 1.56 et 1.69, respectivement) comparées aux cellules KK1-Contrôle (**Figure 79A**, ci-dessus). Dans les lymphocytes T, nous observons à l'inverse une forte augmentation du taux de la protéine CAMK2 et de sa phosphorylation (résidu Tyr231) suite à la stimulation par le ionophore pour le calcium (ionomycine) (**Figure 79A**, ci-dessus). Cela suggère que la transduction du signal de la voie calcique est réduite dans les cellules KK1-RhoH et au contraire est augmentée dans les lymphocytes T activés. Ces résultats opposés suggèrent donc que CAMK2 n'est pas une cible de RhoH. En revanche, dans les lymphocytes T stimulés par la ionomycine, nous avons observé une augmentation de l'expression de *NMU* d'un facteur 8.02, résultat similaire à celui obtenu par analyse transcriptomique des lignées KK1-RhoH et KK1-Contrôle (augmentation d'un facteur 7.64 dans les cellules KK1-RhoH) (**Figure 79B**, ci-dessus). L'expression de *NMU* est donc accrue dans les deux modèles, ce qui laisserait penser que *NmU* serait une potentielle cible de RhoH.

Cependant, ces résultats ne proviennent que d'une seule expérience, ils restent donc à confirmer.

4.3.2.2.3 Analyse des interleukines, chémokines, de leurs récepteurs et de la voie du TCR

La présence de RhoH dans les cellules KK1 induit des variations positives et négatives de l'expression transcriptionnelle de certaines interleukines (IL16, IL4, IL26, IL13 et IL23A, respectivement de facteurs 3.51, 2.73, 0.37, 0.14 et 0.11), de chémokines (CCL23, CCL4, CCL3 et CCL1, respectivement de facteurs 0.56, 0.51, 0.51 et 0.15), de leurs récepteurs (*CCRL2*, *CCR5*, *CXCR7* et *CCR4*, respectivement de facteurs 2.88, 0.49, 0.41 et 0.29) et de *LTA* et *TNF* impliqués dans la voie de signalisation du TNF (facteurs 0.6 et 0.20). Après traduction de leurs ARN messagers, les cytokines (interleukines, chémokines et TNF) sont sécrétées dans le milieu de culture. L'analyse de leur expression a donc été effectuée par quantification de ces protéines dans le surnageant de culture des cellules KK1-RhoH (comparées aux cellules KK1-Contrôle) et le surnageant de lymphocytes T stimulés 3 H par de la ionomycine (comparés aux cellules T mises en culture 3 H en présence de DMSO) (**Tableau 4**, ci-dessous). Ces dosages ont été réalisés soit par une technique ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), soit par la méthode Luminex.

Nom	Méthode	Lymphocytes T		KK1		Transcriptome (KK1-RhoH vs KK1-Contrôle)
		LT-DMSO	LT-IONO	KK1-Contrôle	KK1-RhoH	
Cytokines						
IL16	ELISA	290.44 (± 221.86)	716.64 (± 212.02)	13.08 (± 0.8)	17.15 (± 0.95)	3.51
IL26	ELISA	11.64 (± 10.56)	729.06 (± 89.12)	ND	ND	0.37
IL4	Luminex	< 8.8	12.88 (± 7.00)	< 8.8	< 8.8	2.73
TNFα	Luminex	7.62*	50.58 (± 25.29)	< 5	< 5	0.2
IL13	Luminex	23.00 (± 7.82)	35.53 (± 14.23)	13.95*	17.84*	0.14
Chémokines						
CCL1	ELISA	10.42 (± 1.74)	8.77 (± 3.24)	10.44 (± 5.14)	8.15 (± 0.82)	0.15
CCL23	ELISA	< 31.25	< 31.25	< 31.25	< 31.25	0.56
CCL3/MIP1A	Luminex	11.53*	80.08 (± 33.59)	909.15 (± 192.40)	312.6 (± 112.17)	0.51
CCL4/MIP1B	Luminex	10.84*	978.81 (± 373.93)	< 11.5	< 11.5	0.51

*, deux échantillons sur trois sont en dessous du seuil de détection

Tableau 4 : Expression quantitative des cytokines et chémokines présentes dans le surnageant de culture des cellules KK1-Contrôle et KK1-RhoH et dans les lymphocytes T cultivés 3 H en présence soit de DMSO, soit de ionomycine (5µM). Le taux de l'IL16, IL26, CCL1 et CCL23 a été mesuré par la technique ELISA à partir du surnageant de culture de deux couples de lignées KK1 et de trois expériences de Lymphocytes T. L'expression de IL4, TNFα, IL13, CCL3 et CCL4 a été quantifiée par la technique de Luminex, à partir des mêmes échantillons. Le tableau représente la moyenne des valeurs obtenues au cours de ces analyses et les valeurs d'erreur standard entre parenthèses. ND : Non Déterminé.

Contrairement à ce qui était attendu suite aux analyses transcriptomiques, l'expression extracellulaire des protéines IL4, IL13, TNF α , CCL1, CCL23 et CCL4 n'est pas modifiée en présence de RhoH dans les cellules KK1 et y est pratiquement indétectable. Pour les autres protéines : IL26 n'a pas pu être quantifiée dans le surnageant de culture des lignées KK1. CCL3 et IL16, en revanche, sont exprimées différemment en présence ou non de RhoH et cela, en accord avec les analyses d'expression génique : le taux de CCL3 est réduit de 2.9 fois dans les cellules KK1-RhoH (taux réduit de 1.96 pour les transcrits *CCL3*), et l'IL16 est exprimée un peu plus par ces mêmes cellules surexprimant RhoH, d'un facteur 1.31 (une augmentation de 3.51 fois est observée pour les ARN messagers de l'IL16). Dans notre second modèle (lymphocytes T stimulés 3 H par 5 μ M de ionomycine), la quantité de CCL3 présente dans le surnageant de culture est augmentée de 6.95 fois, résultats contraires à ceux observés dans les cellules KK1. Ceci nous oblige à rejeter l'idée que CCL3 serait un effecteur potentiel de RhoH. L'interleukine 16, quant à elle, est induite d'un facteur 2.47. Le fait que les erreurs standards sont importantes est le résultat des variations inter-individus observées au cours des analyses. Il serait important de répéter ce dosage à partir de lymphocytes T isolés du sang d'autres individus pour valider ces résultats. Néanmoins, le fait est que nous retrouvons une même variation d'expression de cette protéine dans nos deux modèles, caractérisés tous deux par une induction de *RHOH*, et ceci nous permet d'émettre l'hypothèse que l'interleukine 16 pourrait être une cible de RhoH. En parallèle, nous avons étudié les variations de l'expression des gènes *CCRL2*, *CCR5*, *CXCR7* et *CCR4* dans nos deux modèles, par immunodétection à partir de lysats protéiques totaux (**Figure 80**, page suivante). Nous avons ainsi observé une variation de l'expression du récepteur CCRL2, et cela, aussi bien dans les lignées KK1-RhoH que dans les lymphocytes T stimulés. CCRL2 est présent 1.65 fois plus dans les KK1-RhoH et 6.56 fois plus dans les lymphocytes T stimulés. Ceci suggère que ce récepteur de la chémokine TIG2 serait une cible potentielle de RhoH.

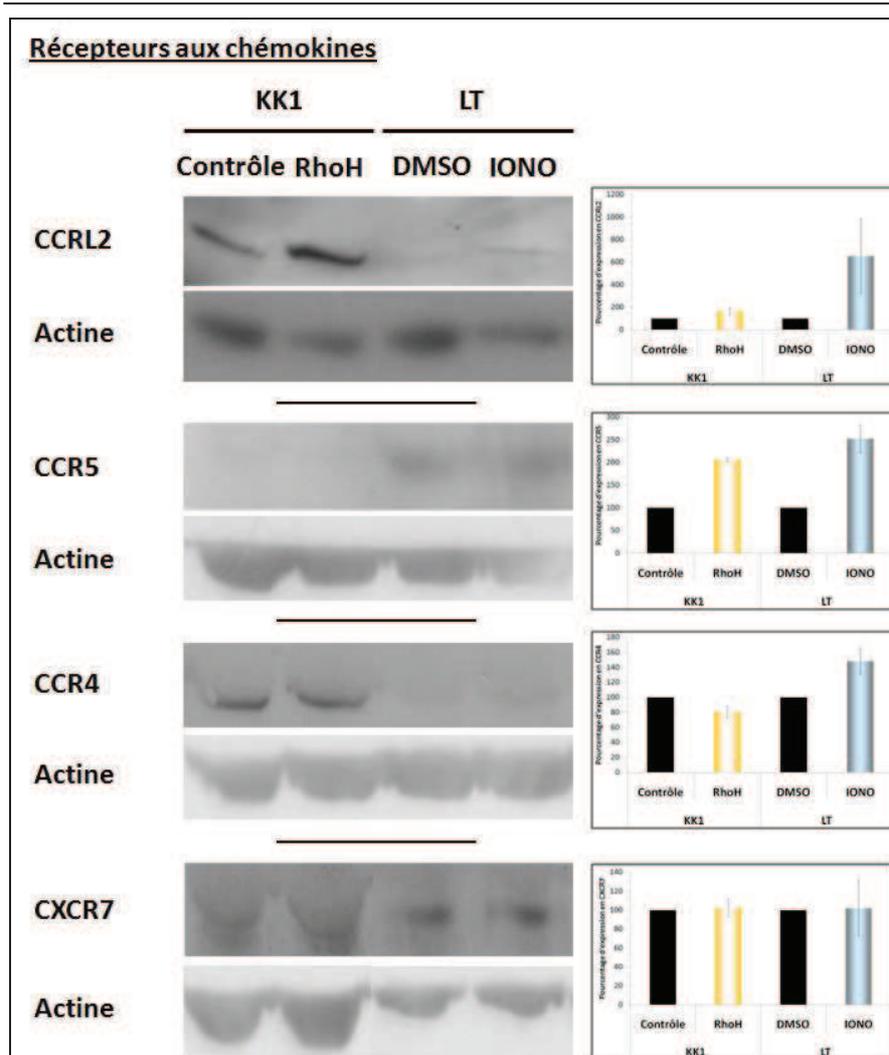


Figure 80 : Expression protéique de CCRL2, CCR5, CCR4 et CXCR7 dans les lignées KK1-Contrôle et KK1-RhoH et dans les lymphocytes T cultivés 3 H en présence soit de DMSO, soit de ionomycine (5 μ M). CCRL2, CCR5, CCR4 et CXCR7 ont été détectées par la technique de Western Blot à partir de 30 μ g de lysats protéiques totaux des cellules étudiées. L'actine B a également été visualisée et est utilisée comme contrôle de la quantité protéique des échantillons déposés. Les expériences ont été produites à partir de deux couples de cellules. La quantification sur gel a été réalisée et présentée à droite de la figure. Les histogrammes représentent la moyenne des pourcentages d'expression protéique normalisée par la quantité d'actine B et par rapport aux contrôles (mis à 100%).

4.3.2.2.4 Analyse des récepteurs couplés aux protéines G

Des diminutions du taux des transcrits des récepteurs couplés aux protéines G GPR84, GPR56, GPR30 et GPR171 ont été observés dans les cellules KK1 dans lesquelles l'expression de RhoH a été restituée (**Figure 77**, page 174). Aucune expression protéique des récepteurs GPR30 et GPR56 n'a été détectée dans ces cellules, contrairement à GPR84 (**Figure 81**, page suivante). Cependant, ce dernier ne présente pas de variation de son expression dans la lignée KK1 en présence de RhoH et le taux de protéine est faiblement induit dans les lymphocytes T stimulés. Ces récepteurs couplés aux protéines G ne semblent donc pas être de bons sujets d'étude. D'autres récepteurs tels que GPR125 et GPR132 sont également réprimés en présence de RhoH dans la lignée KK1, de facteurs 2.17 et 2, respectivement. Il sera donc important de vérifier également leur expression.

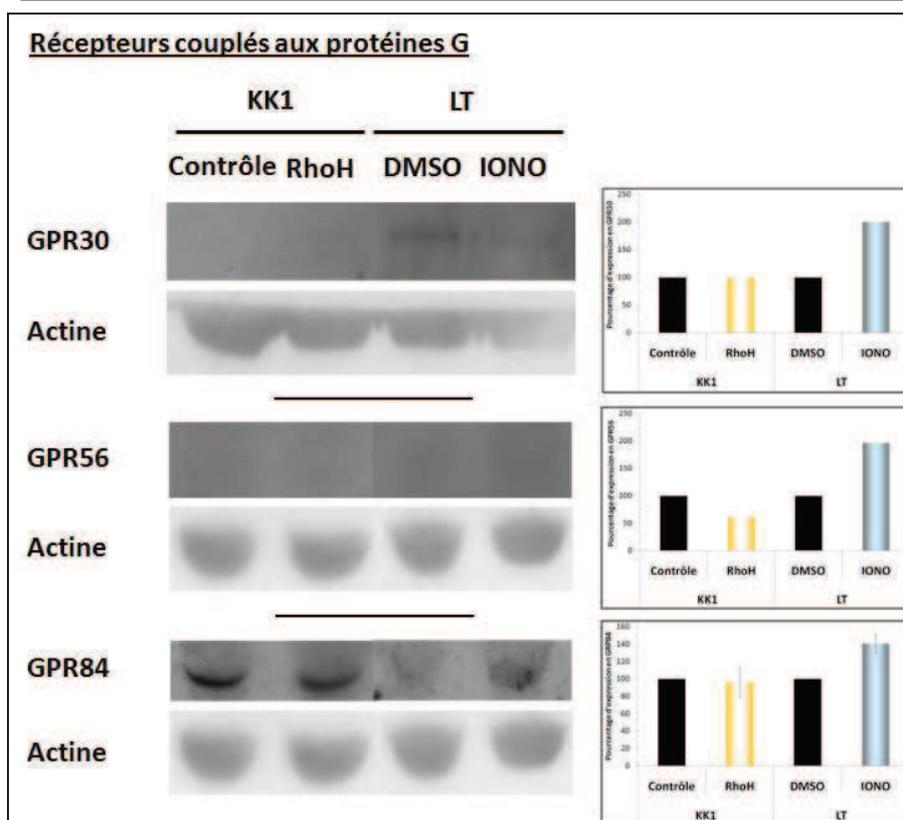


Figure 81 : Expression protéique de GPR30, GPR56 et GPR84 dans les lignées KK1-Contrôle et KK1-RhoH et dans les lymphocytes T cultivés 3 H en présence soit de DMSO, soit de ionomycine (5 μ M). GPR30, GPR56 et GPR84 ont été détectées comme décrit dans la **Figure 80**, page précédente. Les expériences ont été produites à partir de deux couples de cellules. La quantification sur gel a été réalisée et présentée à droite de la figure. Les histogrammes représentent la moyenne des pourcentages d'expression protéique normalisée par la quantité d'actine B et par rapport aux contrôles (mis à 100%).

4.3.2.2.5 Analyse d'un facteur de transcription, Runx1

L'expression transcriptionnelle de certains facteurs de transcription est également modifiée en présence de RhoH dans les cellules KK1 en particulier *RUNX1*, dont l'expression est augmentée d'un facteur 1.80. La présence du facteur Runx1 au noyau a été étudiée par Western Blot dans les lignées KK1-RhoH et KK1-Contrôle (**Figure 82**, page suivante, une seule expérience). Nous avons ainsi pu observer que son expression dans le noyau était augmentée de 1.4 fois (Rappelons que les transcrits *RUNX1* sont augmentés d'un facteur 1.80 dans ces mêmes cellules). Runx1 pourrait donc être un facteur cible de RhoH. Cependant, les résultats obtenus ne proviennent que d'une seule expérience. La vérification de l'expression de ce facteur dans les lignées KK1 et dans les lymphocytes T stimulés ou non par la ionomycine (en cours au laboratoire) nous permettra de confirmer ou non cette hypothèse.

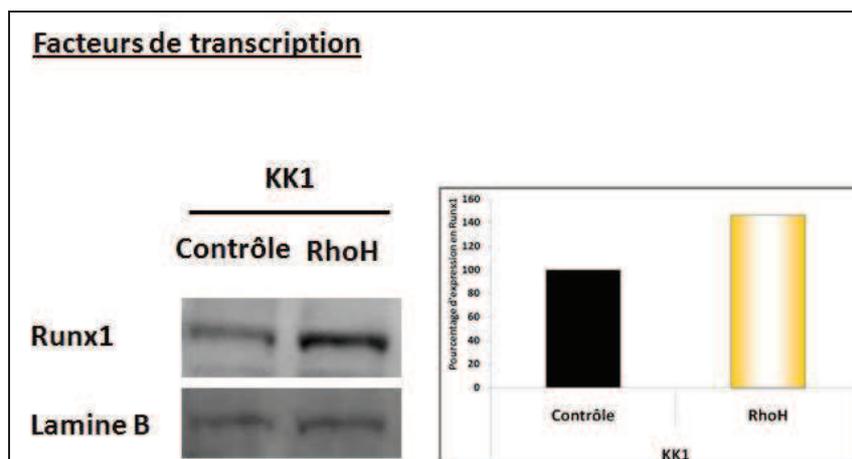


Figure 82 : Expression nucléaire de la protéine Runx1 dans les lignées KK1-Contrôle et KK1-RhoH (une seule expérience). La protéine Runx1 a été détectée par la technique de Western Blot à partir de 30 μ g de lysats protéiques nucléaires des cellules étudiées. La lamine B a également été visualisée et est utilisée comme contrôle de la quantité de protéines nucléaires des échantillons déposés. La quantification sur gel a été réalisée et présentée à droite de la figure. Les histogrammes représentent les valeurs de l'expérience montrée ici et correspondent aux pourcentages d'expression de la protéine Runx1 normalisée par la quantité d'actine B et par rapport aux contrôles (mis à 100%).

4.3.2.2.6 Analyse des 9 gènes les plus fortement modulés en présence de RhoH

Au cours de l'analyse transcriptomique des cellules KK1-RhoH comparativement aux cellules KK1-Contrôle, nous avons observé d'importantes variations d'expression pour certains gènes tels que *MAGEB2* (d'un facteur 28.04), *PASDI* (15.23), *SLA* (12.49), *SH2D1B* (12.45), *MAGEA9* (12.33), *LPHN3* (0.08), *BCHE* (0.08), *CFHR1* (0.06) et *IQCG* (0.04). Il s'agit de gènes impliqués dans de nombreuses voies de signalisation, comme *PASDI* codant un antigène retrouvé dans les cancers des testicules associés à des lymphomes B diffus à grandes cellules, ou *SLA* codant une protéine adaptatrice régulant négativement la transduction du signal du TCR [279]. Nous avons quantifié leur expression par RT-PCR quantitative dans les lymphocytes T stimulés par la ionomycine dans le but de trouver des variations similaires dans nos deux modèles (**Figure 83**, page suivante).

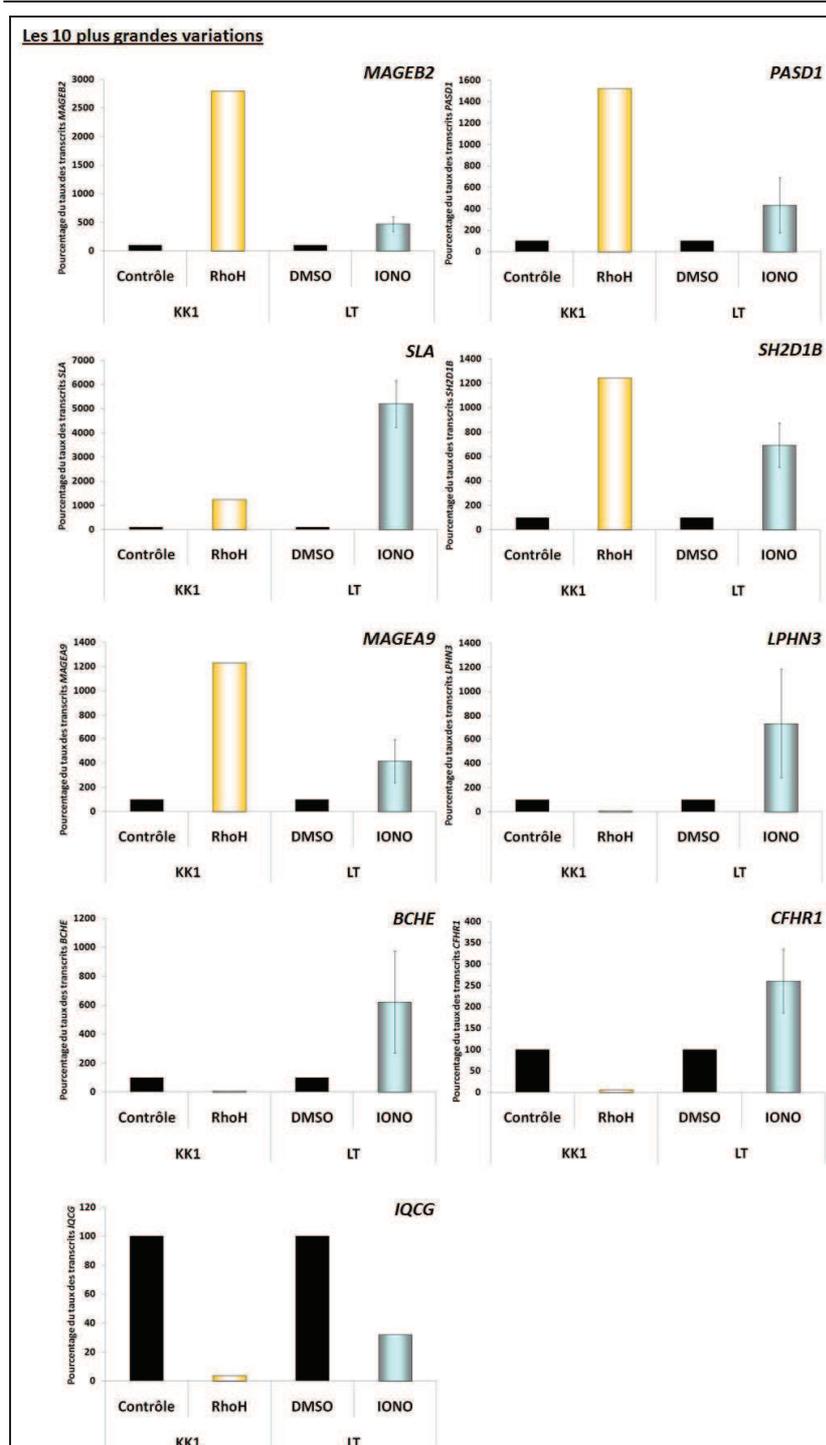


Figure 83 : Analyse de l'expression des gènes *MAGEB2*, *PASD1*, *SLA*, *SH2D1B*, *MAGEA9*, *LPHN3*, *BCHE*, *CFHR1* et *IQCG* dans les lignées KK1-Contrôle et KK1-RhoH et dans les lymphocytes T cultivés 3 H en présence soit de DMSO, soit de ionomycine (5µM). L'évaluation des transcrits des différents gènes dans les lymphocytes T a été effectuée par RT-PCR quantitative. L'expression des transcrits a ensuite été représentée en pourcentage par rapport au contrôle. Les résultats des lignées KK1 proviennent de l'analyse transcriptomique et ceux des lymphocytes T de l'analyse d'une seule expérience pour *IQCG*, de deux pour *MAGEB2* et de trois expériences pour les autres.

MAGEB2, quoique faiblement exprimé dans les lymphocytes T, est induit 4.7 fois dans ces cellules stimulées par de la ionomycine, comparé à 28 fois dans la lignée KK1-RhoH. Les transcrits *MAGEA9* et *PASD1* sont également faiblement présents dans les cellules T, mais tout comme pour *MAGEB2* leurs taux sont augmentés de 4.16 et 4.34 fois dans ces dernières sous l'influence de la ionomycine (12.33 et 15.23, respectivement dans les cellules KK1-RhoH). Les gènes *SLA*, *SH2D1B* et *IQCG* sont bien exprimés dans les lymphocytes T. Leurs

variations d'expression (soit 5.2, 6.94 et 0.32 respectivement pour *SLA*, *SH2D1B* et *IQCG*) dans les cellules T stimulées sont comparables à celles obtenues dans la lignée KK1 en présence de RhoH (respectivement, 12.49, 12.45 et 0.04 fois). Ces résultats suggèrent donc que les gènes *MAGEB2*, *PASD1*, *SLA*, *SH2D1B*, *MAGEA9* et *IQCG* pourraient être des cibles potentielles de RhoH.

