UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

N° d'ordre **1880**

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de: DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

Malika HAMDANE

ACTIVATION DE LA PROTEINE P65NF-κB DANS LES CELLULES TRANSFORMEES PAR LA PROTEINE HYBRIDE P210^{BCR-ABL}

ETUDE DANS LA LIGNEE MYELOIDE DA1

Soutenue le 28 Novembre 1996 devant la Commission d'Examen:

Président: Professeur J. J. CURGY Rapporteurs: Docteur J. IMBERT Docteur W. VAINCHENKER Examinateurs: Docteur J. COLL Docteur J. C. D'HALLUIN Professeur T. VELU Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Messieurs les membres du Jury d'avoir pris de leur temps pour examiner et juger ce travail. Ce travail a été effectué à l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille, dans le laboratoire d'Oncohématologie moléculaire U 124 INSERM, dirigé par le Dr M. H. Loucheux-Lefebvre puis, après son départ en retraite, par le Dr J. P. Kerckaert.

Je remercie le Dr J. C. D'Halluin de m'avoir dirigé tout en encourageant mes tentatives d'initiative. Je le remercie pour sa confiance et son aide.

Je tiens à remercier le Dr M. H. Loucheux-Lefevre pour son soutien.

J'exprime mes vifs remerciements au Dr M. Collyn-d'Hooghe pour sa disponibilité, sa générosité et sa bonne humeur communicative.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à ma chère collègue M. H. David-Cordonnier, son soutien moral et son amitié m'étaient précieux.

Un grand merci à I. Huvent pour son aide et son amitié.

Je tiens également à remercier tout le personnel de l'U124 INSERM et de l'IRCL pour la chaleur de leur accueil. Un grand merci pour les moments de détente partagés lors des pauses café.

Ce mémoire est pour moi l'occasion d'exprimer toute mon affection pour mes parents, ma soeur, mes frères et hafiz.

Ce travail a été financé durant trois ans par la région Nord-Pas-de-Calais et le Centre Hospitalier Régional de Lille et pendant six mois par l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille. Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à ces trois organismes.

TABLE DES MATIERES

NTRODUCTION	
<u>GENERALITES</u>	18
I. La leucémie myéloïde chronique	19
II. BCR	21
II. 1. Organisation du gène et transcription	21
II. 2. La protéine BCR	24
II. 3. Rôle biologique de BCR	24
III- ABL	27
III. 1. Organisation du gène et transcription	27
III. 2. La protéine c-ABL	28
III. 2. 1. Les tyrosines kinases non récepteurs	28
III. 2. 2. Les domaines SH2 et SH3	28
III. 2. 3. Les domaines fonctionnels de c-ABL	31
III. 2. 4. Rôle biologique	34
III. 2. 5. Activation et pouvoir oncogénique de c-ABL	36
IV. BCR-ABL dans la LMC	38
IV. 1. Organisation du gène et transcription	38
IV. 2. La protéine BCR-ABL dans la LMC	38
IV. 3. Mécanisme de stimulation de l'activité d'ABL au sein de la pro	otéine
BCR-ABL	41
V. Mécanismes d'action de la protéine p210 ^{BCR-ABL}	43
V. 1. Implication de la voie de p21RAS et de c-MYC	43
V. 1. 1. La famille des protéines RAS	43
V. 1. 2. Activation de la voie de RAS par BCR-ABL	47
V. 1. 3. Implication de c-MYC	48
V. 2. Inhibition de l'apoptose par la protéine p210 ^{BCR-ABL}	50
V. 3. La protéine p210 ^{BCR-ABL} et adhésion cellulaire	51