Grâce à nos deux modèles établis dans des cellules T, nos études préliminaires, certes à confirmer, nous permettent d'émettre les hypothèses suivantes : la présence de *RHOH* dans les cellules T entraînerait des modifications d'expression de certains gènes. *NMU*, *MAGEB2*, *PASD1*, *SLA*, *SH2D1B*, *MAGEA9* seraient induits par RhoH et *IQCG*, au contraire, serait réprimé. De plus, RhoH régulerait également le taux des protéines CCRL2, IL16 et Runx1 : l'expression de CCRL2 dans les cellules, la sécrétion de l'IL16 dans le surnageant de culture et la quantité du facteur de transcription Runx1 au niveau du noyau sont augmentées en présence de RhoH. Il s'agirait peut être de potentielles nouvelles cibles de RhoH dans les cellules T.

4.4 Induction du gène *RHOH* et de sa cible potentielle, *PRKCA*, par invalidation de la protéine JunD dans les leucémies aigues myéloïdes

Précédemment, nous avons montré que le facteur de transcription JunD réprime la transcription du gène *RHOH* dans les cellules lymphoïdes B Raji. La surexpression de cette protéine dans ces cellules entraîne ainsi une importante diminution du taux des ARN messagers *RHOH*, et inversement une absence de JunD induit une augmentation de la transcription (**Figure 46**, page 129). Les cellules de la leucémie à tricholeucocytes (HCL) sont caractérisées par une expression faible du gène *RHOH*, comparativement soit aux lymphocytes B normaux dans le cas de cellules de patients, soit à d'autres lignées cellulaires lymphoïdes [223]. Ce phénomène est accompagné d'une importante expression des transcrits du facteur de transcription JunD dans les lignées HCL et chez les patients [262, 280]. Au laboratoire, nos travaux n'ont pas permis de corrélérer la présence de JunD avec la répression de l'activité du promoteur P3 de *RHOH*, ni avec le taux de ces transcrits totaux (**données non montrées**). Il est intéressant de noter que les cellules de la leucémie T de l'adulte (ATL), présentant aussi une faible expression transcriptionnelle faible de *RHOH* chez certains patients (**données du laboratoire**), sont caractérisées par une activation constitutive du

facteur de transcription JunD [281]. Nos avancées n'ont pas permis pour le moment de vérifier la répression de *RHOH* par JunD dans nos lignées cellulaires modèles de l'ATL. Il est tout de même important de souligner ces caractéristiques communes observées dans l'HCL et l'ATL. Nous retrouvons cette corrélation inverse entre les expressions de *JUND* et *RHOH* dans d'autres pathologies : les cellules de la leucémie aigue myéloïde (LAM) présentent une expression faible du gène *RHOH* et sont caractérisées par une surexpression de JunD ; contrairement aux cellules de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), dans lesquelles il a été mis en évidence une quantité relativement importante de transcrits *RHOH* et un faible taux de transcrits du gène *JUND* [282, 283]. Nous avons entrepris d'étudier cette corrélation inverse dans les LAM.

4.4.1 Etude du rôle de JunD dans la faible expression de *RHOH* dans les LAM

Le gène *JUND* est fortement exprimé dans les cellules de LAM. Pour étudier le rôle éventuel de JunD dans la faible expression de *RHOH* dans les cellules de LAM, nous avons préparé les cellules mononucléées de sang périphérique de patients atteints de LAM de type 2, 4 ou 5 (selon la classification FAB, *French-American-British*) et présentant une forte leucocytose sanguine (entre 35.10^6 et 45.10^6 leucocytes par mL de sang) (**Tableau 5**, ci-dessous).

<u>Patient</u>	<u>Phénotype</u>	<u>Présentation</u>	<u>Age au prélèvement</u>	<u>Blastes</u>	<u>Etat de l'échantillon</u>	<u>Anomalies</u>
#1	LAM 4	Rechute		>70%	Congelé	inversion 16, éosinophilie
#2	LAM 2	Diagnostic	33	50%	Frais	t(8;21)
#3	LAM 5	Diagnostic		>70%	Congelé	t(9;11), trisomie (8)
#4	LAM 4	Diagnostic		97%	Congelé	inversion 16, éosinophilie
#5	LAM 5	Diagnostic	45	>70%	Frais	duplication <i>FLT3</i>
#6	LAM 4	Diagnostic	16	>70%	Congelé	éosinophilie
#7	LAM 4	Diagnostic	77	>70%	Congelé	caryotype normal
#8	LAM 4	Diagnostic	74	>70%	Congelé	caryotype normal
#9	LAM 4	Diagnostic		>70%	Congelé	
#10	LAM 5	Diagnostic	79	>70%	Frais	

Tableau 5 : Liste des caractéristiques des patients atteints de LAM, desquels proviennent les échantillons de cellules mononucléées analysées dans cette étude.

La faible expression des transcrits *RHOH* a tout d’abord été vérifiée dans les cellules mononucléées de LAM par RT-PCR quantitative et chimie Taqman. Nous avons comparé l’expression de *RHOH* dans les LAM à celle de lymphocytes T normaux exprimant des taux élevés de ce gène et utilisés comme contrôles positifs (**Figure 84**, ci-dessous).

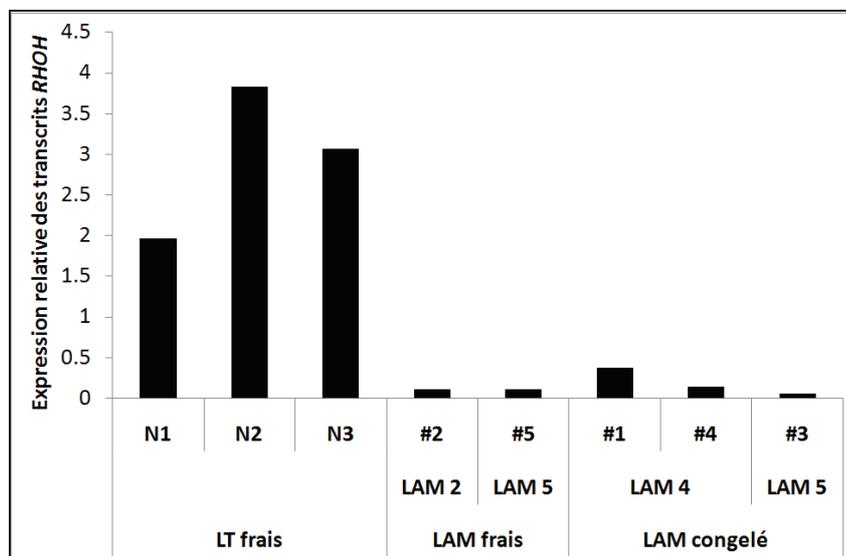


Figure 84 : Etude de l’expression du gène *RHOH* dans des lymphocytes T normaux et des cellules mononucléées de patients atteints de LAM de type 2, 4 ou 5. L’expression du gène *RHOH* a été évaluée par RT-PCR quantitative et chimie TaqMan à partir d’ADNc de lymphocytes T normaux (N1, N2 et N3, contrôles positifs) isolés du sang périphérique de donneurs sains et d’ADNc de cellules mononucléées isolées de patients atteints de leucémie aigue myéloïde (LAM). Les histogrammes représentent les résultats d’une seule mesure normalisée par l’expression du gène de référence *ABL*.

Il aurait été intéressant de comparer le taux de *RHOH* dans les cellules LAM à celui de cellules myéloïdes de donneurs sains, à condition de comparer des cellules ayant le même stade de différenciation. Nous avons ensuite invalidé le gène *JUND* dans ces cellules mononucléées de LAM, par transfection d’un petit ARN interférent. Après 48 heures de culture, nous avons vérifié l’invalidation de *JUND* par RT-PCR classique et quantitative (**données non montrées**), puis avons quantifié l’expression des ARN messagers de *RHOH* de la même manière que précédemment décrit (**Figure 85**, page suivante).

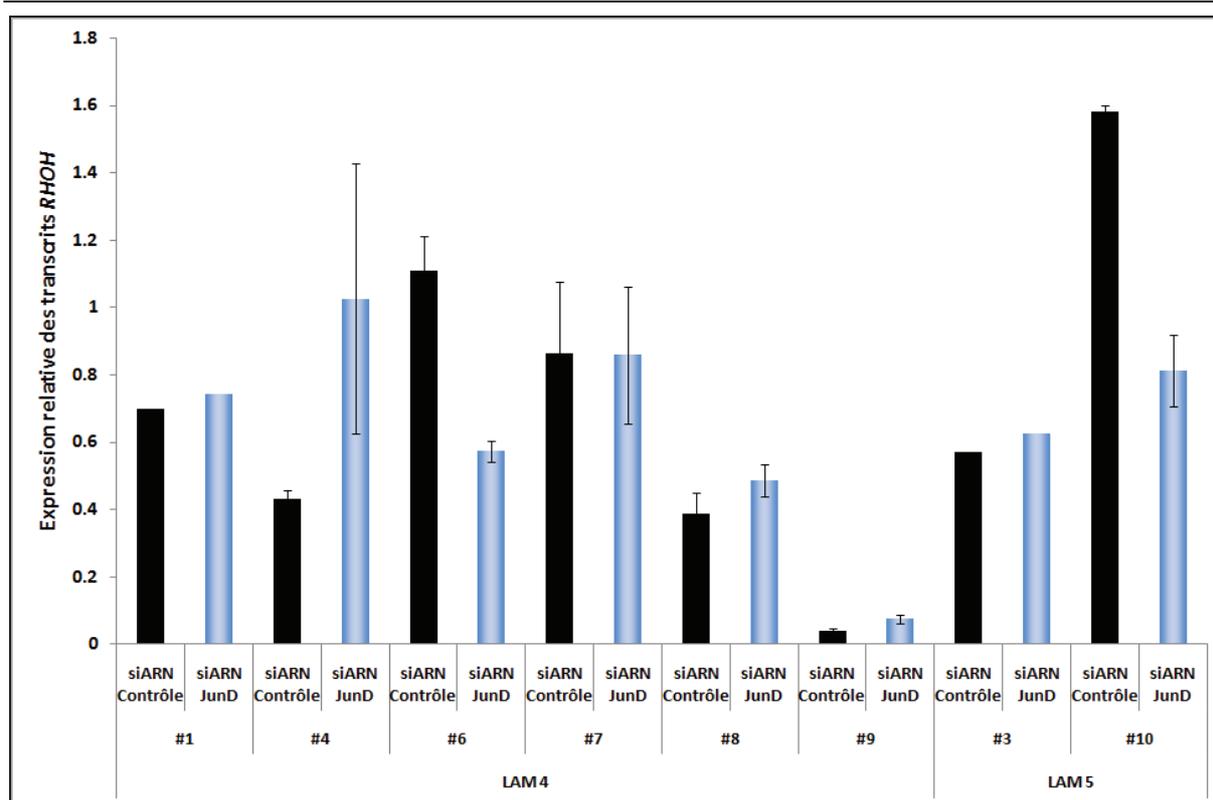


Figure 85 : Etude de l'expression du gène *RHOH* dans des cellules mononucléées de patients atteints de LAM de type 4 ou 5, dans lesquelles *JUND* a été invalidé par ARN interférence. L'expression du gène *RHOH* a été évaluée par RT-PCR quantitative et chimie TaqMan à partir d'ADNc des cellules mononucléées isolées de patients atteints de leucémie aigue myéloïde (LAM). Les cellules ont été transfectées par des petits ARN interférents ciblant soit les ARN messagers *JUND* (siARN JunD), soit un gène non humain (siARN Contrôle). Les histogrammes représentent soit une seule quantification (patient #1 et #3) ou une moyenne d'au moins deux analyses pour les autres, normalisées par l'expression du gène de référence *ABL* et ont été obtenus à partir d'une expérience de transfection des cellules mononucléées de chaque patient.

Suite à l'inhibition de *JUND* par ARN interférence, nous avons observé des augmentations d'intensité variable du taux des transcrits *RHOH* pour les patients atteints de LAM de type 4, numéros #1, #4, #8, #9 et pour le patient atteint de LAM de type 5 numéro #3. A l'inverse, l'invalidation de *JUND* entraîne une diminution importante des ARN messagers *RHOH* présents dans les cellules mononucléées des patients #6 (LAM de type 4) et #10 (LAM de type 5), et aucune variation n'est observée pour le patient #7 (LAM de type 4). Nous observons ainsi pour une majorité d'échantillons de patients atteints de LAM (n=5) une tendance à l'augmentation de *RHOH* en absence de JunD, ce qui corrobore avec les résultats obtenus dans les lignées lymphoïdes B, montrant une régulation transcriptionnelle négative de *RHOH* par le facteur de transcription JunD. Ce phénomène a également été observé dans les cellules mononucléées isolées du sang périphérique de deux patients atteints de leucémie aigue lymphoblastique de type B, caractérisées aussi par une faible expression de

RHOH (**données non montrées**). Dans le cas des deux échantillons LAM #6 et #10, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'expression de *RHOH* étant plus élevée dans ces cellules (d'un facteur 3.37 en moyenne par rapport à la moyenne des patients 1, 4, 8, 9, 3) les mécanismes de régulation ne sont plus les mêmes et ne sont plus contrôlés de la même manière par JunD. Ce facteur interviendrait alors comme facteur activateur de la transcription de *RHOH*. Ces résultats suggèrent que la composition du complexe AP1 présent au niveau du gène *RHOH* n'est probablement pas identique dans ces deux groupes de patients et pourrait être la conséquence de modifications cytogénétiques présentes au sein des cellules, non connues du laboratoire.

4.4.2 PRKCA, une nouvelle cible potentielle de RHOH dans les LAM

A partir des échantillons obtenus par transfection d'ARN interférents ciblant spécifiquement *JUND* ou non dans des cellules mononucléées de LAM, nous avons observé une tendance de JunD à réguler négativement la transcription de *RHOH*. Ces résultats sont comparables à ce qui a été montré dans la lignée lymphoïde B Raji (*paragraphe 4.2.2.2.1, page 123*). Compte tenu des similarités retrouvées, nous avons tenté de mettre en évidence une potentielle nouvelle cible de *RHOH* dans les LAM en étudiant certains gènes exprimés de manière variable en présence ou non de RhoH dans la lignée lymphoïde B JOK-1 déjà utilisée précédemment (*paragraphe 4.3.1, page 168*) (**Figure 63**, page 170). Nous avons analysé les 13 gènes de la liste retenue auparavant et seule l'expression du gène *PRKCA* est corrélée à celle de *RHOH* et ce, de façon positive. Ces résultats ont été confirmés par RT-PCR quantitative et chimie SYBR Green (**Figure 86**, page suivante). En revanche, nos données préliminaires sur les gènes *GAS7*, *C/EPBB*, *GPR30*, *MARCH1*, *CSF1R*, *BCHE*, *FCRL2*, *RAMP1*, *NMU*, *SAMSNI*, *CASPI* et *KYNU* semblent exclure ces gènes en tant qu'effecteurs possibles de *RHOH* dans les cellules LAM.

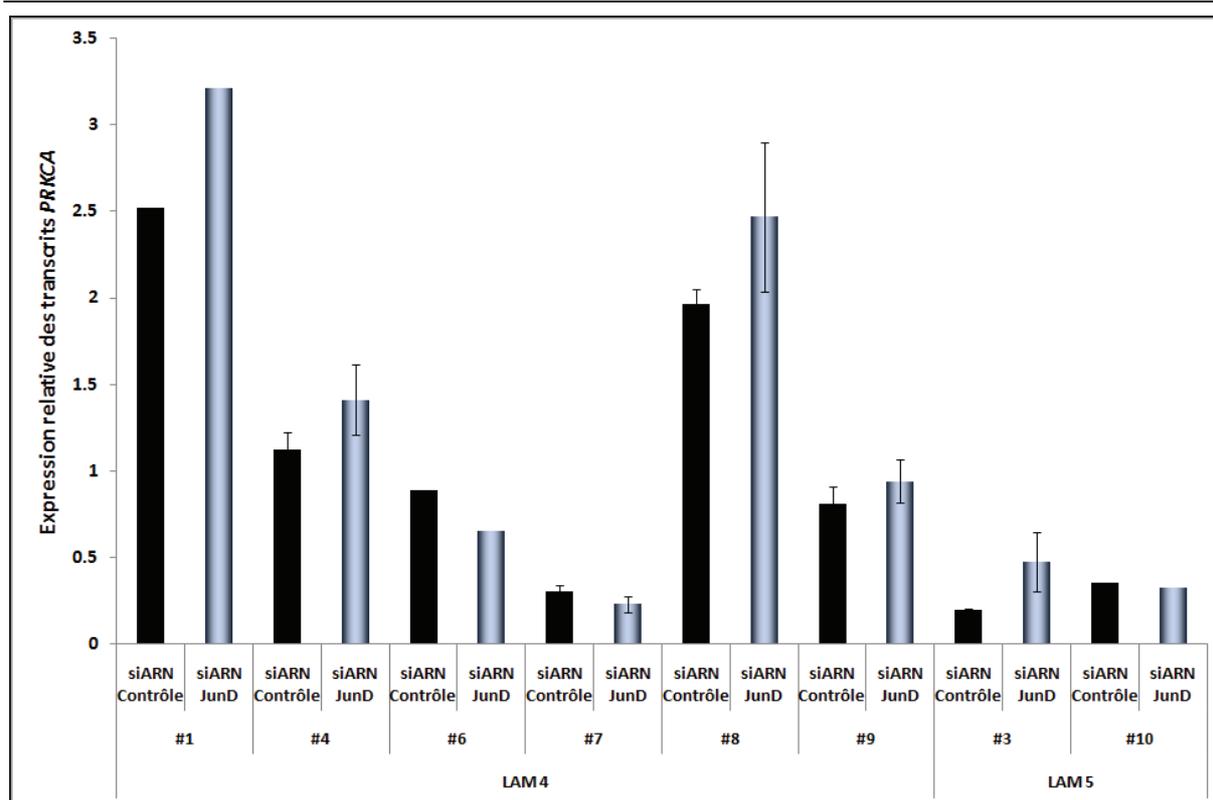


Figure 86 : Etude de l'expression du gène *PRKCA* dans des des cellules mononucléées de patients atteints de LAM de type 4 ou 5, dans lesquelles *JUND* a été invalidé par ARN interférence. L'expression du gène *PRKCA* a été évaluée par RT-PCR quantitative et chimie SYBR® Green à partir d'ADNc des cellules mononucléées isolées de patients atteints de leucémie aigue myéloïde (LAM). Les cellules ont été transfectées par des petits ARN interférents ciblant soit les ARN messagers *JUND* (siARN JunD), soit un gène non humain (siARN Contrôle). Les histogrammes représentent soit une seule quantification (patient #1, #6 et #10) ou une moyenne d'au moins deux analyses pour les autres, normalisée par l'expression du gène de référence *ABL* et ont été obtenus à partir d'une expérience de transfection des cellules mononucléées de chaque patient.

Au cours de cette étude, nous avons ainsi montré que dans 2 cas sur 8 JunD régule positivement l'expression transcriptionnelle du gène *RHOH* dans des cellules de LAM, mais quedans la majorité des cas (6/8), JunD a tendance à le contrôler négativement. Suite à l'invalidation de *JUND*, une augmentation du taux des transcrits *RHOH* est observée, phénomène corrélé à l'induction des ARN messagers du gène *PRKCA*. De plus, lorsque *RHOH* est inhibé, la quantité des transcrits *PRKCA* est également diminuée. Ceci suggère donc que *PRKCA*, une cible potentielle de RhoH déjà mise en évidence dans les cellules lymphoïdes B, pourrait l'être également dans les cellules provenant de patients atteints de LAM.

5 Discussion

5.1 P3 est le promoteur gouvernant majoritairement l'expression du gène *RHOH* dans les lymphocytes

RHOH est exprimé spécifiquement dans les tissus et cellules hématopoïétiques, plus particulièrement dans les leucocytes. Ce gène est constitué de 7 exons et est exprimé en une dizaine de transcrits initiés en amont des exons 1, 2 et 4. La quantification de chaque type de transcrits, nous a permis de montrer l'expression majoritaire des ARN messagers issus de l'activité du promoteur P3 (situé en amont de l'exon 4). De manière intéressante, cette étude nous a permis d'identifier la spécificité cellulaire des promoteurs P1 et P2 : P1 est plus actif dans les cellules T et P2, l'est plutôt dans les cellules B. Les transcrits initiés en amont de l'exon 1 semblent donc être T-spécifiques et ceux initiés en amont de l'exon 2, B-spécifiques.

5.1.1 L'activité T ou B-spécifique de P1 et P2 est une particularité du gène *RHOH*

A ce jour, parmi les gènes codant la famille des RhoGTPases, seuls deux gènes présentent la particularité d'être transcrits à partir de trois promoteurs alternatifs : *RHOH* et *RHOBTB2* [284]. Contrairement à *RHOH*, codé en une protéine unique, *RHOBTB2* est exprimé spécifiquement dans le cerveau, en transcrits initiés en amont des exons 1, 4 ou 5 et ces derniers donnent naissance à trois isoformes de la protéine RhoBTB2, qui diffèrent par leur extrémité N terminale [284]. L'obtention des transcrits *RHOBTB2* est donc le résultat d'une part, de l'activité de trois promoteurs et d'autre part, de différents épissages alternatifs [284]. Cependant, aucune étude approfondie de l'éventuelle utilisation alternative des promoteurs du gène *RHOBTB2* n'a été publiée à ce jour. *RAB27A* présente de nombreuses caractéristiques comparables à celles de *RHOH*, non seulement le fait d'être constitué de nombreux exons (respectivement 9 et 7 pour *RAB27A* et *RHOH*) dont un codant la protéine, de contenir un grand intron (respectivement de 31Kb et 37.9Kb pour *RAB27A* et *RHOH*) et des uORFs ; mais aussi d'être exprimé en plusieurs transcrits, initiés en amont des exons (-2), (-1) ou (1a). Tout comme pour le gène *RHOH*, toutes les isoformes *RAB27A* codent une protéine unique. Celle-ci est impliquée dans l'exocytose des granules cytotoxiques dans les lymphocytes [168, 285]. *RHOH* et *RAB27A* présentent donc de nombreuses similarités. La seule étude de promoteur de *RAB27A* concerne celui situé en amont de l'exon 1a, et a été

réalisée dans des mélanomes humains [286]. L'activité cellule-spécifique (B ou T) des promoteurs mineurs de *RHOH* reste donc une particularité de ce gène.

5.1.2 Facteurs pouvant influencer l'expression tissu-spécifique des transcrits *RHOH*

L'expression des différents types de transcrits *RHOH* (initiés en amont des exons 1, 2 ou 4) et leur spécificité cellulaire peuvent être contrôlées à différents stades : tout d'abord, par une régulation de la transcription par la présence de motifs activateurs ou répresseurs ; mais aussi, par la stabilisation ou la dégradation des transcrits (modifications posttranscriptionnelles).

5.1.2.1 Facteurs de transcription, spécifiques de certains types cellulaires

L'expression de *RHOH*, spécifique de certains tissus, pourrait être régulée par la présence de motifs activateurs ou répresseurs de la transcription. En 2002, Hwang et ses collaborateurs ont montré chez la souris, que le promoteur de *GATA-3* est beaucoup plus actif dans les lignées cellulaires lymphoïdes T que dans les B et ce, de grâce à présence d'un élément cis régulateur situé dans la région 3' de l'intron 1 [287]. Dans le premier intron du gène de la $\beta 3$ tubuline (4.5 Kb), Bruhat et ses collaborateurs ont identifié des éléments régulateurs négatifs « *silencer* » et des régulateurs positifs de la transcription, dont les activités dépendent de la présence de certaines hormones dans les cellules Kc de drosophile ; il en est de même pour le gène de la chaîne α du PDGF [288, 289]. Des régions régulatrices peuvent être également contrôlées spécifiquement dans certains tissus ou types cellulaires par méthylation des séquences ADN. En effet, il a été montré que le gène *SHANK3* est soumis à une hyperméthylation d'îlots CpG dans des cellules mononucléées isolées du sang périphérique, et que cette modification épigénétique est la cause de sa faible expression [290]. Le gène *STAT4* peut être également sélectivement exprimé dans les lymphocytes T CD4⁺, comparativement à des cellules myéloïdes, par déméthylation du gène [291]. Par analogie, l'expression des différents types de transcrits du gène *RHOH* pourrait donc être régulée par des facteurs de transcription spécifiques soit des lymphocytes T pour l'activité de P1, soit des lymphocytes B pour P2 ou présents dans les deux types cellulaires, ou par méthylation de régions spécifiques du gène. De plus, dans certaines régions introniques du gène *RHOH* sont

présents des îlots CpG , l'expression de *RHOH* pourrait donc être régulée spécifiquement par méthylation de ces séquences ADN.

5.1.2.2 Facteurs de régulation du taux des transcrits

D'autres mécanismes contrôlant la stabilité ou la dégradation des transcrits ont été décrits. Ces événements de régulation posttranscriptionnelle sont la stabilité des transcrits (contrôlée par la région 3' UTR), la présence d'uORFs ou de microARN intronique dans la séquence des ARN messagers.

De nombreuses études montrent que la stabilité des ARN messagers de certaines cytokines peut être induite par stimulation extracellulaire, comme par traitement à l'interleukine 1, et ce, du fait de la présence de motifs riches en uridine et adenosine (ARE, *Adenosine uridine Rich Elements*) dans les régions 3'UTR des transcrits [292-295]. Dans le cas des transcrits *IL8*, les transcrits sont stabilisés par l'IL1 α et dépendent de l'activation de la MAPK p38 [295]. Compte tenu de la présence de 4 sites de polyadénylation et de 8 éléments ARE en amont des sites polyA dans la région 3' UTR du gène *RHOH*, nous émettons donc l'hypothèse que la stabilité des transcrits *RHOH* peut être modulée dans certaines conditions de stimulation [2]. *RHOA* présente également plusieurs sites de polyadénylation mais ces motifs n'influent pas sur la stabilité des transcrits *RHOA* [296]. En revanche, il a été décrit que *ARHI*, un membre de la famille Ras, présente des motifs ARE dans sa région 3'UTR [297]. Par ces éléments, HuR interagit avec les ARN messagers *ARHI* ; il s'agit d'une protéine s'associant à ces motifs ARE, stabilisant ainsi les transcrits *ARHI*. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle des 8 motifs ARE présents dans la région 3' UTR dans la stabilité des différents types d'ARN messagers *RHOH*. (Ce travail avait d'ailleurs été initié au laboratoire, il y a 5 ans).

Nous avons montré précédemment que les exons composant les transcrits *RHOH* présentent des structures secondaires stables avec des ΔG_0 inférieures ou égales à -30 Kcal.mol⁻¹ [170]. Leurs effets sur la traduction protéique dépendent de la stabilité et de la position de ces régions : une structure très stable ($\Delta G_0 \geq -50$ Kcal.mol⁻¹) peut bloquer la lecture par les ribosomes ; la présence d'une structure d'une $\Delta G_0 = -30$ Kcal.mol⁻¹ peut réprimer la traduction en inhibant l'association du complexe de pre-initiation à l'ARN messager [298-300]. Au contraire, une structure secondaire de -19 Kcal.mol⁻¹ positionnée 14

nucléotides en aval du site AUG augmente l'initiation de la traduction en créant une pause au site AUG favorisant la reconnaissance par le ribosome [301]. Des structures plus ou moins stables (de 10 à 15 Kcal.mol⁻¹) sont présentes en aval des codons de démarrage des uORFs situées dans les exons 1, 2, 4 ou 6 du gène *RHOH*, et renforcent l'idée de pauses par les ribosomes au niveau des uAUGs favorisant ainsi la traduction des peptides [302]. A la fin de ces phases ouvertes de lecture, les ribosomes se dissocieraient de l'ARN entraînant la dégradation du transcrit et inhibant ainsi la traduction de la protéine RhoH, comme il l'a été montré au cours d'une étude de l'expression de gènes présentant ou non des uORFs [303-305]. Ces données pourraient suggérer que la présence de ces structures secondaires et d'uORFs dans la région 5' régulerait la quantité de transcrits *RHOH* et ainsi la traduction de la protéine.

Récemment, il a été mis en évidence que des microARNs appelés encore miARNs peuvent être présents dans les régions introniques de gènes et peuvent réguler leur expression. Ces miARNs sont des séquences en forme d'épingle à cheveux d'une longueur de 22 nucléotides environ [306]. En interagissant avec la partie 3' UTR des ARN messagers, ils régulent la stabilité des transcrits et ainsi modulent la synthèse des protéines [307]. Plus de 50% des miARNs résident dans des régions introniques de plus de 5 Kb. La présence d'un intron de 37.9 Kb dans la séquence du gène *RHOH* pourrait laisser supposer qu'une séquence correspondant à un miARN y soit retrouvée. Par le logiciel miR-abela, un potentiel miARN a été détecté dans cet intron, en amont de l'exon 5 mais aucune séquence de reconnaissance de ce miARN n'a été observée dans la région 3' UTR (1Kb). *RHOH* ne serait donc pas régulé par un miARN contenu dans sa propre région intronique 4.

RHOH est exprimé spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques en de nombreuses isoformes codant toutes une unique protéine RhoH [2]. Il présente la particularité d'être régulé par trois promoteurs alternatifs, présentant des activités dépendantes du lignage hématopoïétique étudié : P1, plus actif dans les lymphocytes T, P2 favorisé dans les cellules B et P3, aussi efficace dans les lymphocytes T et B et dont l'activité est majoritaire. La structure du gène et des isoformes sont telles, que *RHOH* serait régulé par des mécanismes transcriptionnels et posttranscriptionnels très complexes.

Au laboratoire, nous avons montré que selon le type cellulaire étudié (lymphocytes T ou B), des facteurs de transcription différents contrôlent l'activité du promoteur P3. AP1 et NFκB modulent l'activité du promoteur P3 dans les cellules B. AP1 ou *Activator Protein 1* est un facteur de transcription contrôlant de nombreux processus cellulaires (prolifération, réponse au stress, apoptose) [308, 309]. L'activité du facteur AP1 dépend de la combinaison homodimérique ou hétérodimérique des partenaires le composant, tels que les membres des familles de facteurs de transcription Jun (cJun, JunB et JunD), Fos (cFos, FosB, Fra1 et Fra2), ATF/CRE (*Activating Transcription Factor/cyclic AMP response element binding protein*) (ATF1, CREB/CREM, CREB314, CREB-H, ATF2, ATF3, ATF4, ATF6, ATF7, B-ATF and ATF5), Maf (MafF, MafG et MafK) et du facteur de transcription NF-E2 [310-314]. Au laboratoire, nous avons montré dans des lignées lymphoïdes B que les protéines JunB et cFos régulent positivement l'activité du promoteur P3, en revanche JunD le réprime. Au cours de l'activation lymphocytaires T, des facteurs autres que AP1 et NFκB et dépendants de l'activation soit de la voie calcique, soit de la voie du DAG semblent intervenir dans le contrôle du promoteur P3. Sur la base de ces résultats, nous avons étudié les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du promoteur P3 dans les lignées cellulaires modèles de la leucémie à tricholeucocytes.

5.2 L'inhibition de NFκB permettrait une levée de la répression du promoteur P3 dans des lignées de la leucémie à tricholeucocytes

Les lymphocytes malins isolés de patients atteints de leucémie à tricholeucocytes (HCL) présentent une expression du gène *RHOH* inférieure à celle des lymphocytes B normaux, répression plus modérée dans les lignées cellulaires modèles de l'HCL, comparées à d'autres lignées cellulaires provenant de lymphomes de Burkitt par exemple [205]. L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du promoteur P3 du gène *RHOH* dans les cellules lymphoïdes B a permis de mettre en évidence une activité réduite du promoteur dans les lignées cellulaires de l'HCL.

Bien que nous ayons montré que le facteur AP1 intervient dans le contrôle de P3 dans les cellules B, la mutation des sites AP1 contenus dans la séquence du promoteur minimal [-236/+67] n'a entraîné aucune modification de l'activité de P3 dans la plupart des lignées

HCL. Ces données suggèrent que la répression du promoteur P3 minimal observée dans les cellules de la leucémie à tricholeucocytes ne fait pas intervenir le facteur de transcription AP1. Il existe cependant une corrélation inverse entre l'activation de JunD et l'expression du gène *RHOH* dans ces cellules [223, 262]. Notre hypothèse était donc que JunD réprime l'activité du promoteur P3 dans les cellules HCL, hypothèse corrélée au rôle de JunD dans le contrôle négatif de P3 dans les cellules lymphoïdes B (décrit précédemment). Compte tenu de la répression de fragments plus longs du promoteur P3 dans les lignées HCL, il aurait été intéressant d'étudier l'implication du facteur AP1 sur l'activité de ces constructions.

Au cours de nos travaux, nous avons montré d'autres résultats plus prometteurs : l'inhibition de NFκB entraîne une augmentation de l'activité du promoteur P3 dans plusieurs lignées cellulaires HCL. Les facteurs de transcription NFκB consistent en une famille de complexes dimériques comprenant les protéines RelA (p65), RelB, cRel, NFκB1 (p50) et NFκB2 (p52) [315]. NFκB joue un rôle critique dans les fonctions immunitaires, l'inflammation, la différenciation lymphoïde et la survie cellulaire [316-319]. NFκB régule positivement les gènes de certaines cytokines telles que TNFα, IL1β, IL6, IL2, IL12, IFNγ, GM-CSF, et de chémokines comme MIP1α, RANTES. NFκB induit également TRAF1, TRAF2, Fas, c-Myc et la cycline D1 [320]. Dans les cellules de la leucémie à tricholeucocytes, il a été mis en évidence une activation du facteur NFκB, qui peut être augmentée par un traitement au TNFα [321]. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce facteur pouvait intervenir dans le contrôle du promoteur P3 dans les lignées HCL.

La stimulation des cellules lymphoïdes B par le PMA n'entraîne pas seulement l'activation du facteur de transcription AP1 mais aussi les voies de signalisation conduisant à une induction de NFκB [322]. 2 sites potentiels de reconnaissance pour les facteurs de la famille NFκB ont été localisés sur la séquence du promoteur P3 minimal du gène *RHOH*. L'inhibition de l'activation de NFκB par un peptide bloquant l'interaction de IKKα et IKKβ avec IKKγ diminue l'activité promotrice de P3 dans les lignées lymphoïdes B Raji et Daudi. Ces données préliminaires tendent à montrer que les facteurs de la famille NFκB interviendraient positivement dans l'activation du promoteur P3 du gène *RHOH*, soit de manière directe en se fixant aux sites consensus présents dans P3, soit indirectement par l'intermédiaire d'un autre facteur de transcription. Il serait important de muter les sites consensus pour le facteur NFκB du promoteur P3 pour vérifier la nature de leur relation. Dans la leucémie à tricholeucocytes, le traitement des cellules par du PMA entraîne une faible levée

de la répression du promoteur P3 du gène *RHOH* dans les lignées HCL EH, JOK-1, Eskol et HC-1. Ces résultats laisseraient supposer qu'une stimulation des cellules par le PMA entraînerait une activation de NFκB et ainsi une régulation positive de l'activité de P3, comme nous l'avons proposé dans les lignées cellulaires lymphoïdes B Raji et Daudi. Or, il a été montré qu'un traitement par le PMA ne résulte pas en l'activation de NFκB dans l'HCL [323]. Cela voudrait donc dire qu'en présence de PMA, un ou des facteurs de transcription qui ne sont pas de la famille NFκB permettent une induction de l'activité du promoteur P3 aussi bien dans les cellules lymphoïdes B Raji et Daudi mais aussi dans les lignées modèles de la leucémie à tricholeucocytes.

De manière plus intéressante, l'inactivation de NFκB dans les cellules HCL par un peptide bloquant résulte en l'augmentation de l'activité de P3 dans les lignées HCL EH et Eskol. Malgré tout, le rôle de NFκB dans le contrôle de l'activité de P3 n'est pas clair dans la leucémie à tricholeucocytes, puisque l'inhibition de NFκB dans la lignée HC-1 réprime encore plus le promoteur P3. Ces données ne sont le résultat que d'une seule expérimentation, il est donc nécessaire de valider ces résultats. Dans le cas, où l'inhibition de NFκB lèverait bien la répression de P3 dans les lignées HCL, il faudrait donc confirmer cela en mutant les sites potentiels de fixation pour ce facteur de transcription et en étudiant les effets sur l'activité de P3 dans les cellules HCL. De même, il serait important d'identifier la nature des partenaires formant ce complexe NFκB qui interviendrait au niveau du promoteur P3. NFκB pourrait peut être être proposée comme potentielle nouvelle cible dans le but de restaurer l'activité promotrice de P3 dans ces cellules. Il faudrait alors vérifier l'expression des transcrits *RHOH* et l'expression de la protéine suite à l'inactivation de NFκB dans ces mêmes cellules. NFκB pourrait donc peut être être une molécule régulatrice clé dont l'inactivité permettrait la restitution de l'expression de *RhoH* dans les cellules HCL et ainsi potentiellement contrecarrer le phénotype leucémique comme nous l'avons montré dans un modèle de xéno greffe murin [223].

En utilisant certaines molécules comme la dexaméthasone, Sharma et Narayanan ont montré qu'il était possible d'inactiver spécifiquement un membre de la famille NFκB dans une lignée de fibrosarcome et induire une importante régression tumorale dans un modèle murin de xéno greffe [324]. Le traitement par la dexaméthasone entraîne l'expression d'un ARN antisens ciblant RelA et ainsi une inhibition de la croissance *in vitro* et *in vivo*. D'autres équipes proposent d'autres molécules qui inhibent la fixation du facteur de transcription à

l'ADN [325, 326]. Dans un modèle d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale chez le rat, l'administration de la thymoquinone (cumin noir), rapportée comme inhibant l'interaction de p65 à ces sites de fixation à l'ADN, prévient l'infiltration des cellules mononucléaires dans le cerveau et améliore les signes cliniques de la maladie [327, 328]. Si nous parvenions à identifier quels sont les protéines de la famille NFκB impliquées dans la répression de *RHOH* dans la leucémie à tricholeucocytes, il serait possible par de telles molécules d'en inhiber spécifiquement l'activité et réduire ainsi les effets non désirables.

Il est d'autant plus important de s'intéresser au facteur NFκB qu'une boucle de régulation semble exister entre les protéines de la famille NFκB et RhoH. Dans la lignée lymphoïde T Jurkat, RhoH inhibe la survie de ces cellules en inhibant NFκB [104]. Pour renforcer cette idée, il est intéressant de noter que dans de nombreux types cellulaires épithéliaux, comme les lignées HeLa, 293, NIH3T3 et lymphoïde T, la lignée Jurkat, il a été décrit que les petites protéines Rho (des sous-groupes RhoA, Cdc42, Rac) sont nécessaires pour l'activation de NFκB [329, 330]. Plus précisément, Rac1 active NFκB en favorisant la phosphorylation de IKKβ et ainsi sa dégradation mais aussi par un médiateur, PAK. Or, il a été montré dans la lignée lymphoïde T sur Jurkat que RhoH inhibe la dégradation de IKKβ et l'activation de RhoA, Rac1 et Cdc42 et dans les cellules souches hématopoïétiques, que l'invalidation de RhoH entraîne une augmentation de l'activité de Rac1 et Rac2 [104, 176]. Dans les cellules B, il n'est pas encore connu de telles relations entre RhoH et les autres protéines Rho. Il a été montré en revanche que RhoH interagit avec PLCγ2 dans les cellules B [201]. L'activation de cette dernière conduit à l'activation du facteur de transcription NFκB [331]. Au vue des nombreuses publications rapportant un lien entre ces différentes protéines, il serait d'autant plus intéressant d'approfondir cet axe de recherche.

Compte tenu de la présence de potentielle boucle de régulation entre RhoH, les protéines Rho et NFκB dans les cellules B et du fait que la restitution de l'expression de RhoH contrecarre le phénotype tumoral de la leucémie à tricholeucocytes, nous avons tenté de mettre en évidence des nouveaux effecteurs de RhoH dans les lymphocytes B, les résultats pouvant nous aider à mieux comprendre l'action de RhoH dans ces cellules.

5.3 *RAMP1 et PRKCA, nouveaux effecteurs possibles de RhoH dans les cellules lymphoïdes B*

Nous avons généré au laboratoire deux modèles cellulaires pour cette étude. Le premier est composé de deux lignées : la première, la lignée HCL JOK-1 dans laquelle nous avons restitué de manière ectopique l'expression de RhoH, la seconde, n'exprimant pas la protéine exogène. Le second modèle est constitué de la lignée lymphoïde B Raji dans laquelle nous avons soit diminué l'expression de *RHOH* par surexpression de JunD, soit au contraire augmenté le taux de transcrits *RHOH* par invalidation de JunD. L'analyse transcriptomique du modèle JOK-1 nous a permis d'obtenir une liste de gènes dont l'expression est modulée en présence de *RHOH* et que nous avons tenté de valider par RT-PCR quantitative dans notre second modèle, Raji. Nous avons ainsi montré que *RAMP1* et plus particulièrement *PRKCA* semblent être des effecteurs potentiels de RhoH. Ces deux gènes codent des protéines impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

RAMP1 est un membre de la famille des RAMP (*Receptor Activity Modifying Protein*) modifiant la fonctionnalité des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) dont les ligands sont des peptides de la famille de la calcitonine. La régulation de l'expression des RAMP à un niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel a une certaine importance, car elles peuvent influencer la réponse d'une cellule cible à un ligand, en modifiant l'activité d'un RCPG. Par exemple, RAMP1 augmente l'affinité du récepteur CRLR (*Calcitonin Receptor-Like Receptor*) pour le neuropeptide CGRP (*Calcitonin Gene Related Peptide*). En revanche, si ce récepteur interagit avec les formes RAMP2 ou RAMP3, son affinité augmente pour le ligand ADM (*ADrénoModulline*). Le peptide CGRP module les fonctions immunitaires en inhibant la prolifération des cellules T et la synthèse d'IL2 et d'IFN γ par ces dernières [332, 333]. Le rôle de RAMP1 n'est pas clairement établi dans les cellules B, contrairement aux lymphocytes T, dans lesquels l'augmentation de son expression entraînerait une diminution de leur prolifération en réponse au CGRP. De manière intéressante, dans les lymphocytes T, on observe une corrélation positive entre une expression élevée de *RHOH* et celle de *RAMP1* [334]. Dans les cellules de LAM, une faible expression de *RAMP1* est observée et ces cellules sont caractérisées par une expression très faible de *RHOH* [335]. Ces données sont donc en accord avec le fait que *RAMP1* semble être un effecteur positivement régulé par RhoH. En revanche, cette corrélation n'est pas retrouvée dans les cellules de LLC, où *RHOH* est

fortement exprimé et où *RAMP1* présente un taux de transcrits très faibles, contrairement à ce qui serait attendu [336]. Compte tenu des fonctions de *RAMP1* dans les cellules T, il serait intéressant de vérifier si cette protéine est une cible potentielle de RhoH dans les lymphocytes T.

PKC α est l'isoforme α de la protéine kinase C (PKC) et est fortement exprimée dans les cellules B et T [337]. Dans nos deux modèles, nous avons montré que l'expression de *RHOH* entraîne une augmentation du taux de transcrits *PRKCA*. Dans les cellules Raji, la diminution de *RHOH* est associée à une réduction des ARNm *PRKCA*. RhoH contrôle donc positivement l'expression de *PRKCA*. Dans les progéniteurs hématopoïétiques et dans des modèles animaux de sclérose multiples, PKC α limite la survie et diminue la prolifération cellulaire [338, 339]. L'expression de PKC α semble donc être un facteur protecteur contre le développement de ces maladies. Il est intéressant de noter que la restitution de l'expression de RhoH dans les cellules HCL est aussi un facteur protecteur dans le cas de la leucémie à tricholeucocytes. Cette corrélation positive entre ces deux gènes est également observée dans les cellules de LAM, où *RHOH* et *PRKCA* sont tous deux faiblement exprimés [335]. Dans ces cellules, la faible expression de *RHOH* contribuerait à la résistance aux chimiothérapies observée dans cette maladie ; et dans des lignées cellulaires myéloïdes, l'expression de PKC α inhibe la prolifération [199, 340, 341]. RhoH régulerait donc positivement *PRKCA*, ce qui serait un facteur de protection contre le développement de certaines pathologies. Dans les lymphocytes T, il a été montré au contraire que PKC α est impliquée dans la régulation positive de la prolifération [339]. Cependant, une réduction du rejet du greffon a été observée pour deux modèles murins où *PRKCA* ou *RHOH* a été invalidé et dans lesquels ont été réalisées des greffes [342, 343]. Ces résultats renforcent l'idée d'une relation entre ces deux gènes ; en revanche, les conséquences phénotypiques de leur expression seraient différentes d'un type cellulaire à un autre.

Selon les conditions d'étude, RhoH présente des rôles différents dans les lymphocytes T : elle peut inhiber certains processus cellulaires, tels que la survie, la prolifération [104], et dans d'autres circonstances, cette protéine est nécessaire pour l'activation et la signalisation du TCR [3, 173, 177, 201]. Nous avons donc voulu identifier de nouveaux effecteurs de RhoH dans les lymphocytes T.

5.4 *MAGEA9, MAGEB2, PASD1, SLA, CCRL2 et IL16, nouveaux effecteurs potentiels de RhoH dans les lymphocytes T*

Nous avons généré au laboratoire deux modèles cellulaires pour cette étude. Le premier est composé de deux lignées : la première, la lignée ATL KK1 dans laquelle nous avons restitué de manière ectopique l'expression de RhoH, la seconde, cette même lignée n'exprimant pas la protéine exogène. Le second modèle est constitué de lymphocytes T isolés du sang périphérique de donneurs sains stimulés 3 heures par soit de la ionomycine (5 μ M) entraînant une augmentation de l'expression de *RHOH*, soit du DMSO (contrôle négatif). L'analyse transcriptomique du modèle KK1 nous a permis d'obtenir une liste de gènes dont l'expression est modulée par *RHOH* et que nous avons tenté de valider par RT-PCR quantitative, dans notre second modèle. Nous avons ainsi montré que les gènes *NMU*, *MAGEB2*, *PASD1*, *SLA*, *SH2D1B*, *MAGEA9* sont positivement régulés en présence de *RHOH*, et qu'au contraire *IQCG* est réprimé. L'expression de *RHOH* conduit également à l'augmentation de la quantité de protéine CCRL2 dans ces cellules lymphoïdes T et à la sécrétion d'IL16 dans leur surnageant de culture. La protéine Runx1 est également plus présente dans le noyau des cellules KK1 dans lesquelles le taux de transcrits *RHOH* est augmenté. Ces protéines semblent donc être des effecteurs potentiels de RhoH.

5.4.1 *MAGEA9, MAGEB2 et PASD1, gènes codant des antigènes tumoraux*

L'expression des gènes *MAGEA9*, *MAGEB2* et *PASD1* est induite par RhoH dans les lymphocytes T activés et les cellules KK1. Notons qu'il s'agit de gènes codants des antigènes tumoraux. La famille des gènes MAGE (*Melanoma Antigen Gene*) code pour des antigènes tumoraux reconnus par les cellules T cytotoxiques et est hautement spécifique des cellules cancéreuses. L'expression de certains gènes MAGE est utilisée pour la détection de cancers colorectaux, cancers du sein, par exemple [344, 345]. Un vaccin réalisé à partir de peptides de MAGEB2 a été généré et utilisé dans des modèles murins de cancer du sein, et une réduction des métastases dans 96% des cas [346]. L'expression de *MAGEB2* a été observée dans 50% des leucémies T et 27% des lymphomes T cutanés [347, 348]. L'expression de cet antigène peut être induite suite à l'utilisation de drogues, favorisant le choix de cette protéine comme

cible thérapeutique dans la prévention de rechutes. L'expression de PASD1 dans les tissus normaux est restreinte aux testicules. PASD1 a tout d'abord été identifié comme étant un antigène associé à de nombreuses hémopathies malignes (lymphomes B diffus à grandes cellules ou DLBCL, leucémies aiguës myéloïdes, lymphomes folliculaires, lymphomes de Burkitt, leucémies aiguës lymphoblastiques de type T) [279, 349-353]. En raison de son expression limitée dans les tissus normaux, PASD1 pourrait être une cible thérapeutique de choix pour la mise en place d'une immunothérapie. Une stimulation *in vitro* de lymphocytes T de patients atteints de LAM ou de donneurs sains par des peptides de PASD1 entraîne une expansion de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques de PASD1, qui présentent une activité de cytolysse à l'encontre des cellules tumorales exprimant PASD1 [354]. RhoH pourrait donc favoriser l'expression de ces antigènes à la surface des cellules T. Dans le cas de la lignée ATL KK1, ceci pourrait donc induire la reconnaissance de ces cellules tumorales par les lymphocytes T cytotoxiques et ainsi augmenter la réaction immunitaire vis-à-vis de ces cellules leucémiques, ce qui représente un effet bénéfique. En revanche, il est possible que ces antigènes ne soient pas forcément exprimés dans les lymphocytes T sains (malgré l'augmentation du taux de leurs transcrits suite à l'induction du gène *RHOH*). Il sera donc nécessaire de vérifier l'expression protéique de ces antigènes à la surface des cellules des deux modèles étudiés. Compte tenu que de plusieurs antigènes tumoraux semblent être induits lors de la restitution de l'expression de RhoH dans les cellules KK1, il serait intéressant d'approfondir cet axe, pouvant représenter une possibilité thérapeutique dans l'ATL.

5.4.2 SLA, gène codant un inhibiteur de la voie du TCR

SLA ou *Src Like Adaptor Protein* (SLAP) régule le niveau d'expression du TCR/CD3 dans les thymocytes et les cellules T [355, 356]. Il s'agit d'un homologue de la famille des Src Kinases, incluant Lck, mais ne possédant pas de domaine kinase, contrairement aux autres membres. SLA régule donc négativement cette famille dans les cellules T et la lignée Jurkat en agissant comme un dominant négatif [355]. Plus récemment, il a été montré que SLA régule négativement l'expression du TCR/CD3 en favorisant la dégradation de TCR ζ dans les cellules T [356]. L'expression de RhoH dans nos deux modèles lymphoïdes T induit une augmentation du taux des transcrits SLA dans les cellules KK1-RhoH et les lymphocytes T stimulés par la ionomycine. Ces résultats suggèrent que le complexe du TCR serait dégradé en présence de RhoH. Cette hypothèse est en accord avec nos données montrant une réduction du

taux de ZAP70 (protéine intégrée au complexe du TCR) dans les lymphocytes T stimulés par de la ionomycine, réduction plus faible mais tout de même observée dans la lignée KK1-RhoH. RhoH semblerait donc aussi bien contrôler positivement la signalisation du TCR lors de son activation mais également le réguler négativement [173]. Ces données pourraient également expliquer pourquoi dans certaines conditions, RhoH régule positivement la prolifération et la survie cellulaire des lymphocytes T et dans d'autres, au contraire, les réprime [104, 173]. Il serait intéressant d'identifier ces conditions pour lesquelles dans les lymphocytes T nous ayons soit une action positive de RhoH sur la signalisation du TCR, soit au contraire une fonction répressive de cette protéine.

5.4.3 CCRL2 et IL16, protéines impliquées dans l'inflammation

IL16 est une cytokine produite par les éosinophiles, les mastocytes, les kératinoocytes et les cellules dendritiques [357, 358]. Elle est également synthétisée par les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ et sécrétée en réponse à un antigène [357]. Il a été montré que cette protéine induit la migration vers le site d'inflammation des cellules T CD4⁺, des monocytes, des éosinophiles et des cellules dendritiques [357, 358]. De plus, l'IL16 induit l'expression du marqueur CD25 à la surface des cellules CD4⁺ et les active, en synergie avec l'IL2 et l'IL5 [359, 360]. CCRL2 (Chemokine CC motif Receptor Like 2) est un récepteur transmembranaire à 7 hélices α . CCRL2 est exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques, les cellules dendritiques, les macrophages, les éosinophiles et les cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ [361, 362]. Cette expression de CCRL2 est augmentée en réponse à une stimulation par un anticorps anti-CD3 ou par l'IL2 [361]. L'inactivation de *CCRL2* dans un modèle murin d'hypersensibilité à l'ovalbumine entraîne une diminution de l'infiltration leucocytaire, accompagnée d'une réduction du recrutement des cellules dendritiques et de la production de cytokines de type TH2 et de chémokines. CCRL2 fonctionne donc comme un récepteur proinflammatoire [362]. Le fait que RhoH régule positivement la sécrétion de l'IL16 dans le surnageant de culture et l'expression de la protéine CCRL2 devrait donc favoriser les réactions immunitaires. Cela pourrait donc expliquer que dans les lignées cellulaires ATL, RhoH étant faiblement exprimée, ceci devrait favoriser l'absence de réaction des cellules immunitaires vis-à-vis des cellules leucémiques. En restituant l'expression de RhoH, nous devrions donc inverser cette tendance. En revanche, une conséquence assez néfaste serait d'accroître peut être la

prolifération des cellules tumorales, par effet autocrine, en augmentant l'expression du récepteur à l'IL2 à la surface des cellules. Pour comprendre lequel de ces effets serait prédominant par rapport à l'autre et ainsi juger de l'intérêt thérapeutique, il faudrait générer un modèle murin de xénogreffe de l'ATL avec plusieurs groupes d'individus, dont l'un servant de contrôle, le second pour lequel une injection de cellules ATL exprimant la protéine RhoH exogène sera été réalisée et le troisième groupe d'individus dans lesquels les mêmes cellules ATL mais n'exprimant pas la protéine exogène seront été injectées. En étudiant d'une part les capacités prolifératives des cellules tumorales dans ce modèle *in vivo* et en évaluant les réactions inflammatoires, nous pourrions juger de l'intérêt thérapeutique de ces cibles.

En résumé, il serait très intéressant de développer l'étude des cibles potentielles de RhoH dans les cellules T, tout d'abord en vérifiant l'expression des gènes étudiés dans nos deux modèles (KK1-RhoH et lymphocytes T activés), mais aussi en quantifiant leur expression dans un troisième modèle (des lymphocytes T dans lesquels l'expression du gène *RHOH* aura été réprimée par transfection d'un ARN interférent spécifique de *RHOH* et stimulés 3 heures par la ionomycine). En visualisant des phénomènes inverses de ceux observés dans les deux premiers modèles (lignée KK1-RhoH et lymphocytes T stimulés par la ionomycine), nous confirmerions le rôle de RhoH dans le contrôle de ces protéines et ainsi validerions ces effecteurs potentiels de RhoH dans les cellules T. Nous pourrions ensuite réaliser une étude des conséquences physiologiques et/ou phénotypiques de l'expression de ces effecteurs potentiels à partir des trois modèles générés.

Un troisième modèle de leucémie, la leucémie aigue myéloïde, nous a permis de valider un mécanisme de régulation du gène *RHOH* mis en évidence dans les cellules lymphoïdes B mais aussi de confirmer que PKC α serait un effecteur possible de RhoH.

5.5 Induction du gène RHOH et de sa cible potentielle, PRKCA, par invalidation de JunD dans des cellules de LAM

Dans des cellules mononucléées de patients atteints de LAM de type 4 et de type 5, l'invalidation de *JUND* tend à induire le gène *RHOH* et sa nouvelle cible potentielle *PRKCA*,

mécanisme similaire à celui décrit dans les cellules lymphoïdes B JOK-1 et Raji.

5.5.1 Induction du gène *RHOH* par invalidation de *JunD* dans les cellules de LAM

Ces résultats sont en accord avec la corrélation inverse observée entre l'expression de *JUND*, plus fortement exprimé dans les cellules de LAM et le faible taux de transcrits *RHOH* mis en évidence dans ces cellules [199, 282]. Une telle corrélation inverse a été observée dans d'autres pathologies : la leucémie à tricholeucocytes, la leucémie T de l'adulte mais aussi la leucémie lymphoïde chronique, cette dernière étant caractérisée par une forte expression des ARN messagers *RHOH* et une faible expression de *JUND*, contrairement aux trois autres leucémies [283]. Cette corrélation inverse est également retrouvée dans d'autres circonstances. En effet, il a été montré que l'expression de *RHOH* diminue au cours de l'activation lymphocytaire T, et au contraire, celle de *JUND* est induite. En effet, dans la lignée Jurkat, le traitement par le PMA entraîne dès 20 minutes une répression du gène *RHOH* et 2 Heures de ce traitement sont amplement suffisantes pour augmenter la fixation de JunD à l'ADN [3, 104, 363]. La transcription du gène *RHOH* serait donc contrôlée négativement par le facteur de transcription JunD aussi bien dans certaines leucémies, que dans des conditions physiologiques. Il existerait donc une boucle de contrôle impliquant RhoH et JunD. RhoH serait réprimée par JunD, conduisant ainsi à l'activation des protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 [104]. Rac1 et Cdc42 contrôlent positivement l'activation d'une protéine de la famille des MAPK, appelée SAPK (*Stress Activated Protein Kinase*) ou encore JNK (*cJun Nterminal Kinase*), dans des cellules épithéliales et des cellules de leucémie aigüe promyélocytaire [364-367]. Ces voies de signalisation entraînent l'activation de PAK1, un effecteur direct de Rac1, puis des protéines MEKK1 et MEK1, MAPK menant à l'activation des JNKs [368-370]. Il y aurait donc une boucle de régulation négative entre RhoH et JunD (**Figure 88**, ci-dessous).

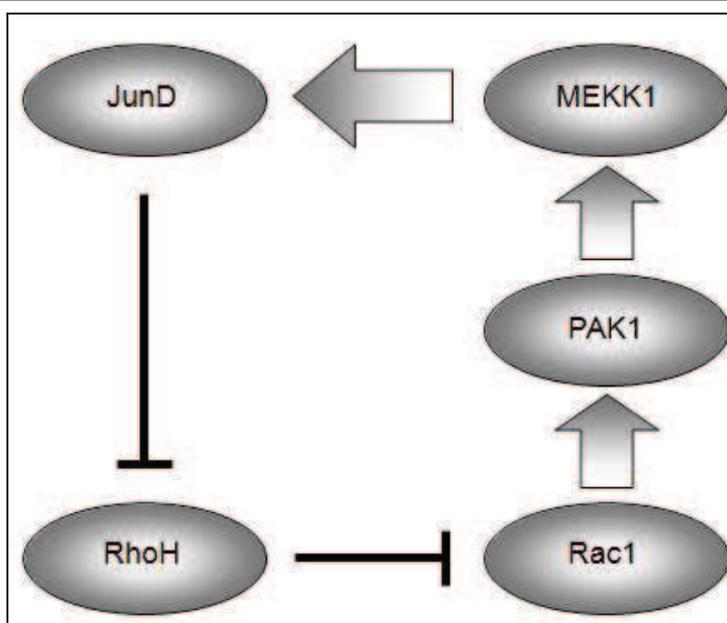


Figure 88 : Boucle de régulation des protéines JunD, RhoH et Rac1 [11]. Notre étude a montré que JunD régule négativement l'expression transcriptionnelle du gène *RHOH*. D'autres équipes ont montré que RhoH contrôle négativement l'activité de Rac1 et que Rac1 active MEKK1 par l'intermédiaire de PAK1, ce qui entraîne une augmentation de l'activation des membres de la famille Jun, dont JunD.

5.5.2 Induction de *PRKCA*, une cible potentielle de RhoH, après invalidation de JunD dans les cellules de LAM

Nos analyses de transcriptome validées par RT-PCR quantitative dans les lignées lymphoïdes B démontrent que RhoH est un régulateur positif de *PRKCA*. Il s'agit de l'isoforme α de la protéine kinase C (PKC). L'invalidation de JunD dans les cellules mononucléaires de LAM augmente l'expression du gène *RHOH* (comme décrit précédemment), mais aussi de la quantité de transcrits *PRKCA*. Il est intéressant de noter que les patients présentant plutôt une diminution de *RHOH* suite à l'invalidation de *JUND* dans les cellules LAM, ont également une réduction des transcrits *PRKCA*, renforçant l'idée d'une corrélation positive entre *RHOH* et *PRKCA*, et de ce dernier comme étant une cible de RhoH. Dans une lignée myéloïde modèle de la LAM (THP-1), $PKC\alpha$ induit la différenciation et inhibe la prolifération [340, 341]. Dans les progéniteurs hématopoïétiques, elle limite la survie et diminue la prolifération cellulaire [338]. Il a été montré que la restitution de l'expression de RhoH dans des cellules LAM conduit à la déphosphorylation de Bad et ainsi à une réduction de la survie cellulaire [183]. Il y a donc bien une corrélation positive entre le rôle de RhoH et celui de $PKC\alpha$ dans ces cellules leucémiques. Ces résultats s'accordent donc pour désigner *PRKCA* comme effecteur de *RHOH* et positivement régulé par ce dernier dans les cellules de LAM (**Figure 89**, ci-dessous).

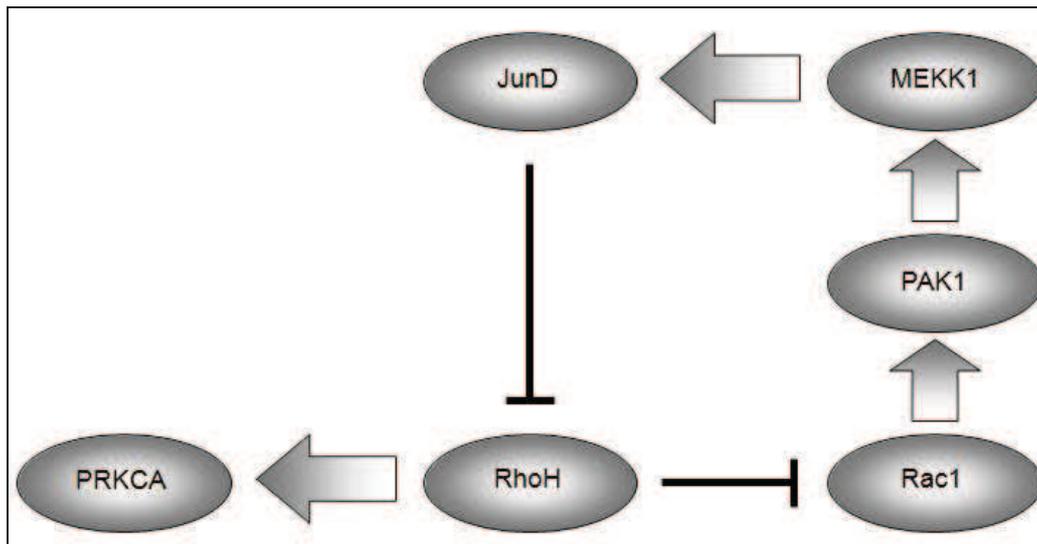


Figure 90 : Boucle de régulation entre JunD, RhoH et Rac1 amenant à un contrôle de l'expression de *PRKCA* [11]. Notre étude a montré que JunD régule négativement l'expression transcriptionnelle du gène *RHOH* mais également la cible potentielle de RhoH, *PRKCA*. D'autres équipes ont montré que RhoH contrôle négativement l'activité de Rac1 et que Rac1 active MEKK1 par l'intermédiaire de PAK1, ce qui entraîne une augmentation de l'activation des membres de la famille Jun, dont JunD. La régulation de ces voies de signalisation permettrait de contrôler l'expression de *PRKCA*, dans les cellules lymphoïdes B et les cellules mononucléaires de patients atteints de LAM.

6 Conclusion générale et Perspectives

RhoH est exprimé spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques et plus précisément dans les leucocytes. Le gène *RHOH* est transcrit en de nombreuses isoformes, initiées en amont des exons 1, 2 ou 4. Dans les lymphocytes B et T, la quantification des différentes catégories d'ARN messagers *RHOH* a permis de montrer que le promoteur P3 (situé en amont de l'exon 4) est majoritairement actif dans les lymphocytes T et B. De plus, nous avons mis en évidence malgré leur faible activité que les promoteurs P1 et P2, situés respectivement en amont des exons 1 et 2, présentent une spécificité cellulaire : P1 est plus actif dans les cellules T, au contraire P2 est favorisé dans les lymphocytes B. Nous avons isolé le promoteur P3 minimal entre les nucléotides [-236/+67] dans les cellules B. L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du promoteur P3 dans les cellules B a permis de montrer l'implication des facteurs de transcription AP1 et NFκB dans le contrôle de P3. En particulier JunB, c-Fos et NFκB activent ce promoteur dans les cellules B et JunD le réprime. Compte tenu des résultats, il faudrait envisagée d'une part, confirmer le rôle de NFκB dans la régulation du promoteur P3 et du gène *RHOH* ; d'autre part, d'identifier tous les partenaires protéiques du complexe AP1 intervenant dans cette régulation.

La restitution de l'expression de RhoH contrecarre le phénotype tumoral de la leucémie à tricholeucocytes (leucémie de type B, HCL) en diminuant la prolifération, l'adhésion et la migration des cellules leucémiques. La répression du gène *RHOH* dans l'HCL est associée à une réduction du taux de transcrits initiés en amont de l'exon 4 et à une diminution de l'activité du promoteur P3. L'étude des événements moléculaires impliqués dans la dérégulation de ce promoteur dans des lignées modèles de l'HCL a permis de montrer des résultats prometteurs : l'inhibition du facteur NFκB pourrait entraîner une levée de la répression du promoteur P3 dans ces cellules. Cette étude préliminaire nécessite d'être validée et approfondie mais présente un grand intérêt pour nous. Notre objectif serait de montrer que l'inhibition de NFκB permet non seulement une reconstitution de l'expression de *RHOH* dans les cellules HCL, mais pourrait potentiellement à elle seule contrecarrer la progression tumorale dans cette pathologie. Compte tenu du rôle de RhoH dans les cellules de la leucémie à tricholeucocytes, nous avons essayé d'identifier de nouvelles cibles potentielles de RhoH dans les cellules B. Nous avons ainsi montré que RhoH induit l'expression de deux gènes,

RAMPI et *PRKCA*. Les protéines codées par ces gènes sont impliquées dans le contrôle négatif de la prolifération cellulaire, dans certaines conditions. Les résultats préliminaires obtenus semblent très prometteurs et devraient être confirmés par la suite. Nous devrions ainsi étudier l'expression de ces protéines dans nos modèles ainsi que leur activité. Si nous parvenions à confirmer leur fonctionnalité, il serait intéressant d'étudier par quels moyens RhoH contrôle l'expression de ces deux gènes dans les cellules B.

Dans la leucémie aigue myéloïde, l'invalidation du facteur de transcription JunD induit une augmentation de l'expression de *RHOH* et de son effecteur probable, *PRKCA*. La restitution de l'expression de *RHOH* contrecarre la progression de la leucémie HCL. Par analogie, on pourrait se demander si l'induction de *RHOH* par invalidation de JunD entraînerait également une diminution des processus de prolifération, d'adhésion et de migration cellulaires dans les cellules de LAM. En perspectives, il serait donc très intéressant d'étudier le phénotype des cellules LAM dans lesquelles l'expression de *RHOH* aurait été augmentée, ainsi que l'expression et activité de cette nouvelle cible potentielle PKC α .

Les résultats de nos travaux sur la régulation du promoteur P3 du gène *RHOH* au cours de l'activation lymphocytaire T et sa dérégulation dans la leucémie T de l'adulte sont encore trop préliminaires. Ce projet nécessite encore beaucoup de travail. En revanche, l'identification de nouveaux effecteurs potentiels de RhoH a permis de mettre en évidence qu'elle semble contrôler positivement l'expression de *SLA*, codant un inhibiteur de la signalisation du TCR, la synthèse de protéines proinflammatoires, *CCRL2* et *IL16*, ou encore de gènes codant des antigènes tumoraux, dont l'expression par les cellules de la leucémie T de l'adulte pourrait favoriser les réactions immunitaires à l'encontre de ces cellules leucémiques.

La caractérisation des mécanismes moléculaires pouvant restaurer l'expression de RhoH et ainsi l'expression de protéines proinflammatoires, antigéniques ou impliquée dans la prolifération dans la leucémie à tricholeucocytes et la leucémie T de l'adulte nous permettrait de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par exemple, l'utilisation de molécules telles que des inhibiteurs de facteurs de transcription, comme NF κ B, serait envisageable, ce

qui bloquerait peut être la progression tumorale de ces cellules tumorales. Nous présentons dans ce travail de thèse les premiers résultats prometteurs obtenus dans l'étude de ces mécanismes.

Références bibliographiques

1. Karnoub, A.E., Der, C.J. and Campbell, S.L., *The insert region of Rac1 is essential for membrane ruffling but not cellular transformation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(8): p. 2847-57.
2. Lahousse, S., Smorowski, A.L., Denis, C., Lantoine, D., Kerckaert, J.P. and Galiegue-Zouitina, S., *Structural features of hematopoiesis-specific RhoH/ARHH gene: high diversity of 5'-UTR in different hematopoietic lineages suggests a complex post-transcriptional regulation*. Gene, 2004. **343**(1): p. 55-68.
3. Schmidt-Mende, J., Geering, B., Yousefi, S. and Simon, H.U., *Lysosomal degradation of RhoH protein upon antigen receptor activation in T but not B cells*. Eur J Immunol, 2010. **40**(2): p. 525-9.
4. Metcalfe, D.D., Peavy, R.D. and Gilfillan, A.M., *Mechanisms of mast cell signaling in anaphylaxis*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(4): p. 639-46; quiz 647-8.
5. Karnoub, A.E. and Weinberg, R.A., *Ras oncogenes: split personalities*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(7): p. 517-31.
6. Pechlivanis, M. and Kuhlmann, J., *Hydrophobic modifications of Ras proteins by isoprenoid groups and fatty acids--More than just membrane anchoring*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1764**(12): p. 1914-31.
7. Wennerberg, K. and Der, C.J., *Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 8): p. 1301-12.
8. Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F., *The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism*. Nature, 1991. **349**(6305): p. 117-27.
9. Dorn, T., *Analysis of RhoH function in vivo*. UNIVERSITÄT MÜNCHEN, 2007. **Dissertation zur erlangung des doktorgrades der fakultät der biologie der Ludwig-Maximilians**.
10. Lahousse, S., *Un nouveau mécanisme régulant la synthèse d'une petite protéine G, RhoH, impliquée dans les proliférations malignes lymphoïdes*. Université du Droit et de la Santé, Lille 2, 2005. **Thèse de l'Université de Lille - Sciences de la Vie et de la Santé**.
11. Delestré, L., Berthon, C., Quesnel, B., Figeac, M., Kerckaert, J.P., Galiegue-Zouitina, S. and Shelley, C.S., *Repression of RHOH by JunD Mechanistically Connects their Inverse Expression in Leukaemia and Physiologic Leukocyte Activation*. Biochem J, 2010. **en révision**.
12. Fueller, F. and Kubatzky, K.F., *The small GTPase RhoH is an atypical regulator of haematopoietic cells*. Cell Commun Signal, 2008. **6**: p. 6.
13. Heasman, S.J. and Ridley, A.J., *Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(9): p. 690-701.
14. Tybulewicz, V.L., *Vav-family proteins in T-cell signalling*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 267-74.
15. Bustelo, X.R., Sauzeau, V. and Berenjeno, I.M., *GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo*. Bioessays, 2007. **29**(4): p. 356-70.
16. Aspenstrom, P., Fransson, A. and Saras, J., *Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 2): p. 327-37.
17. Smale, S.T. and Kadonaga, J.T., *The RNA polymerase II core promoter*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 449-79.
18. Tybulewicz, V.L. and Henderson, R.B., *Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(9): p. 630-44.
19. Bourne, H.R., Wrischnik, L. and Kenyon, C., *Ras proteins. Some signal developments*. Nature, 1990. **348**(6303): p. 678-9.
20. Matozaki, T., Nakanishi, H. and Takai, Y., *Small G-protein networks: their crosstalk and signal cascades*. Cell Signal, 2000. **12**(8): p. 515-24.

21. Eckert, L.B., Repasky, G.A., Ulku, A.S., McFall, A., Zhou, H., Sartor, C.I. and Der, C.J., *Involvement of Ras activation in human breast cancer cell signaling, invasion, and anoikis*. *Cancer Res*, 2004. **64**(13): p. 4585-92.
22. Fukuda, M., Kanno, E. and Yamamoto, A., *Rabphilin and Noc2 are recruited to dense-core vesicles through specific interaction with Rab27A in PC12 cells*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(13): p. 13065-75.
23. Wennerberg, K., Rossman, K.L. and Der, C.J., *The Ras superfamily at a glance*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 5): p. 843-6.
24. ten Klooster, J.P. and Hordijk, P.L., *Targeting and localized signalling by small GTPases*. *Biol Cell*, 2007. **99**(1): p. 1-12.
25. Ellis, R.W., Defeo, D., Shih, T.Y., Gonda, M.A., Young, H.A., Tsuchida, N., Lowy, D.R. and Scolnick, E.M., *The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes*. *Nature*, 1981. **292**(5823): p. 506-11.
26. Santos, E., Tronick, S.R., Aaronson, S.A., Pulciani, S. and Barbacid, M., *T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes*. *Nature*, 1982. **298**(5872): p. 343-7.
27. Santos, E., Martin-Zanca, D., Reddy, E.P., Pierotti, M.A., Della Porta, G. and Barbacid, M., *Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient*. *Science*, 1984. **223**(4637): p. 661-4.
28. Omerovic, J. and Prior, I.A., *Compartmentalized signalling: Ras proteins and signalling nanoclusters*. *FEBS J*, 2009. **276**(7): p. 1817-25.
29. Madaule, P. and Axel, R., *A novel ras-related gene family*. *Cell*, 1985. **41**(1): p. 31-40.
30. Scherer, A., John, J., Linke, R., Goody, R.S., Wittinghofer, A., Pai, E.F. and Homes, K.C., *Crystallization and preliminary X-ray analysis of the human c-H-ras-oncogene product p21 complexed with GTP analogues*. *J Mol Biol*, 1989. **206**(1): p. 257-9.
31. Hirshberg, M., Stockley, R.W., Dodson, G. and Webb, M.R., *The crystal structure of human rac1, a member of the rho-family complexed with a GTP analogue*. *Nat Struct Biol*, 1997. **4**(2): p. 147-52.
32. Paduch, M., Jelen, F. and Otlewski, J., *Structure of small G proteins and their regulators*. *Acta Biochim Pol*, 2001. **48**(4): p. 829-50.
33. Pai, E.F., Kabsch, W., Krengel, U., Holmes, K.C., John, J. and Wittinghofer, A., *Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation*. *Nature*, 1989. **341**(6239): p. 209-14.
34. Brunger, A.T., Milburn, M.V., Tong, L., deVos, A.M., Jancarik, J., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., Ohtsuka, E. and Kim, S.H., *Crystal structure of an active form of RAS protein, a complex of a GTP analog and the HRAS p21 catalytic domain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(12): p. 4849-53.
35. Milburn, M.V., Tong, L., deVos, A.M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. and Kim, S.H., *Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins*. *Science*, 1990. **247**(4945): p. 939-45.
36. Schlichting, I., Almo, S.C., Rapp, G., Wilson, K., Petratos, K., Lentfer, A., Wittinghofer, A., Kabsch, W., Pai, E.F., Petsko, G.A. and et al., *Time-resolved X-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis*. *Nature*, 1990. **345**(6273): p. 309-15.
37. Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. and Sander, C., *The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids*. *Biochemistry*, 1991. **30**(19): p. 4637-48.
38. Jurnak, F., *Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins*. *Science*, 1985. **230**(4721): p. 32-6.
39. Sprang, S.R., *G protein mechanisms: insights from structural analysis*. *Annu Rev Biochem*, 1997. **66**: p. 639-78.

40. Clark, G.J., Kinch, M.S., Rogers-Graham, K., Sebti, S.M., Hamilton, A.D. and Der, C.J., *The Ras-related protein Rheb is farnesylated and antagonizes Ras signaling and transformation*. J Biol Chem, 1997. **272**(16): p. 10608-15.
41. Hancock, J.F., Paterson, H. and Marshall, C.J., *A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane*. Cell, 1990. **63**(1): p. 133-9.
42. Berzat, A.C., Buss, J.E., Chenette, E.J., Weinbaum, C.A., Shutes, A., Der, C.J., Minden, A. and Cox, A.D., *Transforming activity of the Rho family GTPase, Wrch-1, a Wnt-regulated Cdc42 homolog, is dependent on a novel carboxyl-terminal palmitoylation motif*. J Biol Chem, 2005. **280**(38): p. 33055-65.
43. Chenette, E.J., Mitin, N.Y. and Der, C.J., *Multiple sequence elements facilitate Chp Rho GTPase subcellular location, membrane association, and transforming activity*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(7): p. 3108-21.
44. Gutierrez, L., Magee, A.I., Marshall, C.J. and Hancock, J.F., *Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis*. EMBO J, 1989. **8**(4): p. 1093-8.
45. Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. and Wittinghofer, A., *The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants*. Science, 1997. **277**(5324): p. 333-8.
46. Bernardis, A., *GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1603**(2): p. 47-82.
47. Boriack-Sjodin, P.A., Margarit, S.M., Bar-Sagi, D. and Kuriyan, J., *The structural basis of the activation of Ras by Sos*. Nature, 1998. **394**(6691): p. 337-43.
48. ten Klooster, J.P., Jaffer, Z.M., Chernoff, J. and Hordijk, P.L., *Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix*. J Cell Biol, 2006. **172**(5): p. 759-69.
49. Siderovski, D.P. and Willard, F.S., *The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits*. Int J Biol Sci, 2005. **1**(2): p. 51-66.
50. Buchsbaum, R.J., *Rho activation at a glance*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 7): p. 1149-52.
51. Bhattacharya, M., Babwah, A.V. and Ferguson, S.S., *Small GTP-binding protein-coupled receptors*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 6): p. 1040-4.
52. Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J. and Der, C.J., *Increasing complexity of Ras signaling*. Oncogene, 1998. **17**(11 Reviews): p. 1395-413.
53. Bishop, A.L. and Hall, A., *Rho GTPases and their effector proteins*. Biochem J, 2000. **348 Pt 2**: p. 241-55.
54. Joberty, G., Perlungher, R.R., Sheffield, P.J., Kinoshita, M., Noda, M., Haystead, T. and Macara, I.G., *Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(10): p. 861-6.
55. Ridley, A.J. and Hall, A., *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors*. Cell, 1992. **70**(3): p. 389-99.
56. Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A., *The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling*. Cell, 1992. **70**(3): p. 401-10.
57. Vega, F.M. and Ridley, A.J., *Rho GTPases in cancer cell biology*. FEBS Lett, 2008. **582**(14): p. 2093-101.
58. Nassar, N., Cancelas, J., Zheng, J., Williams, D.A. and Zheng, Y., *Structure-function based design of small molecule inhibitors targeting Rho family GTPases*. Curr Top Med Chem, 2006. **6**(11): p. 1109-16.
59. Wu, W.J., Leonard, D.A., R, A.C. and Manor, D., *Interaction between Cdc42Hs and RhoGDI is mediated through the Rho insert region*. J Biol Chem, 1997. **272**(42): p. 26153-8.
60. Walker, S.J., Wu, W.J., Cerione, R.A. and Brown, H.A., *Activation of phospholipase D1 by Cdc42 requires the Rho insert region*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 15665-8.
61. Walker, S.J. and Brown, H.A., *Specificity of Rho insert-mediated activation of phospholipase D1*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 26260-7.

62. Zong, H., Kaibuchi, K. and Quilliam, L.A., *The insert region of RhoA is essential for Rho kinase activation and cellular transformation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(16): p. 5287-98.
63. Joneson, T. and Bar-Sagi, D., *A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production*. J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 17991-4.
64. Hoffman, G.R. and Cerione, R.A., *Rac inserts its way into the immune response*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 194-6.
65. Gosser, Y.Q., Nomanbhoy, T.K., Aghazadeh, B., Manor, D., Combs, C., Cerione, R.A. and Rosen, M.K., *C-terminal binding domain of Rho GDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases*. Nature, 1997. **387**(6635): p. 814-9.
66. Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O.N., Illenberger, D. and Gierschik, P., *The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(2): p. 122-6.
67. DerMardirossian, C. and Bokoch, G.M., *GDI: central regulatory molecules in Rho GTPase activation*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(7): p. 356-63.
68. Dovas, A. and Couchman, J.R., *RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities*. Biochem J, 2005. **390**(Pt 1): p. 1-9.
69. Olofsson, B., *Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling*. Cell Signal, 1999. **11**(8): p. 545-54.
70. Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C., *Rho GTPases and signaling networks*. Genes Dev, 1997. **11**(18): p. 2295-322.
71. Zhang, S., Qian, X., Redman, C., Bliskovski, V., Ramsay, E.S., Lowy, D.R. and Mock, B.A., *p16 INK4a gene promoter variation and differential binding of a repressor, the ras-responsive zinc-finger transcription factor, RREB*. Oncogene, 2003. **22**(15): p. 2285-95.
72. Del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Alderson, N.B., Meller, N., Hahn, K.M. and Schwartz, M.A., *Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(3): p. 232-9.
73. Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S. and Takai, Y., *Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein*. J Biol Chem, 1997. **272**(37): p. 23371-5.
74. Faure, J., Vignais, P.V. and Dagher, M.C., *Phosphoinositide-dependent activation of Rho A involves partial opening of the RhoA/Rho-GDI complex*. Eur J Biochem, 1999. **262**(3): p. 879-89.
75. Mehta, D., Rahman, A. and Malik, A.B., *Protein kinase C-alpha signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22614-20.
76. Dransart, E., Olofsson, B. and Cherfils, J., *RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation*. Traffic, 2005. **6**(11): p. 957-66.
77. Tamma, G., Klussmann, E., Procino, G., Svelto, M., Rosenthal, W. and Valenti, G., *cAMP-induced AQP2 translocation is associated with RhoA inhibition through RhoA phosphorylation and interaction with RhoGDI*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 8): p. 1519-25.
78. Soisson, S.M., Nimnual, A.S., Uy, M., Bar-Sagi, D. and Kuriyan, J., *Crystal structure of the Dbl and pleckstrin homology domains from the human Son of sevenless protein*. Cell, 1998. **95**(2): p. 259-68.
79. Zhang, B., Zhang, Y., Wang, Z. and Zheng, Y., *The role of Mg²⁺ cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins*. J Biol Chem, 2000. **275**(33): p. 25299-307.
80. Yu, H. and Schreiber, S.L., *Structure of guanine-nucleotide-exchange factor human Mss4 and identification of its Rab-interacting surface*. Nature, 1995. **376**(6543): p. 788-91.
81. Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T., *Small GTP-binding proteins*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 153-208.

82. Steven, R., Kubiseski, T.J., Zheng, H., Kulkarni, S., Mancillas, J., Ruiz Morales, A., Hogue, C.W., Pawson, T. and Culotti, J., *UNC-73 activates the Rac GTPase and is required for cell and growth cone migrations in C. elegans*. Cell, 1998. **92**(6): p. 785-95.
83. Lorenzi, M.V., Castagnino, P., Chen, Q., Hori, Y. and Miki, T., *Distinct expression patterns and transforming properties of multiple isoforms of Ost, an exchange factor for RhoA and Cdc42*. Oncogene, 1999. **18**(33): p. 4742-55.
84. Billadeau, D.D., Mackie, S.M., Schoon, R.A. and Leibson, P.J., *The Rho family guanine nucleotide exchange factor Vav-2 regulates the development of cell-mediated cytotoxicity*. J Exp Med, 2000. **192**(3): p. 381-92.
85. Schmidt, S., Diriong, S., Mery, J., Fabbriozio, E. and Debant, A., *Identification of the first Rho-GEF inhibitor, TRIPalpha, which targets the RhoA-specific GEF domain of Trio*. FEBS Lett, 2002. **523**(1-3): p. 35-42.
86. Deckert, M., Tartare-Deckert, S., Couture, C., Mustelin, T. and Altman, A., *Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product*. Immunity, 1996. **5**(6): p. 591-604.
87. Crespo, P., Schuebel, K.E., Ostrom, A.A., Gutkind, J.S. and Bustelo, X.R., *Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product*. Nature, 1997. **385**(6612): p. 169-72.
88. Miranti, C.K., Leng, L., Maschberger, P., Brugge, J.S. and Shattil, S.J., *Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1*. Curr Biol, 1998. **8**(24): p. 1289-99.
89. Michel, F., Grimaud, L., Tuosto, L. and Acuto, O., *Fyn and ZAP-70 are required for Vav phosphorylation in T cells stimulated by antigen-presenting cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(48): p. 31932-8.
90. Servitja, J.M., Marinissen, M.J., Sodhi, A., Bustelo, X.R. and Gutkind, J.S., *Rac1 function is required for Src-induced transformation. Evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34339-46.
91. Resat, H., Straatsma, T.P., Dixon, D.A. and Miller, J.H., *The arginine finger of RasGAP helps Gln-61 align the nucleophilic water in GAP-stimulated hydrolysis of GTP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6033-8.
92. Scheffzek, K., Lautwein, A., Kabsch, W., Ahmadian, M.R. and Wittinghofer, A., *Crystal structure of the GTPase-activating domain of human p120GAP and implications for the interaction with Ras*. Nature, 1996. **384**(6609): p. 591-6.
93. Peck, J., Douglas, G.t., Wu, C.H. and Burbelo, P.D., *Human RhoGAP domain-containing proteins: structure, function and evolutionary relationships*. FEBS Lett, 2002. **528**(1-3): p. 27-34.
94. Bernardis, A. and Settleman, J., *GAP control: regulating the regulators of small GTPases*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(7): p. 377-85.
95. Sordella, R., Jiang, W., Chen, G.C., Curto, M. and Settleman, J., *Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis*. Cell, 2003. **113**(2): p. 147-58.
96. Chardin, P., *Function and regulation of Rnd proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(1): p. 54-62.
97. Aspenstrom, P., Ruusala, A. and Pacholsky, D., *Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases*. Exp Cell Res, 2007. **313**(17): p. 3673-9.
98. Fiegen, D., Haeusler, L.C., Blumenstein, L., Herbrand, U., Dvorsky, R., Vetter, I.R. and Ahmadian, M.R., *Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase*. J Biol Chem, 2004. **279**(6): p. 4743-9.
99. Gampel, A., Parker, P.J. and Mellor, H., *Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB*. Curr Biol, 1999. **9**(17): p. 955-8.
100. Mulloy, J.C., Cancelas, J.A., Filippi, M.D., Kalfa, T.A., Guo, F. and Zheng, Y., *Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies*. Blood, 2010. **115**(5): p. 936-47.

101. Hall, A., *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*. Science, 1998. **279**(5350): p. 509-14.
102. Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L., *The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(4): p. 1942-52.
103. Nobes, C.D. and Hall, A., *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. Cell, 1995. **81**(1): p. 53-62.
104. Li, X., Bu, X., Lu, B., Avraham, H., Flavell, R.A. and Lim, B., *The hematopoiesis-specific GTP-binding protein RhoH is GTPase deficient and modulates activities of other Rho GTPases by an inhibitory function*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(4): p. 1158-71.
105. Klein, R.M. and Aplin, A.E., *Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2224-33.
106. Fan, L., Pellegrin, S., Scott, A. and Mellor, H., *The small GTPase Rif is an alternative trigger for the formation of actin stress fibers in epithelial cells*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 8): p. 1247-52.
107. Aspenstrom, P., *The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton*. Exp Cell Res, 1999. **246**(1): p. 20-5.
108. Etienne-Manneville, S., Manneville, J.B., Nicholls, S., Ferenczi, M.A. and Hall, A., *Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization*. J Cell Biol, 2005. **170**(6): p. 895-901.
109. Matas, O.B., Fritz, S., Luna, A. and Egea, G., *Membrane trafficking at the ER/Golgi interface: functional implications of RhoA and Rac1*. Eur J Cell Biol, 2005. **84**(8): p. 699-707.
110. Yu, W., Shewan, A.M., Brakeman, P., Eastburn, D.J., Datta, A., Bryant, D.M., Fan, Q.W., Weiss, W.A., Zegers, M.M. and Mostov, K.E., *Involvement of RhoA, ROCK I and myosin II in inverted orientation of epithelial polarity*. EMBO Rep, 2008. **9**(9): p. 923-9.
111. Baek, S.H., Kwon, Y.C., Lee, H. and Choe, K.M., *Rho-family small GTPases are required for cell polarization and directional sensing in Drosophila wound healing*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **394**(3): p. 488-92.
112. Pruitt, K. and Der, C.J., *Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis*. Cancer Lett, 2001. **171**(1): p. 1-10.
113. Miyano, K., Ueno, N., Takeya, R. and Sumimoto, H., *Direct involvement of the small GTPase Rac in activation of the superoxide-producing NADPH oxidase Nox1*. J Biol Chem, 2006. **281**(31): p. 21857-68.
114. Yang, F.C., Atkinson, S.J., Gu, Y., Borneo, J.B., Roberts, A.W., Zheng, Y., Pennington, J. and Williams, D.A., *Rac and Cdc42 GTPases control hematopoietic stem cell shape, adhesion, migration, and mobilization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(10): p. 5614-8.
115. Gu, Y., Filippi, M.D., Cancelas, J.A., Siefiring, J.E., Williams, E.P., Jasti, A.C., Harris, C.E., Lee, A.W., Prabhakar, R., Atkinson, S.J., Kwiatkowski, D.J. and Williams, D.A., *Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases*. Science, 2003. **302**(5644): p. 445-9.
116. Jansen, M., Yang, F.C., Cancelas, J.A., Bailey, J.R. and Williams, D.A., *Rac2-deficient hematopoietic stem cells show defective interaction with the hematopoietic microenvironment and long-term engraftment failure*. Stem Cells, 2005. **23**(3): p. 335-46.
117. Yang, L., Wang, L., Geiger, H., Cancelas, J.A., Mo, J. and Zheng, Y., *Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(12): p. 5091-6.
118. Ghiaur, G., Lee, A., Bailey, J., Cancelas, J.A., Zheng, Y. and Williams, D.A., *Inhibition of RhoA GTPase activity enhances hematopoietic stem and progenitor cell proliferation and engraftment*. Blood, 2006. **108**(6): p. 2087-94.
119. Yang, L., Wang, L., Kalfa, T.A., Cancelas, J.A., Shang, X., Pushkaran, S., Mo, J., Williams, D.A. and Zheng, Y., *Cdc42 critically regulates the balance between myelopoiesis and erythropoiesis*. Blood, 2007. **110**(12): p. 3853-61.

120. Stowers, L., Yelon, D., Berg, L.J. and Chant, J., *Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 5027-31.
121. D'Souza-Schorey, C., Boettner, B. and Van Aelst, L., *Rac regulates integrin-mediated spreading and increased adhesion of T lymphocytes*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 3936-46.
122. Campbell, K.S., *Signal transduction from the B cell antigen-receptor*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(3): p. 256-64.
123. Borroto, A., Gil, D., Delgado, P., Vicente-Manzanares, M., Alcover, A., Sanchez-Madrid, F. and Alarcon, B., *Rho regulates T cell receptor ITAM-induced lymphocyte spreading in an integrin-independent manner*. Eur J Immunol, 2000. **30**(12): p. 3403-10.
124. Gomez, M., Kioussis, D. and Cantrell, D.A., *The GTPase Rac-1 controls cell fate in the thymus by diverting thymocytes from positive to negative selection*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 703-13.
125. Croker, B.A., Tarlinton, D.M., Cluse, L.A., Tuxen, A.J., Light, A., Yang, F.C., Williams, D.A. and Roberts, A.W., *The Rac2 guanosine triphosphatase regulates B lymphocyte antigen receptor responses and chemotaxis and is required for establishment of B-1a and marginal zone B lymphocytes*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3376-86.
126. Walmsley, M.J., Ooi, S.K., Reynolds, L.F., Smith, S.H., Ruf, S., Mathiot, A., Vanes, L., Williams, D.A., Cancro, M.P. and Tybulewicz, V.L., *Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling*. Science, 2003. **302**(5644): p. 459-62.
127. Arana, E., Vehlow, A., Harwood, N.E., Vigorito, E., Henderson, R., Turner, M., Tybulewicz, V.L. and Batista, F.D., *Activation of the small GTPase Rac2 via the B cell receptor regulates B cell adhesion and immunological-synapse formation*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 88-99.
128. Vigorito, E., Bell, S., Hebeis, B.J., Reynolds, H., McAdam, S., Emson, P.C., McKenzie, A. and Turner, M., *Immunological function in mice lacking the Rac-related GTPase RhoG*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(2): p. 719-29.
129. Hakem, A., Sanchez-Sweetman, O., You-Ten, A., Duncan, G., Wakeham, A., Khokha, R. and Mak, T.W., *RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis*. Genes Dev, 2005. **19**(17): p. 1974-9.
130. Saci, A. and Carpenter, C.L., *RhoA GTPase regulates B cell receptor signaling*. Mol Cell, 2005. **17**(2): p. 205-14.
131. Gulbranson-Judge, A., Tybulewicz, V.L., Walters, A.E., Toellner, K.M., MacLennan, I.C. and Turner, M., *Defective immunoglobulin class switching in Vav-deficient mice is attributable to compromised T cell help*. Eur J Immunol, 1999. **29**(2): p. 477-87.
132. Doody, G.M., Bell, S.E., Vigorito, E., Clayton, E., McAdam, S., Tooze, R., Fernandez, C., Lee, I.J. and Turner, M., *Signal transduction through Vav-2 participates in humoral immune responses and B cell maturation*. Nat Immunol, 2001. **2**(6): p. 542-7.
133. Tedford, K., Nitschke, L., Girkontaite, I., Charlesworth, A., Chan, G., Sakk, V., Barbacid, M. and Fischer, K.D., *Compensation between Vav-1 and Vav-2 in B cell development and antigen receptor signaling*. Nat Immunol, 2001. **2**(6): p. 548-55.
134. Fujikawa, K., Miletic, A.V., Alt, F.W., Faccio, R., Brown, T., Hoog, J., Fredericks, J., Nishi, S., Mildiner, S., Moores, S.L., Brugge, J., Rosen, F.S. and Swat, W., *Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells*. J Exp Med, 2003. **198**(10): p. 1595-608.
135. Gomez, M., Tybulewicz, V. and Cantrell, D.A., *Control of pre-T cell proliferation and differentiation by the GTPase Rac-1*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 348-52.
136. Corre, I., Gomez, M., Vielkind, S. and Cantrell, D.A., *Analysis of thymocyte development reveals that the GTPase RhoA is a positive regulator of T cell receptor responses in vivo*. J Exp Med, 2001. **194**(7): p. 903-14.
137. Li, B., Yu, H., Zheng, W., Voll, R., Na, S., Roberts, A.W., Williams, D.A., Davis, R.J., Ghosh, S. and Flavell, R.A., *Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation*. Science, 2000. **288**(5474): p. 2219-22.

138. Lores, L. and Sampablo, I., [Indications for using the advance mandibular prosthesis for treating obstructive sleep apnea syndrome]. *Arch Bronconeumol*, 2001. **37**(2): p. 100-1.
139. Vielkind, S., Gallagher-Gambarelli, M., Gomez, M., Hinton, H.J. and Cantrell, D.A., *Integrin regulation by RhoA in thymocytes*. *J Immunol*, 2005. **175**(1): p. 350-7.
140. Yu, H., Leitenberg, D., Li, B. and Flavell, R.A., *Deficiency of small GTPase Rac2 affects T cell activation*. *J Exp Med*, 2001. **194**(7): p. 915-26.
141. Croker, B.A., Handman, E., Hayball, J.D., Baldwin, T.M., Voigt, V., Cluse, L.A., Yang, F.C., Williams, D.A. and Roberts, A.W., *Rac2-deficient mice display perturbed T-cell distribution and chemotaxis, but only minor abnormalities in T(H)1 responses*. *Immunol Cell Biol*, 2002. **80**(3): p. 231-40.
142. Korn, T., Fischer, K.D., Girkontaite, I., Kollner, G., Toyka, K. and Jung, S., *Vav1-deficient mice are resistant to MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis due to impaired antigen priming*. *J Neuroimmunol*, 2003. **139**(1-2): p. 17-26.
143. Tanaka, Y., So, T., Lebedeva, S., Croft, M. and Altman, A., *Impaired IL-4 and c-Maf expression and enhanced Th1-cell development in Vav1-deficient mice*. *Blood*, 2005. **106**(4): p. 1286-95.
144. Fischer, K.D., Zmuldzinas, A., Gardner, S., Barbacid, M., Bernstein, A. and Guidos, C., *Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+ CD8+ thymocytes*. *Nature*, 1995. **374**(6521): p. 474-7.
145. Tarakhovsky, A., Turner, M., Schaal, S., Mee, P.J., Duddy, L.P., Rajewsky, K. and Tybulewicz, V.L., *Defective antigen receptor-mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav*. *Nature*, 1995. **374**(6521): p. 467-70.
146. Zhang, R., Alt, F.W., Davidson, L., Orkin, S.H. and Swat, W., *Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the vav proto-oncogene*. *Nature*, 1995. **374**(6521): p. 470-3.
147. Turner, M., Mee, P.J., Walters, A.E., Quinn, M.E., Mellor, A.L., Zamoyska, R. and Tybulewicz, V.L., *A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes*. *Immunity*, 1997. **7**(4): p. 451-60.
148. Fischer, K.D., Kong, Y.Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengere, L.E., Koziaradzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., Nghiem, M.P., Bouchard, D., Barbacid, M., Bernstein, A. and Penninger, J.M., *Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor*. *Curr Biol*, 1998. **8**(10): p. 554-62.
149. Krawczyk, C., Oliveira-dos-Santos, A., Sasaki, T., Griffiths, E., Ohashi, P.S., Snapper, S., Alt, F. and Penninger, J.M., *Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells*. *Immunity*, 2002. **16**(3): p. 331-43.
150. Ardouin, L., Bracke, M., Mathiot, A., Pagakis, S.N., Norton, T., Hogg, N. and Tybulewicz, V.L., *Vav1 transduces TCR signals required for LFA-1 function and cell polarization at the immunological synapse*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(3): p. 790-7.
151. Dallery, E., Galiegue-Zouitina, S., Collyn-d'Hooghe, M., Quief, S., Denis, C., Hildebrand, M.P., Lantoine, D., Deweindt, C., Tilly, H., Bastard, C. and et al., *TTF, a gene encoding a novel small G protein, fuses to the lymphoma-associated LAZ3 gene by t(3;4) chromosomal translocation*. *Oncogene*, 1995. **10**(11): p. 2171-8.
152. Preudhomme, C., Roumier, C., Hildebrand, M.P., Dallery-Prudhomme, E., Lantoine, D., Lai, J.L., Daudignon, A., Adenis, C., Bauters, F., Fenaux, P., Kerckaert, J.P. and Galiegue-Zouitina, S., *Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma*. *Oncogene*, 2000. **19**(16): p. 2023-32.
153. Dent, A.L., Shaffer, A.L., Yu, X., Allman, D. and Staudt, L.M., *Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6*. *Science*, 1997. **276**(5312): p. 589-92.
154. Ye, B.H., Cattoretti, G., Shen, Q., Zhang, J., Hawe, N., de Waard, R., Leung, C., Nouri-Shirazi, M., Orazi, A., Chaganti, R.S., Rothman, P., Stall, A.M., Pandolfi, P.P. and Dalla-Favera, R., *The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation*. *Nat Genet*, 1997. **16**(2): p. 161-70.

155. Ye, B.H., *BCL-6 in the pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma*. Cancer Invest, 2000. **18**(4): p. 356-65.
156. Dent, A.L., Vasanwala, F.H. and Toney, L.M., *Regulation of gene expression by the proto-oncogene BCL-6*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **41**(1): p. 1-9.
157. Bernardin, F., Collyn-d'Hooghe, M., Quief, S., Bastard, C., Leprince, D. and Kerckaert, J.P., *Small deletions occur in highly conserved regions of the LAZ3/BCL6 major translocation cluster in one case of non-Hodgkin's lymphoma without 3q27 translocation*. Oncogene, 1997. **14**(7): p. 849-55.
158. Pasqualucci, L., Migliazza, A., Basso, K., Houldsworth, J., Chaganti, R.S. and Dalla-Favera, R., *Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma*. Blood, 2003. **101**(8): p. 2914-23.
159. Dallery-Prudhomme, E., Roumier, C., Denis, C., Preudhomme, C., Kerckaert, J.P. and Galiegue-Zouitina, S., *Genomic structure and assignment of the RhoH/TTF small GTPase gene (ARHH) to 4p13 by in situ hybridization*. Genomics, 1997. **43**(1): p. 89-94.
160. Rego, E.M. and Pandolfi, P.P., *Reciprocal products of chromosomal translocations in human cancer pathogenesis: key players or innocent bystanders?* Trends Mol Med, 2002. **8**(8): p. 396-405.
161. Borkhardt, A., Bojesen, S., Haas, O.A., Fuchs, U., Bartelheimer, D., Loncarevic, I.F., Bohle, R.M., Harbott, J., Repp, R., Jaeger, U., Viehmann, S., Henn, T., Korth, P., Scharr, D. and Lampert, F., *The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5;11)(q31;q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 9168-73.
162. Kourlas, P.J., Strout, M.P., Becknell, B., Veronese, M.L., Croce, C.M., Theil, K.S., Krahe, R., Ruutu, T., Knuutila, S., Bloomfield, C.D. and Caligiuri, M.A., *Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(5): p. 2145-50.
163. Kalla, C., Nentwich, H., Schlotter, M., Mertens, D., Wildenberger, K., Dohner, H., Stilgenbauer, S. and Lichter, P., *Translocation t(X;11)(q13;q23) in B-cell chronic lymphocytic leukemia disrupts two novel genes*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. **42**(2): p. 128-43.
164. Courjal, F., Chuchana, P., Theillet, C. and Fort, P., *Structure and chromosomal assignment to 22q12 and 17qter of the ras-related Rac2 and Rac3 human genes*. Genomics, 1997. **44**(2): p. 242-6.
165. Rivero, F., Dislich, H., Glockner, G. and Noegel, A.A., *The Dictyostelium discoideum family of Rho-related proteins*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(5): p. 1068-79.
166. Boureux, A., Vignal, E., Faure, S. and Fort, P., *Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(1): p. 203-16.
167. Le Gallic, L. and Fort, P., *Structure of the human ARHG locus encoding the Rho/Rac-like RhoG GTPase*. Genomics, 1997. **42**(1): p. 157-60.
168. Tolmachova, T., Ramalho, J.S., Anant, J.S., Schultz, R.A., Huxley, C.M. and Seabra, M.C., *Cloning, mapping and characterization of the human RAB27A gene*. Gene, 1999. **239**(1): p. 109-16.
169. Kozak, M., *An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(20): p. 8125-48.
170. Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. and Pesole, G., *Untranslated regions of mRNAs*. Genome Biol, 2002. **3**(3): p. REVIEWS0004.
171. Roberts, P.J., Mitin, N., Keller, P.J., Chenette, E.J., Madigan, J.P., Currin, R.O., Cox, A.D., Wilson, O., Kirschmeier, P. and Der, C.J., *Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification*. J Biol Chem, 2008. **283**(37): p. 25150-63.
172. Dallery-Prudhomme, E., *Clonage et caractérisation du gène RHOH/TTF, impliqué dans des translocations chromosomiques récurrentes dans les lymphomes non-Hodgkiniens. Etude préliminaire de la protéine RhoH, une petite GTPase*. Université des Sciences et

- Technologies de Lille Flandres-Artois, 1999. **Thèse de l'Université de Lille - Sciences de la Vie et de la Santé.**
173. Gu, Y., Chae, H.D., Siefiring, J.E., Jasti, A.C., Hildeman, D.A. and Williams, D.A., *RhoH GTPase recruits and activates Zap70 required for T cell receptor signaling and thymocyte development.* Nat Immunol, 2006. **7**(11): p. 1182-90.
 174. Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T. and Snyderman, R., *rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates.* J Biol Chem, 1989. **264**(28): p. 16378-82.
 175. Nishihara, H., Maeda, M., Tsuda, M., Makino, Y., Sawa, H., Nagashima, K. and Tanaka, S., *DOCK2 mediates T cell receptor-induced activation of Rac2 and IL-2 transcription.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(3): p. 716-20.
 176. Gu, Y., Jasti, A.C., Jansen, M. and Siefiring, J.E., *RhoH, a hematopoietic-specific Rho GTPase, regulates proliferation, survival, migration, and engraftment of hematopoietic progenitor cells.* Blood, 2005. **105**(4): p. 1467-75.
 177. Dorn, T., Kuhn, U., Bungartz, G., Stiller, S., Bauer, M., Ellwart, J., Peters, T., Scharffetter-Kochanek, K., Semmrich, M., Laschinger, M., Holzmann, B., Klinkert, W.E., Straten, P.T., Kollgaard, T., Sixt, M. and Brakebusch, C., *RhoH is important for positive thymocyte selection and T-cell receptor signaling.* Blood, 2007. **109**(6): p. 2346-55.
 178. Chae, H.D., Lee, K.E., Williams, D.A. and Gu, Y., *Cross-talk between RhoH and Rac1 in regulation of actin cytoskeleton and chemotaxis of hematopoietic progenitor cells.* Blood, 2008. **111**(5): p. 2597-605.
 179. Wu, X. and Frost, J.A., *Multiple Rho proteins regulate the subcellular targeting of PAK5.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(2): p. 328-35.
 180. Wang, H., Zeng, X., Fan, Z. and Lim, B., *RhoH plays distinct roles in T-cell migrations induced by different doses of SDF1 alpha.* Cell Signal, 2010. **22**(7): p. 1022-32.
 181. Dahinden, C.A., Zingg, J., Maly, F.E. and de Weck, A.L., *Leukotriene production in human neutrophils primed by recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and stimulated with the complement component C5A and FMLP as second signals.* J Exp Med, 1988. **167**(4): p. 1281-95.
 182. Daryadel, A., Yousefi, S., Troi, D., Schmid, I., Schmidt-Mende, J., Mordasini, C., Dahinden, C.A., Ziemiecki, A. and Simon, H.U., *RhoH/TTF negatively regulates leukotriene production in neutrophils.* J Immunol, 2009. **182**(10): p. 6527-32.
 183. Serhan, C.N. and Prescott, S.M., *The scent of a phagocyte: Advances on leukotriene b(4) receptors.* J Exp Med, 2000. **192**(3): p. F5-8.
 184. Wedemeyer, J., Tsai, M. and Galli, S.J., *Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity.* Curr Opin Immunol, 2000. **12**(6): p. 624-31.
 185. Bischoff, S.C., *Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 93-104.
 186. Garman, S.C., Kinet, J.P. and Jardetzky, T.S., *The crystal structure of the human high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI alpha).* Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 973-6.
 187. Kinet, J.P., *The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology.* Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 931-72.
 188. Gilfillan, A.M. and Tkaczyk, C., *Integrated signalling pathways for mast-cell activation.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 218-30.
 189. Kraft, S. and Kinet, J.P., *New developments in Fc epsilon RI regulation, function and inhibition.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 365-78.
 190. Costello, P.S., Turner, M., Walters, A.E., Cunningham, C.N., Bauer, P.H., Downward, J. and Tybulewicz, V.L., *Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells.* Oncogene, 1996. **13**(12): p. 2595-605.
 191. Paravicini, T.M., Gulluyan, L.M., Dusting, G.J. and Drummond, G.R., *Increased NADPH oxidase activity, gp91phox expression, and endothelium-dependent vasorelaxation during neointima formation in rabbits.* Circ Res, 2002. **91**(1): p. 54-61.

192. Siraganian, R.P., Zhang, J., Suzuki, K. and Sada, K., *Protein tyrosine kinase Syk in mast cell signaling*. Mol Immunol, 2002. **38**(16-18): p. 1229-33.
193. Oda, H., Fujimoto, M., Patrick, M.S., Chida, D., Sato, Y., Azuma, Y., Aoki, H., Abe, T., Suzuki, H. and Shirai, M., *RhoH plays critical roles in Fc epsilon RI-dependent signal transduction in mast cells*. J Immunol, 2009. **182**(2): p. 957-62.
194. Robak, T. and Wierzbowska, A., *Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia*. Clin Ther, 2009. **31 Pt 2**: p. 2349-70.
195. Estey, E. and Dohner, H., *Acute myeloid leukaemia*. Lancet, 2006. **368**(9550): p. 1894-907.
196. Deschler, B. and Lubbert, M., *Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology*. Cancer, 2006. **107**(9): p. 2099-107.
197. Aquino, V.M., *Acute myelogenous leukemia*. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care, 2002. **32**(2): p. 50-8.
198. Laubach, J. and Rao, A.V., *Current and emerging strategies for the management of acute myeloid leukemia in the elderly*. Oncologist, 2008. **13**(10): p. 1097-108.
199. Iwasaki, T., Katsumi, A., Kiyoi, H., Tanizaki, R., Ishikawa, Y., Ozeki, K., Kobayashi, M., Abe, A., Matsushita, T., Watanabe, T., Amano, M., Kojima, T., Kaibuchi, K. and Naoe, T., *Prognostic implication and biological roles of RhoH in acute myeloid leukaemia*. Eur J Haematol, 2008. **81**(6): p. 454-60.
200. Gundogdu, M.S., Liu, H., Metzdorf, D., Hildebrand, D., Aigner, M., Aktories, K., Heeg, K. and Kubatzky, K.F., *The haematopoietic GTPase RhoH modulates IL3 signalling through regulation of STAT activity and IL3 receptor expression*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 225.
201. Matsumoto, M., Oyamada, K., Takahashi, H., Sato, T., Hatakeyama, S. and Nakayama, K.I., *Large-scale proteomic analysis of tyrosine-phosphorylation induced by T-cell receptor or B-cell receptor activation reveals new signaling pathways*. Proteomics, 2009. **9**(13): p. 3549-63.
202. Tadmori, W., Feingersh, D., Clark, S.C. and Choi, Y.S., *Human recombinant IL-3 stimulates B cell differentiation*. J Immunol, 1989. **142**(6): p. 1950-5.
203. Kuppers, R., Klein, U., Hansmann, M.L. and Rajewsky, K., *Cellular origin of human B-cell lymphomas*. N Engl J Med, 1999. **341**(20): p. 1520-9.
204. Kuppers, R., Goossens, T. and Klein, U., *The role of somatic hypermutation in the generation of deletions and duplications in human Ig V region genes and chromosomal translocations*. Curr Top Microbiol Immunol, 1999. **246**: p. 193-8.
205. Mao, Z., Quintanilla-Martinez, L., Raffeld, M., Richter, M., Krugmann, J., Burek, C., Hartmann, E., Rudiger, T., Jaffe, E.S., Muller-Hermelink, H.K., Ott, G., Fend, F. and Rosenwald, A., *IgVH mutational status and clonality analysis of Richter's transformation: diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma in association with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) represent 2 different pathways of disease evolution*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(10): p. 1605-14.
206. Gagyí, E., Balogh, Z., Bodor, C., Timar, B., Reiniger, L., Deak, L., Csomor, J., Csernus, B., Szepesi, A. and Matolcsy, A., *Somatic hypermutation of IGVH genes and aberrant somatic hypermutation in follicular lymphoma without BCL-2 gene rearrangement and expression*. Haematologica, 2008. **93**(12): p. 1822-8.
207. Halldorsdottir, A.M., Fruhwirth, M., Deutsch, A., Aigelsreiter, A., Beham-Schmid, C., Agnarsson, B.A., Neumeister, P. and Richard Burack, W., *Quantifying the role of aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma*. Leuk Res, 2008. **32**(7): p. 1015-21.
208. Deutsch, A.J., Fruhwirth, M., Aigelsreiter, A., Cerroni, L. and Neumeister, P., *Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphomas are targeted by aberrant somatic hypermutation*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(2): p. 476-9.
209. Traverse-Glehen, A., Verney, A., Baseggio, L., Felman, P., Callet-Bauchu, E., Thieblemont, C., Ffrench, M., Magaud, J.P., Coiffier, B., Berger, F. and Salles, G., *Analysis of BCL-6, CD95, PIM1, RHO/TTF and PAX5 mutations in splenic and nodal marginal zone B-cell lymphomas suggests a particular B-cell origin*. Leukemia, 2007. **21**(8): p. 1821-4.

210. Bernicot, I., Morel, F., Le Bris, M.J., Bail, J.P., Douet-Guilbert, N. and De Braekeleer, M., *Rearrangement of the RHOH gene in a case of splenic lymphoma with villous lymphocytes*. Cancer Genet Cytogenet, 2006. **170**(1): p. 78-9.
211. Bodor, C., Bogнар, A., Reiniger, L., Szepesi, A., Toth, E., Kopper, L. and Matolcsy, A., *Aberrant somatic hypermutation and expression of activation-induced cytidine deaminase mRNA in mediastinal large B-cell lymphoma*. Br J Haematol, 2005. **129**(3): p. 373-6.
212. Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H. and Schatz, D.G., *Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation*. Nature, 2008. **451**(7180): p. 841-5.
213. Takakuwa, T., Miyauchi, A. and Aozasa, K., *Aberrant somatic hypermutations in thyroid lymphomas*. Leuk Res, 2009. **33**(5): p. 649-54.
214. Montesinos-Rongen, M., Siebert, R. and Deckert, M., *Primary lymphoma of the central nervous system: just DLBCL or not?* Blood, 2009. **113**(1): p. 7-10.
215. Dijkman, R., Tensen, C.P., Buettner, M., Niedobitek, G., Willemze, R. and Vermeer, M.H., *Primary cutaneous follicle center lymphoma and primary cutaneous large B-cell lymphoma, leg type, are both targeted by aberrant somatic hypermutation but demonstrate differential expression of AID*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4926-9.
216. Rossi, D., Berra, E., Cerri, M., Deambrogi, C., Barbieri, C., Franceschetti, S., Lunghi, M., Conconi, A., Paulli, M., Matolcsy, A., Pasqualucci, L., Capello, D. and Gaidano, G., *Aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma*. Haematologica, 2006. **91**(10): p. 1405-9.
217. Reiniger, L., Bodor, C., Bogнар, A., Balogh, Z., Csomor, J., Szepesi, A., Kopper, L. and Matolcsy, A., *Richter's and prolymphocytic transformation of chronic lymphocytic leukemia are associated with high mRNA expression of activation-induced cytidine deaminase and aberrant somatic hypermutation*. Leukemia, 2006. **20**(6): p. 1089-95.
218. Liso, A., Capello, D., Marafioti, T., Tiacci, E., Cerri, M., Distler, V., Paulli, M., Carbone, A., Delsol, G., Campo, E., Pileri, S., Pasqualucci, L., Gaidano, G. and Falini, B., *Aberrant somatic hypermutation in tumor cells of nodular-lymphocyte-predominant and classic Hodgkin lymphoma*. Blood, 2006. **108**(3): p. 1013-20.
219. Hiraga, J., Katsumi, A., Iwasaki, T., Abe, A., Kiyoi, H., Matsushita, T., Kinoshita, T. and Naoe, T., *Prognostic analysis of aberrant somatic hypermutation of RhoH gene in diffuse large B cell lymphoma*. Leukemia, 2007. **21**(8): p. 1846-7.
220. Daudignon, A., Bisiau, H., Le Baron, F., Lai, J.L., Wetterwald, M., Galiegue-Zouitina, S., Morel, P. and Duthilleul, P., *Four cases of follicular lymphoma with t(14;18)(q32;q21) and t(3;4)(q27;p13) with LAZ3 (BCL6) rearrangement*. Cancer Genet Cytogenet, 1999. **111**(2): p. 157-60.
221. Aamot, H.V., Micci, F., Holte, H., Delabie, J. and Heim, S., *G-banding and molecular cytogenetic analyses of marginal zone lymphoma*. Br J Haematol, 2005. **130**(6): p. 890-901.
222. Allsup, D.J. and Cawley, J.C., *The diagnosis and treatment of hairy-cell leukaemia*. Blood Rev, 2002. **16**(4): p. 255-62.
223. Galiegue-Zouitina, S., Delestre, L., Dupont, C., Troussard, X. and Shelley, C.S., *Underexpression of RhoH in Hairy Cell Leukemia*. Cancer Res, 2008. **68**(12): p. 4531-40.
224. Chiorazzi, N., Rai, K.R. and Ferrarini, M., *Chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 804-15.
225. Rai, K.R. and Chiorazzi, N., *Determining the clinical course and outcome in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2003. **348**(18): p. 1797-9.
226. Sanchez-Aguilera, A., Rattmann, I., Drew, D.Z., Muller, L.U., Summey, V., Lucas, D.M., Byrd, J.C., Croce, C.M., Gu, Y., Cancelas, J.A., Johnston, P., Moritz, T. and Williams, D.A., *Involvement of RhoH GTPase in the development of B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2010. **24**(1): p. 97-104.
227. Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marce, S., Lopez-Guillermo, A., Campo, E. andMontserrat, E., *ZAP-70 expression as a surrogate for*

- immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia.* N Engl J Med, 2003. **348**(18): p. 1764-75.
228. Crespo, M., Villamor, N., Gine, E., Muntanola, A., Colomer, D., Marafioti, T., Jones, M., Camos, M., Campo, E., Montserrat, E. and Bosch, F., *ZAP-70 expression in normal pro/pre B cells, mature B cells, and in B-cell acute lymphoblastic leukemia.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(3 Pt 1): p. 726-34.
229. Rassenti, L.Z., Jain, S., Keating, M.J., Wierda, W.G., Grever, M.R., Byrd, J.C., Kay, N.E., Brown, J.R., Gribben, J.G., Neuberg, D.S., He, F., Greaves, A.W., Rai, K.R. and Kipps, T.J., *Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2008. **112**(5): p. 1923-30.
230. Herling, M., Patel, K.A., Weit, N., Lillenthal, N., Hallek, M., Keating, M.J. and Jones, D., *High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2009. **114**(21): p. 4675-86.
231. Chen, L., Widhopf, G., Huynh, L., Rassenti, L., Rai, K.R., Weiss, A. and Kipps, T.J., *Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2002. **100**(13): p. 4609-14.
232. Yan, X.J., Albesiano, E., Zanasi, N., Yancopoulos, S., Sawyer, A., Romano, E., Petlickovski, A., Efremov, D.G., Croce, C.M. and Chiorazzi, N., *B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(31): p. 11713-8.
233. Albesiano, E., Messmer, B.T., Damle, R.N., Allen, S.L., Rai, K.R. and Chiorazzi, N., *Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone.* Blood, 2003. **102**(9): p. 3333-9.
234. Mustelin, T. and Tasken, K., *Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases.* Biochem J, 2003. **371**(Pt 1): p. 15-27.
235. Kane, L.P., Lin, J. and Weiss, A., *Signal transduction by the TCR for antigen.* Curr Opin Immunol, 2000. **12**(3): p. 242-9.
236. Zhang, W., Sloan-Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R.P. and Samelson, L.E., *LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation.* Cell, 1998. **92**(1): p. 83-92.
237. Rincon, M., *MAP-kinase signaling pathways in T cells.* Curr Opin Immunol, 2001. **13**(3): p. 339-45.
238. Isakov, N., Wange, R.L. and Samelson, L.E., *The role of tyrosine kinases and phosphotyrosine-containing recognition motifs in regulation of the T cell-antigen receptor-mediated signal transduction pathway.* J Leukoc Biol, 1994. **55**(2): p. 265-71.
239. Penna, D., Muller, S., Martinon, F., Demotz, S., Iwashima, M. and Valitutti, S., *Degradation of ZAP-70 following antigenic stimulation in human T lymphocytes: role of calpain proteolytic pathway.* J Immunol, 1999. **163**(1): p. 50-6.
240. Valitutti, S., Muller, S., Salio, M. and Lanzavecchia, A., *Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation.* J Exp Med, 1997. **185**(10): p. 1859-64.
241. Ouchida, R., Yamasaki, S., Hikida, M., Masuda, K., Kawamura, K., Wada, A., Mochizuki, S., Tagawa, M., Sakamoto, A., Hatano, M., Tokuhisa, T., Koseki, H., Saito, T., Kurosaki, T. and Wang, J.Y., *A lysosomal protein negatively regulates surface T cell antigen receptor expression by promoting CD3zeta-chain degradation.* Immunity, 2008. **29**(1): p. 33-43.
242. Cherry, L.K., Li, X., Schwab, P., Lim, B. and Klickstein, L.B., *RhoH is required to maintain the integrin LFA-1 in a nonadhesive state on lymphocytes.* Nat Immunol, 2004. **5**(9): p. 961-7.
243. Taylor, G.P. and Matsuoka, M., *Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy.* Oncogene, 2005. **24**(39): p. 6047-57.
244. Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K. and Uchino, H., *Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases.* Blood, 1977. **50**(3): p. 481-92.
245. Bazarbachi, A. and Hermine, O., *Treatment of adult T-cell leukaemia/lymphoma: current strategy and future perspectives.* Virus Res, 2001. **78**(1-2): p. 79-92.

246. Kawano, N., Ishikawa, F., Shimoda, K., Yasukawa, M., Nagafuji, K., Miyamoto, T., Baba, E., Tanaka, T., Yamasaki, S., Gondo, H., Otsuka, T., Ohshima, K., Shultz, L.D., Akashi, K. and Harada, M., *Efficient engraftment of primary adult T-cell leukemia cells in newborn NOD/SCID/beta2-microglobulin(null) mice*. *Leukemia*, 2005. **19**(8): p. 1384-90.
247. Schneider, U. and Schwenk, H.U., *Characterization of "T" and "non-T" cell lines established from children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma after leukemic transformation*. *Haematol Blood Transfus*, 1977. **20**: p. 265-9.
248. Yamada, Y., Nagata, Y., Kamihira, S., Tagawa, M., Ichimaru, M., Tomonaga, M. and Shiku, H., *IL-2-dependent ATL cell lines with phenotypes differing from the original leukemia cells*. *Leuk Res*, 1991. **15**(7): p. 619-25.
249. Hecht, J.L. and Aster, J.C., *Molecular biology of Burkitt's lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(21): p. 3707-21.
250. Robak, T., *Hairy-cell leukemia variant: Recent view on diagnosis, biology and treatment*. *Cancer Treat Rev*, 2010.
251. Chen, I.S., Quan, S.G. and Golde, D.W., *Human T-cell leukemia virus type II transforms normal human lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(22): p. 7006-9.
252. Scherer, W.F., Syverton, J.T. and Gey, G.O., *Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix*. *J Exp Med*, 1953. **97**(5): p. 695-710.
253. Hill, O., Kuhn, M., Zucht, H.D., Cetin, Y., Kulaksiz, H., Adermann, K., Klock, G., Rechkemmer, G., Forssmann, W.G. and Magert, H.J., *Analysis of the human guanylin gene and the processing and cellular localization of the peptide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(6): p. 2046-50.
254. Lee, D.H., Gershenzon, N., Gupta, M., Ioshikhes, I.P., Reinberg, D. and Lewis, B.A., *Functional characterization of core promoter elements: the downstream core element is recognized by TAF1*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(21): p. 9674-86.
255. Lim, C.Y., Santoso, B., Boulay, T., Dong, E., Ohler, U. and Kadonaga, J.T., *The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II*. *Genes Dev*, 2004. **18**(13): p. 1606-17.
256. Dal Porto, J.M., Gauld, S.B., Merrell, K.T., Mills, D., Pugh-Bernard, A.E. and Cambier, J., *B cell antigen receptor signaling 101*. *Mol Immunol*, 2004. **41**(6-7): p. 599-613.
257. Bossy-Wetzell, E., Bravo, R. and Hanahan, D., *Transcription factors junB and c-jun are selectively up-regulated and functionally implicated in fibrosarcoma development*. *Genes Dev*, 1992. **6**(12A): p. 2340-51.
258. Shaulian, E. and Karin, M., *AP-1 as a regulator of cell life and death*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(5): p. E131-6.
259. Wu, Y., Zhang, X. and Zehner, Z.E., *c-Jun and the dominant-negative mutant, TAM67, induce vimentin gene expression by interacting with the activator Sp1*. *Oncogene*, 2003. **22**(55): p. 8891-901.
260. Ray, S.K., Nishitani, J., Petry, M.W., Fessing, M.Y. and Leiter, A.B., *Novel transcriptional potentiation of BETA2/NeuroD on the secretin gene promoter by the DNA-binding protein Finb/RREB-1*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(1): p. 259-71.
261. Keller, U., Nilsson, J.A., Maclean, K.H., Old, J.B. and Cleveland, J.L., *Nfkb 1 is dispensable for Myc-induced lymphomagenesis*. *Oncogene*, 2005. **24**(41): p. 6231-40.
262. Nicolaou, F., Teodoridis, J.M., Park, H., Georgakis, A., Farokhzad, O.C., Bottinger, E.P., Da Silva, N., Rousselot, P., Chomienne, C., Ferenczi, K., Arnaout, M.A. and Shelley, C.S., *CD11c gene expression in hairy cell leukemia is dependent upon activation of the proto-oncogenes ras and junD*. *Blood*, 2003. **101**(10): p. 4033-41.
263. Tanaka, Y., Mine, S., Figdor, C.G., Wake, A., Hirano, H., Tsukada, J., Aso, M., Fujii, K., Saito, K., van Kooyk, Y. and Eto, S., *Constitutive chemokine production results in activation of leukocyte function-associated antigen-1 on adult T-cell leukemia cells*. *Blood*, 1998. **91**(10): p. 3909-19.

264. Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. and Dustin, M.L., *The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation*. Science, 1999. **285**(5425): p. 221-7.
265. Yokosuka, T. and Saito, T., *Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 27-40.
266. Fooksman, D.R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D.A., Waite, J., Sacristan, C., Victora, G.D., Zanin-Zhorov, A. and Dustin, M.L., *Functional anatomy of T cell activation and synapse formation*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 79-105.
267. Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A. and Murphy, K.M., *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. Science, 1993. **260**(5107): p. 547-9.
268. Noben-Trauth, N., Hu-Li, J. and Paul, W.E., *IL-4 secreted from individual naive CD4+ T cells acts in an autocrine manner to induce Th2 differentiation*. Eur J Immunol, 2002. **32**(5): p. 1428-33.
269. Acuto, O. and Michel, F., *CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 939-51.
270. Sieber, M. and Baumgrass, R., *Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506?* Cell Commun Signal, 2009. **7**: p. 25.
271. Kiebal, M., Poleskaya, O., Yao, Z., Perry, S.W. and Maggirwar, S.B., *Nuclear factor-kappa B family member RelB inhibits human immunodeficiency virus-1 Tat-induced tumor necrosis factor-alpha production*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11875.
272. Burda, P., Curik, N., Kokavec, J., Basova, P., Mikulenkova, D., Skoultchi, A.I., Zavadil, J. and Stopka, T., *PU.1 activation relieves GATA-1-mediated repression of Cebpa and Cbfb during leukemia differentiation*. Mol Cancer Res, 2009. **7**(10): p. 1693-703.
273. Pei, D.Q. and Shih, C.H., *Transcriptional activation and repression by cellular DNA-binding protein C/EBP*. J Virol, 1990. **64**(4): p. 1517-22.
274. Yamashita, N., Tashimo, H., Ishida, H., Matsuo, Y., Tamauchi, H., Terashima, M., Yoshiwara, I., Habu, S. and Ohta, K., *Involvement of GATA-3-dependent Th2 lymphocyte activation in airway hyperresponsiveness*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(6): p. L1045-51.
275. Harley, V.R., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N. and Hextall, P.J., *The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain*. FEBS Lett, 1996. **391**(1-2): p. 24-8.
276. Hedrick, J.A., Morse, K., Shan, L., Qiao, X., Pang, L., Wang, S., Laz, T., Gustafson, E.L., Bayne, M. and Monsma, F.J., Jr., *Identification of a human gastrointestinal tract and immune system receptor for the peptide neuromedin U*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(4): p. 870-5.
277. Johnson, E.N., Appelbaum, E.R., Carpenter, D.C., Cox, R.F., Disa, J., Foley, J.J., Ghosh, S.K., Naselsky, D.P., Pullen, M.A., Sarau, H.M., Scheff, S.R., Steplewski, K.M., Zaks-Zilberman, M. and Aiyar, N., *Neuromedin U elicits cytokine release in murine Th2-type T cell clone D10.G4.1*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7230-8.
278. Penzes, P., Cahill, M.E., Jones, K.A. and Srivastava, D.P., *Convergent CaMK and RacGEF signals control dendritic structure and function*. Trends Cell Biol, 2008. **18**(9): p. 405-13.
279. Liggins, A.P., Brown, P.J., Asker, K., Pulford, K. and Banham, A.H., *A novel diffuse large B-cell lymphoma-associated cancer testis antigen encoding a PAS domain protein*. Br J Cancer, 2004. **91**(1): p. 141-9.
280. Basso, K., Liso, A., Tiacci, E., Benedetti, R., Pulsoni, A., Foa, R., Di Raimondo, F., Ambrosetti, A., Califano, A., Klein, U., Dalla Favera, R. and Falini, B., *Gene expression profiling of hairy cell leukemia reveals a phenotype related to memory B cells with altered expression of chemokine and adhesion receptors*. J Exp Med, 2004. **199**(1): p. 59-68.
281. Mori, N., Fujii, M., Iwai, K., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Hata, T., Yamada, Y., Tanaka, Y., Tomonaga, M. and Yamamoto, N., *Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells*. Blood, 2000. **95**(12): p. 3915-21.

282. Yagi, T., Morimoto, A., Eguchi, M., Hibi, S., Sako, M., Ishii, E., Mizutani, S., Imashuku, S., Ohki, M. and Ichikawa, H., *Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis*. *Blood*, 2003. **102**(5): p. 1849-56.
283. Haslinger, C., Schweifer, N., Stilgenbauer, S., Dohner, H., Lichter, P., Kraut, N., Stratowa, C. and Abseher, R., *Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(19): p. 3937-49.
284. Ramos, S., Khademi, F., Somesh, B.P. and Rivero, F., *Genomic organization and expression profile of the small GTPases of the RhoBTB family in human and mouse*. *Gene*, 2002. **298**(2): p. 147-57.
285. Menasche, G., Menager, M.M., Lefebvre, J.M., Deutsch, E., Athman, R., Lambert, N., Mahlaoui, N., Court, M., Garin, J., Fischer, A. and de Saint Basile, G., *A newly identified isoform of Slp2a associates with Rab27a in cytotoxic T cells and participates to cytotoxic granule secretion*. *Blood*, 2008. **112**(13): p. 5052-62.
286. Figueiredo, A.C., Wasmeier, C., Tarafder, A.K., Ramalho, J.S., Baron, R.A. and Seabra, M.C., *Rab3GEP is the non-redundant guanine nucleotide exchange factor for Rab27a in melanocytes*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(34): p. 23209-16.
287. Hwang, E.S., Choi, A. and Ho, I.C., *Transcriptional regulation of GATA-3 by an intronic regulatory region and fetal liver zinc finger protein 1*. *J Immunol*, 2002. **169**(1): p. 248-53.
288. Bruhat, A., Tourmente, S., Chapel, S., Sobrier, M.L., Couderc, J.L. and Dastugue, B., *Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional regulation of the beta 3 tubulin gene by 20-hydroxyecdysone in Drosophila Kc cells*. *Nucleic Acids Res*, 1990. **18**(10): p. 2861-7.
289. Nobuyoshi, M., Lin, X.H., Takimoto, Y., Deuel, T.F. and Wang, Z.Y., *Transcription regulation of the PDGF A-chain gene by first intron elements*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **230**(3): p. 569-72.
290. Beri, S., Tonna, N., Menozzi, G., Bonaglia, M.C., Sala, C. and Giorda, R., *DNA methylation regulates tissue-specific expression of Shank3*. *J Neurochem*, 2007. **101**(5): p. 1380-91.
291. Shin, H.J., Park, H.Y., Jeong, S.J., Park, H.W., Kim, Y.K., Cho, S.H., Kim, Y.Y., Cho, M.L., Kim, H.Y., Min, K.U. and Lee, C.W., *STAT4 expression in human T cells is regulated by DNA methylation but not by promoter polymorphism*. *J Immunol*, 2005. **175**(11): p. 7143-50.
292. Lasa, M., Mahtani, K.R., Finch, A., Brewer, G., Saklatvala, J. and Clark, A.R., *Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(12): p. 4265-74.
293. Stoeckle, M.Y., *Post-transcriptional regulation of gro alpha, beta, gamma, and IL-8 mRNAs by IL-1 beta*. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(4): p. 917-20.
294. Holtmann, H., Winzen, R., Holland, P., Eickemeier, S., Hoffmann, E., Wallach, D., Malinin, N.L., Cooper, J.A., Resch, K. and Kracht, M., *Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(10): p. 6742-53.
295. Tebo, J., Der, S., Frevel, M., Khabar, K.S., Williams, B.R. and Hamilton, T.A., *Heterogeneity in control of mRNA stability by AU-rich elements*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(14): p. 12085-93.
296. Moscow, J.A., He, R., Gudas, J.M. and Cowan, K.H., *Utilization of multiple polyadenylation signals in the human RHOA protooncogene*. *Gene*, 1994. **144**(2): p. 229-36.
297. Lu, Z., Luo, R.Z., Peng, H., Rosen, D.G., Atkinson, E.N., Warneke, C., Huang, M., Nishimoto, A., Liu, J., Liao, W.S., Yu, Y. and Bast, R.C., Jr., *Transcriptional and posttranscriptional down-regulation of the imprinted tumor suppressor gene ARHI (DRAS3) in ovarian cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(8): p. 2404-13.
298. Kozak, R.W., Atcher, R.W., Gansow, O.A., Friedman, A.M., Hines, J.J. and Waldmann, T.A., *Bismuth-212-labeled anti-Tac monoclonal antibody: alpha-particle-emitting radionuclides as modalities for radioimmunotherapy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(2): p. 474-8.

299. Kozak, M., *Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(11): p. 5134-42.
300. Kozak, M., *Primer extension analysis of eukaryotic ribosome-mRNA complexes*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(21): p. 4853-9.
301. Kozak, M., *Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(21): p. 8301-5.
302. Oyama, M., Itagaki, C., Hata, H., Suzuki, Y., Izumi, T., Natsume, T., Isobe, T. and Sugano, S., *Analysis of small human proteins reveals the translation of upstream open reading frames of mRNAs*. Genome Res, 2004. **14**(10B): p. 2048-52.
303. Vilela, C. and McCarthy, J.E., *Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5'untranslated region*. Mol Microbiol, 2003. **49**(4): p. 859-67.
304. Matsui, M., Yachie, N., Okada, Y., Saito, R. and Tomita, M., *Bioinformatic analysis of post-transcriptional regulation by uORF in human and mouse*. FEBS Lett, 2007. **581**(22): p. 4184-8.
305. Combier, J.P., de Billy, F., Gamas, P., Niebel, A. and Rivas, S., *Trans-regulation of the expression of the transcription factor MtHAP2-1 by a uORF controls root nodule development*. Genes Dev, 2008. **22**(11): p. 1549-59.
306. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
307. Davidson, B., Goldberg, I., Berner, A., Nesland, J.M., Givant-Horwitz, V., Bryne, M., Risberg, B., Kristensen, G.B., Trope, C.G., Kopolovic, J. and Reich, R., *Expression of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases messenger RNA in ovarian carcinoma cells in serous effusions*. Am J Clin Pathol, 2001. **115**(4): p. 517-24.
308. Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E., *AP-1 function and regulation*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 240-6.
309. Wisdom, R., *AP-1: one switch for many signals*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 180-5.
310. Angel, P. and Karin, M., *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1072**(2-3): p. 129-57.
311. Persengiev, S.P. and Green, M.R., *The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis*. Apoptosis, 2003. **8**(3): p. 225-8.
312. Hai, T. and Hartman, M.G., *The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis*. Gene, 2001. **273**(1): p. 1-11.
313. Blank, V., *Small Maf proteins in mammalian gene control: mere dimerization partners or dynamic transcriptional regulators?* J Mol Biol, 2008. **376**(4): p. 913-25.
314. Chinenov, Y. and Kerppola, T.K., *Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity*. Oncogene, 2001. **20**(19): p. 2438-52.
315. Hayden, M.S. and Ghosh, S., *Shared principles in NF-kappaB signaling*. Cell, 2008. **132**(3): p. 344-62.
316. Grimm, S. and Baeuerle, P.A., *The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits*. Biochem J, 1993. **290** (Pt 2): p. 297-308.
317. Liou, H.C. and Baltimore, D., *Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system*. Curr Opin Cell Biol, 1993. **5**(3): p. 477-87.
318. Siebenlist, U., Franzoso, G. and Brown, K., *Structure, regulation and function of NF-kappa B*. Annu Rev Cell Biol, 1994. **10**: p. 405-55.
319. Thanos, D. and Maniatis, T., *NF-kappa B: a lesson in family values*. Cell, 1995. **80**(4): p. 529-32.
320. Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B., *IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(2): p. 72-9.
321. Jabbar, S.A., Hoffbrand, A.V. and Wickremasinghe, R.G., *Redox reagents and staurosporine inhibit stimulation of the transcription regulator NF-kappa B following tumour necrosis factor treatment of chronic B-leukaemia cells*. Leuk Res, 1994. **18**(7): p. 523-30.

322. Venkataraman, L., Francis, D.A., Wang, Z., Liu, J., Rothstein, T.L. and Sen, R., *Cyclosporin-A sensitive induction of NF-AT in murine B cells*. *Immunity*, 1994. **1**(3): p. 189-96.
323. Jabbar, S.A., Hoffbrand, A.V. and Wickremasinghe, R.G., *Defects in signal transduction pathways in chronic B lymphocytic leukemia cells*. *Leuk Lymphoma*, 1995. **18**(1-2): p. 163-70.
324. Sharma, H.W., Perez, J.R., Higgins-Sochaski, K., Hsiao, R. and Narayanan, R., *Transcription factor decoy approach to decipher the role of NF-kappa B in oncogenesis*. *Anticancer Res*, 1996. **16**(1): p. 61-9.
325. Yan, J. and Greer, J.M., *NF-kappa B, a potential therapeutic target for the treatment of multiple sclerosis*. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2008. **7**(6): p. 536-57.
326. Roman-Blas, J.A. and Jimenez, S.A., *NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006. **14**(9): p. 839-48.
327. Sethi, G., Ahn, K.S. and Aggarwal, B.B., *Targeting nuclear factor-kappa B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis*. *Mol Cancer Res*, 2008. **6**(6): p. 1059-70.
328. Mohamed, A., Afridi, D.M., Garani, O. and Tucci, M., *Thymoquinone inhibits the activation of NF-kappaB in the brain and spinal cord of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Biomed Sci Instrum*, 2005. **41**: p. 388-93.
329. Cammarano, M.S. and Minden, A., *Dbl and the Rho GTPases activate NF kappa B by I kappa B kinase (IKK)-dependent and IKK-independent pathways*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(28): p. 25876-82.
330. Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R. and Lacal, J.C., *Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins*. *Genes Dev*, 1997. **11**(4): p. 463-75.
331. Fruman, D.A., *Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling*. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(3): p. 314-20.
332. Kawamura, N., Tamura, H., Obana, S., Wenner, M., Ishikawa, T., Nakata, A. and Yamamoto, H., *Differential effects of neuropeptides on cytokine production by mouse helper T cell subsets*. *Neuroimmunomodulation*, 1998. **5**(1-2): p. 9-15.
333. Wang, F., Millet, I., Bottomly, K. and Vignery, A., *Calcitonin gene-related peptide inhibits interleukin 2 production by murine T lymphocytes*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(29): p. 21052-7.
334. Lee, M.S., Hanspers, K., Barker, C.S., Korn, A.P. and McCune, J.M., *Gene expression profiles during human CD4+ T cell differentiation*. *Int Immunol*, 2004. **16**(8): p. 1109-24.
335. Gutierrez, N.C., Lopez-Perez, R., Hernandez, J.M., Isidro, I., Gonzalez, B., Delgado, M., Ferminan, E., Garcia, J.L., Vazquez, L., Gonzalez, M. and San Miguel, J.F., *Gene expression profile reveals deregulation of genes with relevant functions in the different subclasses of acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2005. **19**(3): p. 402-9.
336. Falt, S., Merup, M., Gahrton, G., Lambert, B. and Wennborg, A., *Identification of progression markers in B-CLL by gene expression profiling*. *Exp Hematol*, 2005. **33**(8): p. 883-93.
337. Mischak, H., Kolch, W., Goodnight, J., Davidson, W.F., Rapp, U., Rose-John, S. and Mushinski, J.F., *Expression of protein kinase C genes in hemopoietic cells is cell-type- and B cell-differentiation stage specific*. *J Immunol*, 1991. **147**(11): p. 3981-7.
338. Nakagawa, R., Soh, J.W. and Michie, A.M., *Subversion of protein kinase C alpha signaling in hematopoietic progenitor cells results in the generation of a B-cell chronic lymphocytic leukemia-like population in vivo*. *Cancer Res*, 2006. **66**(1): p. 527-34.
339. Wilkinson, S.E. and Nixon, J.S., *T-cell signal transduction and the role of protein kinase C*. *Cell Mol Life Sci*, 1998. **54**(10): p. 1122-44.
340. Dieter, P. and Schwende, H., *Protein kinase C-alpha and -beta play antagonistic roles in the differentiation process of THP-1 cells*. *Cell Signal*, 2000. **12**(5): p. 297-302.
341. Kim, S.H., Chun, S.Y. and Kim, T.S., *Interferon-alpha enhances artemisinin-induced differentiation of HL-60 leukemia cells via a PKC alpha/ERK pathway*. *Eur J Pharmacol*, 2008. **587**(1-3): p. 65-72.

342. Gruber, T., Hermann-Kleiter, N., Pfeifhofer-Obermair, C., Lutz-Nicoladoni, C., Thuille, N., Letschka, T., Barsig, J., Baudler, M., Li, J., Metzler, B., Nusslein-Hildesheim, B., Wagner, J., Leitges, M. and Baier, G., *PKC theta cooperates with PKC alpha in alloimmune responses of T cells in vivo*. Mol Immunol, 2009. **46**(10): p. 2071-9.
343. Stefan Porubsky, S.W., Eva Kiss, Stefan Dehmel, Mahnaz Bonrouhi, Tatjana Dorn, Bruno Luckow, Cord Brakebusch and Hermann-Josef Gröne, *Rhoh deficiency reduces peripheral T-cell function and attenuates allogeneic transplant rejection*. EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 2010.
344. Park, J.W., Kwon, T.K., Kim, I.H., Sohn, S.S., Kim, Y.S., Kim, C.I., Bae, O.S., Lee, K.S., Lee, K.D., Lee, C.S., Chang, H.K., Choe, B.K., Ahn, S.Y. and Jeon, C.H., *A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers*. J Immunol Methods, 2002. **266**(1-2): p. 79-86.
345. Picard, V., Bergeron, A., Larue, H. and Fradet, Y., *MAGE-A9 mRNA and protein expression in bladder cancer*. Int J Cancer, 2007. **120**(10): p. 2170-7.
346. Kim, S.H., Castro, F., Gonzalez, D., Maciag, P.C., Paterson, Y. and Gravekamp, C., *Mage-b vaccine delivered by recombinant Listeria monocytogenes is highly effective against breast cancer metastases*. Br J Cancer, 2008. **99**(5): p. 741-9.
347. Shichijo, S., Tsunosue, R., Masuoka, K., Natori, H., Tamai, M., Miyajima, J., Sagawa, K. and Itoh, K., *Expression of the MAGE gene family in human lymphocytic leukemia*. Cancer Immunol Immunother, 1995. **41**(2): p. 90-103.
348. Eichmuller, S., Usener, D., Thiel, D. and Schadendorf, D., *Tumor-specific antigens in cutaneous T-cell lymphoma: expression and sero-reactivity*. Int J Cancer, 2003. **104**(4): p. 482-7.
349. Liggins, A.P., Guinn, B.A., Hatton, C.S., Pulford, K. and Banham, A.H., *Serologic detection of diffuse large B-cell lymphoma-associated antigens*. Int J Cancer, 2004. **110**(4): p. 563-9.
350. Guinn, B.A., Gilkes, A.F., Woodward, E., Westwood, N.B., Mufti, G.J., Linch, D., Burnett, A.K. and Mills, K.I., *Microarray analysis of tumour antigen expression in presentation acute myeloid leukaemia*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**(3): p. 703-13.
351. Guinn, B.A., Bland, E.A., Lodi, U., Liggins, A.P., Tobal, K., Petters, S., Wells, J.W., Banham, A.H. and Mufti, G.J., *Humoral detection of leukaemia-associated antigens in presentation acute myeloid leukaemia*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **335**(4): p. 1293-304.
352. Cooper, C.D., Liggins, A.P., Ait-Tahar, K., Roncador, G., Banham, A.H. and Pulford, K., *PASD1, a DLBCL-associated cancer testis antigen and candidate for lymphoma immunotherapy*. Leukemia, 2006. **20**(12): p. 2172-4.
353. Sahota, S.S., Goonewardena, C.M., Cooper, C.D., Liggins, A.P., Ait-Tahar, K., Zojer, N., Stevenson, F.K., Banham, A.H. and Pulford, K., *PASD1 is a potential multiple myeloma-associated antigen*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3953-5.
354. Makri, M., *PASD1 : a Novel Tumor Specific Antigen*. Biological Therapeutics, 2010.
355. Sosinowski, T., Killeen, N. and Weiss, A., *The Src-like adaptor protein downregulates the T cell receptor on CD4+CD8+ thymocytes and regulates positive selection*. Immunity, 2001. **15**(3): p. 457-66.
356. Myers, M.D., Dragone, L.L. and Weiss, A., *Src-like adaptor protein down-regulates T cell receptor (TCR)-CD3 expression by targeting TCRzeta for degradation*. J Cell Biol, 2005. **170**(2): p. 285-94.
357. Center, D.M., Kornfeld, H. and Cruikshank, W.W., *Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand*. Immunol Today, 1996. **17**(10): p. 476-81.
358. Kaser, A., Dunzendorfer, S., Offner, F.A., Ryan, T., Schwabegger, A., Cruikshank, W.W., Wiedermann, C.J. and Tilg, H., *A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells*. J Immunol, 1999. **163**(6): p. 3232-8.
359. Cruikshank, W.W., Berman, J.S., Theodore, A.C., Bernardo, J. and Center, D.M., *Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes*. J Immunol, 1987. **138**(11): p. 3817-23.
360. Parada, N.A., Center, D.M., Kornfeld, H., Rodriguez, W.L., Cook, J., Vallen, M. and Cruikshank, W.W., *Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2*. J Immunol, 1998. **160**(5): p. 2115-20.

361. Migeotte, I., Franssen, J.D., Goriely, S., Willems, F. and Parmentier, M., *Distribution and regulation of expression of the putative human chemokine receptor HCR in leukocyte populations*. Eur J Immunol, 2002. **32**(2): p. 494-501.
362. Yoshimura, T. and Oppenheim, J.J., *Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2); Two multifunctional receptors with unusual properties*. Exp Cell Res, 2010.
363. Farinea, A.R., Davis-Smyth, T., Gardner, K. and Levens, D., *An Early Response of an AP1-JunD Complex during T-cell Activation*. The Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(35): p. 26466-26475.
364. Cano, E. and Mahadevan, L.C., *Parallel signal processing among mammalian MAPKs*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(3): p. 117-22.
365. Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. and Gutkind, J.S., *The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway*. Cell, 1995. **81**(7): p. 1137-46.
366. Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A. and Karin, M., *Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs*. Cell, 1995. **81**(7): p. 1147-57.
367. Sassano, A., Katsoulidis, E., Antico, G., Altman, J.K., Redig, A.J., Minucci, S., Tallman, M.S. and Plataniias, L.C., *Suppressive effects of statins on acute promyelocytic leukemia cells*. Cancer Res, 2007. **67**(9): p. 4524-32.
368. Hansen, M.D. and Nelson, W.J., *Serum-activated assembly and membrane translocation of an endogenous Rac1:effector complex*. Curr Biol, 2001. **11**(5): p. 356-60.
369. Lu, X., Nemoto, S. and Lin, A., *Identification of c-Jun NH2-terminal protein kinase (JNK)-activating kinase 2 as an activator of JNK but not p38*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 24751-4.
370. Gallagher, E.D., Xu, S., Moomaw, C., Slaughter, C.A. and Cobb, M.H., *Binding of JNK/SAPK to MEKK1 is regulated by phosphorylation*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 45785-92.

7 Annexe 1

Tableau 1 : Liste de patients atteints de LAM ou LAL

<u>Patient</u>	<u>Phénotype</u>	<u>Présentation</u>	<u>Age au prélèvement</u>	<u>Blastes</u>	<u>Etat de l'échantillon</u>	<u>Anomalies</u>
#1	LAM 4	Rechute		>70%	Congelé	inversion 16, éosinophilie
#2	LAM 2	Diagnostic	33	50%	Frais	t(8;21)
#3	LAM 5	Diagnostic		>70%	Congelé	t(9;11), trisomie (8)
#4	LAM 4	Diagnostic		97%	Congelé	inversion 16, éosinophilie
#5	LAM 5	Diagnostic	45	>70%	Frais	dupplication <i>FLT3</i>
#6	LAM 4	Diagnostic	16	>70%	Congelé	éosinophilie
#7	LAM 4	Diagnostic	77	>70%	Congelé	caryotype normal
#8	LAM 4	Diagnostic	74	>70%	Congelé	caryotype normal
#9	LAM 4	Diagnostic		>70%	Congelé	
#10	LAM 5	Diagnostic	79	>70%	Frais	
#11	LAL-T	Diagnostic	30	95%	Frais	
#12	LAL-B	Diagnostic		>70%	Congelé	
#13	LAL-B	Diagnostic	76	>70%	Congelé	

8 Annexe 2

Tableau 1

Tableau récapitulatif des séquences des couples d'amorces utilisées pour l'amplification analytique et spécifique des transcrits du gène *RHOH* initiés en amont de l'exon 1, de l'exon 2 ou de l'exon 4, ou des ARNm du gène contrôle *ABL*. Ce tableau présente également la température d'hybridation de ces couples d'amorces en degrés Celsius (T°C).

Cibles	Amorces	Séquences	RT-PCR analytique	
			T °C	Tailles amplifiées
<i>RHOH</i> (transcrits issus de P1)	Sens (21)	5'- CCCTTGACCCAAAGATACTGCTC -3'	58	404 bp* 657 bp*
	Antisens (61)	5'- GGGAATGCAAGGCAGGTAGGTCTG -3'		
<i>RHOH</i> (transcrits issus de P2)	Sens (2S)	5'- AGGCTGTGAGATGGGAGAATCAATCT-3'	62	373 bp ; 537 bp*; 555 bp* ; 626 bp ; 790 bp* ; 808 bp*
	Antisens (61)	5'- GGGAATGCAAGGCAGGTAGGTCTG -3'		
<i>RHOH</i> (transcrits issus de P3)	Sens (98)	5'- CACACACACTAACCCAACCATC -3'	55	486 bp* 668 bp
	Antisens (61)	5'- GGGAATGCAAGGCAGGTAGGTCTG -3'		
<i>ABL</i>	Sens	5'- TGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGG -3'	59	124 bp
	Antisens	5'- GATGTAGTTGCTGGGACCCA -3'		

*, transcrits mineurs

Tableau 2

Tableau récapitulatif des séquences des couples d'amorces utilisées pour l'amplification semiquantitative et spécifique des transcrits du gène *RHOH* initiés en amont de l'exon 1, de l'exon 2 ou de l'exon 4, ou des ARNm du gène contrôle *ABL*. Ce tableau présente également la température d'hybridation de ces couples d'amorces en degrés Celsius (T°C).

Cibles	Amorces	Séquences	RT-PCR semiquantitative		
			T °C	Nombres de cycles	Tailles amplifiées
<i>RHOH</i> (transcrits issus de P1)	Sens (21)	5'- CCCTTGACCCAAGATACTGCTC -3'	60	28	251 bp* 504 bp*
	Antisens (482)	5'- TCTCTGTCGGCTTCTACTCCAAG -3'			
<i>RHOH</i> (transcrits issus de P2)	Sens (125)	5'- AACACTGCAGGGCCATTTG -3'	60	28	109 bp ; 273 bp* ; 362 bp ; 291 bp* ; 526 bp* ; 544 bp*
	Antisens (482)	5'- TCTCTGTCGGCTTCTACTCCAAG -3'			
<i>RHOH</i> (transcrits issus de P3)	Sens (41)	5'- CCCTGCCAGCCCAACTG -3'	60	28	259 bp* 441 bp
	Antisens (299)	5'- AGAGCGTTCTCCACGGCTT -3'			
<i>ABL</i>	Sens	5'- TGGAGATAAACACTCTAAGCATAACTAAAGG -3'	60	28	124 bp
	Antisens	5'- GATGTAGTTGCTTGGGACCCA -3'			

*, transcrits mineurs

Tableau 3

Tableau récapitulatif des séquences des couples d'amorces utilisées pour l'amplification quantitative et spécifique des transcrits de nombreux gènes, y compris ceux du gène *RHOH* initiés en amont de l'exon 1, de l'exon 2 ou de l'exon 4, ou des ARNm du gène contrôle *ABL*. Ce tableau présente également la température d'hybridation de ces couples d'amorces en degrés Celsius (T°C).

Cibles	Amorces	Séquences	RT-PCR quantitative		
			T °C	Chimie	Profil observé
<i>RHOH</i> (transcrits issus de P1)	Sens (21)	5'- CCCTTGACCCAAAGATACTGCTC -3'	60	SYBR Green	
	Antisens (482)	5'- TCTCTGTCGGCTTCTACTCCAAG -3'			
<i>RHOH</i> (transcrits issus de P2)	Sens (125)	5'- AACACTGCAGGGCCATTTG -3'	60	SYBR Green	
	Antisens (482)	5'- TCTCTGTCGGCTTCTACTCCAAG -3'			
<i>RHOH</i> (transcrits issus de P3)	Sens (41)	5'- CCCTGCCAGCCCAACTG -3'	60	SYBR Green	
	Antisens (299)	5'- AGAGCGTTCTCCACGGCTT -3'			
<i>ABL</i>	Sens	5'- TGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGG -3'	60	SYBR Green	
	Antisens	5'- GATGTAGTTGCTTGGGACCCA -3'			
<i>RHOH</i> (transcrits totaux)	Sens (87)	5'- TTTGGAACTTCTCCTTCACACAC -3'	60	TaqMan	
	Sonde	5' FAM- AGTTGAAGACTAGGCTTT-MGB6 3'			
	Antisens (163)	5'- GTCCATCCAAGCACC -3'			
<i>ABL</i>	Sens	5'- TGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGG -3'	60	TaqMan	
	Sonde	5' FAM- CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT-MAGB6 3'			
	Antisens	5'- GATGTAGTTGCTTGGGACCCA -3'			
<i>PRKCA</i>	Sens	5'- GATGGATGGAGTCACGACCAG -3'	60	SYBR Green	
	Antisens	5'- AGGACCCATAGGCCCA -3'			
<i>CSF1R</i>	Sens	5'- GAGCGGACTATACCAATCTGCC -3'	60	SYBR Green	similaire à PRKCA
	Antisens	5'- AGCAGGTCAGGTGCTCACTAGAG -3'			
<i>RAMP1</i>	Sens	5'- CCAGGAGGCTAACTACGGTG -3'	61	SYBR Green	
	Antisens	5'- CTCCTGAAGTAGCGGCCA -3'			
<i>FCRL2</i>	Sens	5'- CAACGGCCATGTGCCTATC -3'	60	SYBR Green	similaire à PRKCA
	Antisens	5'- CAGGGCGAGACTGGAATT -3'			
<i>CEBPb</i>	Sens	5'- GCGCGAGCGCAACAACA -3'	60	SYBR Green	similaire à PRKCA
	Antisens	5'- TGCTTGAACAAGTCCGCAG -3'			
<i>MARCH1</i>	Sens	5'- TCCCAGGAGCCAGTCAAGGTT -3'	60	SYBR Green	similaire à PRKCA
	Antisens	5'- CAAAGCGCAGTGTCCCAAGT -3'			
<i>SMAD1</i>	Sens	5'- ACTGCCTCATGTCTTTACTGC -3'	60	SYBR Green	similaire à PRKCA
	Antisens	5'- CTATTGGGAGAGTGAGGAAACG -3'			
<i>CASP1</i>	Sens	5'- AAATCTCACTGCTTCGGACATGA -3'	60	SYBR Green	similaire à PRKCA
	Antisens	5'- GCTCTGGGCGGTGTGC -3'			
<i>SAMSN1</i>	Sens	5'- AAAGCCAGTGACTCCATGGATAGT -3'	60	SYBR Green	similaire à PRKCA
	Antisens	5'- TCGAAAGCTGTCCCGTT -3'			
<i>GAS7</i>	Sens	5'- AACAGTGAATGGATACCACGCAT -3'	60	SYBR Green	similaire à PRKCA
	Antisens	5'- TGCTGTTCCGGCATCGT -3'			
<i>KYNU</i>	Sens	5'- TGCCTGCTGGTTCCTACAA -3'	60	SYBR Green	similaire à PRKCA
	Antisens	5'- ATCTGGTCTGAGTTCATGGC -3'			

GPR30	Sens	5'- GCGGGTCTCTCTCTCTCT -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- CTCTCTGGGTACCTGGGTTG -3'			
PASD1	Sens	5'- TCTCTCAAAAACACTGGGGA -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- CTGCCGCTGCTGCTC -3'			
IL23A	Sens	5'- CTGCTTGCAAAGGATCCACC -3'	60	SYBR Green	
	Antisens	5'- TTGAAGCGGAGAAGGAGACG -3'			
CCL1	Sens	5'- AGGCCTCTTTGCCTCTCTC -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- ATGCAGATCATCACCACAGC -3'			
SH2D1b	Sens	5'- GGTCTCCCTTGATCTTCC -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- TGTGCTCCAGTCAGTTTCTAT -3'			
MAGEA9	Sens	5'- TGGGACAAGATAACATAGCAG -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- ACAGGAGAGAGAAAGAGGTA -3'			
IL13	Sens	5'- AAAAATGTCTGGGTAGGCG -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- AAGCTGAGGTCGGCT -3'			
BCHE	Sens	5'- TGAAGCATTTGTTGCCCT -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- GAGAAAATCACCATCCACGG -3'			
NMU	Sens	5'- GAAGACACAGAAGTTGGCAAGT -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- CTCTTCATTCTCTCATGCAGT -3'			
IQCG	Sens	5'- GACACCACAGACCAGC -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- TAAACTCCACAGCGAACCG -3'			
MAGEB2	Sens	5'- CCCCTGCTGTTCTCTCT -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- CACCAACGACCTGACTTCC -3'			
KIR2DL4	Sens	5'- GCTGTGGTGCCTCAAG -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- GCGTGTGCTGGGGTCA -3'			
SLA	Sens	5'- TTTCCCCGTGTCTCCTAT -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- TGTTTCCCATTTCTTTTCCCTG -3'			
CFHR1	Sens	5'- GAACGGGGCTGGTCC -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- GGGCTCTACATTCATAACG -3'			
DUSP1	Sens	5'- CAACGAGGCCATTGACTTCATAG -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- CAAACACCCTTCTCCAGCA -3'			
DUSP2	Sens	5'- AAAACCAGCCGCTCCGAC -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- CCAGGAACAGGTAGGGCAAG -3'			
DUSP8	Sens	5'- GCATCCTGCCTCACCTTACC -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- CCATTTTGCATCATCAGATCC -3'			
DUSP10	Sens	5'- GCCAGCCACTGACAGCAAC -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- TCCCACACTGGTGAGCTTCC -3'			
RAC1	Sens	5'- CACGATCGAGAACTGAAGG -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- CAGCAGCAATCTCCTTAGC -3'			
RAC2	Sens	5'- GCTCAGCTCTACCCAG -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- GGTGCAACCCCTAGAGG -3'			
RHOA	Sens	5'- GGTTGGGAATAAGAAGGATC -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- GCCATATCTCTGCCTTCTC -3'			
CDC42	Sens	5'- ATGACAGATTACGACCGC -3'	60	SYBR Green	<i>similaire à PRKCA</i>
	Antisens	5'- CTCAGGCACCCACTTTTC -3'			

Tableau 4

Séquences et positions des amorces utilisées lors du clonage des fragments du promoteur P3 du gène *RHOH* dans le plasmide pGL4.14[*luc2/Hygro*]. *, par rapport au site d'initiation de la transcription situé en amont de l'exon 4; **, présence en 5' d'une séquence ATTCAGAAGCTT contenant un site *Hind*III.

Positions de l'amorce*	Séquences**	T °C
-1519	5'- CAGCTCACTGCAACCTCAACC -3'	59
-583	5'- GGTAACCTCCAGCCAGGTG -3'	56
-380	5'- ACCAAGATTGGTCAGTGGCATG -3'	57
-236	5'- GAAACATAGTCTCGGAGTAGGGTG -3'	54
-167	5'- TCTGCCTCTGATCTGGGGAAG -3'	56
-103	5'- CCTAAACCCACACAAATGAAACC -3'	55
-24	5'- CTCTTTTGTACATTTCGGATTGC -3'	56
+67	5'- ATACAACAGTTGGGCTGGCAG -3'	55
+245	5'- GAATGCCGAAGAAATGTCTTGACAG -3'	58

*, par rapport au site d'initiation de la transcription situé à l'extrémité 5' de l'exon 4

** , présence à l'extrémité 5' de 12 nucléotides ATTCAGAAGCTT contenant un site *Hind* III (indiqué en gras)

Tableau 5

Séquences et positions des amorces utilisées pour l'étude de la fixation du facteur de transcription JunD sur le promoteur P3 par retard en gel ou EMSA. La sonde « site spécifique AP1 » est une séquence sur laquelle le complexe AP1 se fixe préférentiellement et sert de compétiteur spécifique. A l'inverse, la sonde « non spécifique », ne possédant pas de site pour le complexe AP1, a été utilisée comme compétiteur aspécifique.

Cibles	Sondes	Séquences
AP1#1	Sens	5'- CATCAGGAAATTGACTTAGGCACAGGAA -3'
	Antisens	5'- TTCCTGTGCCTAAGTCAATTCCTGTAG -3'
AP1#2	Sens	5'- CAGGAACTTGCTAATCTCTTTGTACAT -3'
	Antisens	5'- ATGTGACAAAAGAGATTAGCAAGTTCCTG -3'
site spécifique AP1	Sens	5'- CTAGTGATGAGTCAGCCGGATC -3'
	Antisens	5'- GATCACTACTCAGTCGGCCTAG -3'
non spécifique	Sens	5'- GATCCGGTCCCCCACCATCCCCGCCATTTCCA -3'
	Antisens	5'- TGGAAATGGCGGGGGATGGTGGGGGACCGGATC -3'

Tableau 6

Tableau des couples d'amorces utilisées pour la PCR analytique après immunoprécipitation de la chromatine. Les amorces permettent l'amplification des séquences ADN génomique contenant les sites de fixation soit de la RNA Polymérase II au niveau du promoteur du gène *GAPDH*, soit des sites consensus pour le facteur de transcription AP1 (AP1#1 et AP1#2) du promoteur P3 du gène *RHOH*. D'autres amorces permettant l'amplification de séquences ADN génomique de ces mêmes promoteurs mais ne contenant pas de sites consensus pour la RNA Polymérase II ou le facteur AP1 ont été utilisées. Celles-ci servent de « contrôle négatif » et sont utilisées pour vérifier la spécificité de la réaction d'immunoprécipitation de la chromatine. Ce tableau présente également les tailles des fragments amplifiés.

<u>Gène</u>	<u>Cible</u>	<u>Amorce</u>	<u>Séquence</u>	<u>Taille amplifiée</u>
<i>GAPDH</i>	site RNA Polymérase II	Sens	5'- TACTAGCGGTTTTACGGGCG -3'	166 bp
		Antisens	5'- TCGAACAGGAGGAGCAGAGAGCGA -3'	
	contrôle négatif	Sens	5'- ATGGTTGCCACTGGGGATCT -3'	174 bp
		Antisens	5'- TGCCAAAGCCTAGGGGAAGA -3'	
<i>RHOH</i>	sites AP1#1 et AP1#2	Sens	5'- CCTAAACCCACACAAATGAA -3'	341 bp
		Antisens	5'- ATACAACAGTTGGGCTGGCA -3'	
	contrôle négatif	Sens	5'- TAGTTGCAGATGGTCTACAC -3'	196 bp
		Antisens	5'- CAGAGGCAGGCTTAGTGA -3'	
	site AP1#1	Sens	5'- AGAAACATAGTCTCGGAGTAGGGT -3'	218 bp
		Antisens	5'- AAGAGATTAGCAAGTTCCTGT -3'	
site AP1#2	Sens	5'- GGCACAGGAAGTCTAATCTC -3'	147 bp	
	Antisens	5'- CGAGAATATTAAGTATTCACTGGAAGAAGTCTG -3'		

Tableau 7

Tableau des couples d'amorces utilisées pour la PCR quantitative après immunoprécipitation de la chromatine. Les amorces permettent l'amplification des séquences ADN génomique contenant les sites consensus pour le facteur de transcription AP1 (AP1#1 et AP1#2) du promoteur P3 du gène *RHOH*. Des amorces permettant l'amplification de séquences ADN génomique de ces mêmes promoteurs mais ne contenant pas de sites consensus pour le facteur AP1 ont été utilisées. Celles-ci servent de « contrôle négatif » et sont utilisées pour vérifier la spécificité de la réaction d'immunoprécipitation de la chromatine. Ce tableau présente également la température, la chimie utilisées et le profil obtenu lors des PCR quantitatives.

Gène	Cible	Amorce	Séquence	RT-PCR quantitative		
				T°C	Chimie	Profil observé
<i>RHOH</i>	site AP1#1	Sens	5'- AGAAACATAGTCTCGGAGTAGGGT -3'	60	SYBR GREEN	
		Antisens	5'- AAGAGATTAGCAAGTTCCTGT -3'			
	site AP1#2	Sens	5'- GGCACAGGAAGTCTGTAATCTC -3'	60	SYBR GREEN	
		Antisens	5'- CGAGAATATTAAGTTCACACTGGAAGAAGTCTG -3'			
	contrôle négatif	Sens	5'- TAGTTGCAGATGGTCTCTACAC -3'	60	SYBR GREEN	
		Antisens	5'- CAGAGGCAGGCTTAGTGA -3'			

9 Annexe 3

Programmes, solutions et efficacités de transfection pour la méthode d'électroporation Amaxa (Lonza Group LTD). Les programmes ont été mis au point pour les lignées cellulaires ou pour les cellules primaires humaines, soit au laboratoire par la transfection du plasmide pRETROpuro exprimant la GFP, *Green Fluorescent Protein*, soit par le fournisseur Lonza.

<u>Lignée ou type cellulaire</u>	<u>Programme</u>	<u>Solution de transfection</u>	<u>% de cellules viables</u>	<u>% de cellules GFP⁺</u>
BL2	R13	<i>Cell line Nucleofector Kit V</i>	70	30
CD34+	U8	<i>Human CD34+ cells Nucleofector Kit</i>	mise au point par Lonza	
CEM	X1	<i>Cell line Nucleofector Kit C</i>	mise au point par Lonza	
Daudi	A20	<i>Cell line Nucleofector Kit L</i>	70	51
EH	Y1	<i>Cell line Nucleofector Kit C</i>	34	64
Eskol	A20	<i>Cell line Nucleofector Kit V</i>	53	31
HC1	A30	<i>Cell line Nucleofector Kit L</i>	39	70
HeLa	I13	<i>Cell line Nucleofector Kit R</i>	mise au point par Lonza	
JOK-1	Z1	<i>Cell line Nucleofector Kit C</i>	44	58
Jurkat	C16	<i>Cell line Nucleofector Kit V</i>	57	63
KK1	T1	<i>Cell line Nucleofector Kit V</i>	37	55
Lymphocytes T primaires	U14	<i>Human T cell Nucleofector kit</i>	mise au point par Lonza	
Mo	Y1	<i>Cell line Nucleofector Kit L</i>	51	88
Namalwa	A24	<i>Cell line Nucleofector Kit V</i>	90	15
Raji	M13	<i>Cell line Nucleofector Kit V</i>	67	58