VI. La famille Rel/NF-ĸB	54
<u>RESULTATS</u>	60
A. INTRODUCTION	61
P Fride dans les celluies adiédentes	62
D. ETUDE DANS LES CELLULES ADHERENTES	03
1. Etudes d'activation transcriptionnelle dans la lignée cellulaire COS7	63
II. Etudes d'activation transcriptionnelle dans la lignée cellulaire Rat-1	66
C. LES ETUDES REALISEES DANS LA LIGNEE MYELOIDE DA1	68
I. La p210 ^{BCR-ABL} rend la croissance des cellules DA1 indépendante de l'IL-3	68
II. Analyse des activités transcriptionnelles en présence de la protéine p210 ^{BCR-ABL}	71
II. 1. Etude d'activation transcriptionnelle en expression transitoire	71
II. 2. Etude d'activation transcriptionnelle en expression stable	73
II. 2. 1. Génération des cellules DA1 transformées	74
II. 2. 2. Etude d'activation transcriptionnelle	74
III. Analyse des complexes nucléaires Rel/NF-ĸB	77
IV. Analyse de la composition des complexes Rel/NF-KB	78
V. Recherche du niveau d'activation de la protéine p65 par la p210 ^{BCR-ABL}	82
V. 1. Analyse de la distribution subcellulaire de la protéine p65	82
V. 2. Analyse des taux d'ARNm p65	85
V. 2. 1. Northern blot	85
V. 2. 2. RT-PCR	87
VI. Analyse de la stabilité de la protéine p65	89
VII. Implication de la fonction tyrosine kinase de la p210 ^{BCR-ABL} dans	
l'activation de la protéine p65	92
VII. 1. Obtention des populations cellulaires	94
VII. 2. Analyse de la stabilité de la protéine p65	94
VIII. Le rôle de la p65 dans la transformation médiée par la p210 ^{BCR-ABL}	97
VIII. 1. Vérification de la spécificité d'action des oligonucléotides	97
VIII. 2. Effet des oligonucléotides antisens	98
DISCUSSION	102
I. Stimulation de l'activité NF-KB par la protéine p210 ^{BCR-ABL}	103

4

II. Activation de la propriété de fixation à l'ADN de la p65 NF-ĸB dans les	cellules
exprimant la protéine p210 ^{BCR-ABL}	105
III. Activation de la p65 par augmentation de la stabilité protéique	105
IV- Les implications potentielles de l'activation de la p65 par la protéine	
p210 ^{BCR-ABL}	109
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	111
MATERIELS ET METHODES	114
A. ANALYSE, PURIFICATION ET MANIPULATIONS GENETIQUES DE L'A	DN
PLASMIDIQUE	115
I. Electrophorèse d'ADN en gel non dénaturant	115
I. 1. Gel d'agarose	115
I. 2. Gel de polyacrylamide	115
II. Purification des fragments d'ADN séparés en gel	116
II. 1. A partir d'un gel d'agarose	116
II. 1. 1. Geneclean II [®] Kit	116
II. 1. 2. DEAE-élution	116
II. 2. A partir d'un gel de polyacrylamide	117
II. 2. 1. DEAE-élution	117
II. 2. 2. Elution directe	117
III. Sous-clonage moléculaire	117
III. 1. Matériel	118
III. 1. 1. Souches bactériennes	118
III. 1. 2. Les vecteurs	119
III. 2. Méthode	123
III. 2. 1. Ligature	123
III. 2. 2. Transformation bactérienne	123
III. 2. 3. Identification des clones recombinés	124
III. 3. Construction des plasmides recombinés	125
III. 3. 1. Construction du pBLCAT-5kB	125
III. 3. 2. Construction du pcDNA-p210	125

IV. Mutagénèse dirigée	126
IV. 1. Principe	126
IV. 2. Construction du mutant K1171R	126
IV. 2. 1. Construction du pSELECT-Abl	128
IV. 2. 2. Préparation de l'ADN simple brin	128
IV. 2. 3. Réaction de mutagénèse	129
IV. 2. 4. Construction du vecteur pcDNA-K1171R	129
IV. 3. Construction du mutant Y177F	131
IV. 3. 1. Construction du pSELECT-bcr	131
IV. 3. 2. Mutagénèse dirigée	131
IV. 3. 3. Construction du vecteur pcDNA-Y177F	131
V. Purification des plasmides	132
B. MANIPULATIONS DES CELLULES EUCARYOTES	133
I. Cellules et milieux de culture	133
I. 1. Les cellules adhérentes	133
I. 2. Les cellules en suspension	133
II. Les techniques de transfection	134
II. 1. Liposomes	134
II. 2. Electroporation	134
III. Etude de l'activité CAT	135
IV. Oligonucléotides antisens	135
V. Les lignées stables	136
V. 1. Les cellules adhérentes	136
V. 2. Les clones isolés de cellules DA1	136
V. 3. La population cellulaire	137
VI. Marquage métabolique des cellules	137
VI. 1. Marquage classique	137
VI. 2. Pulse-chase	137
C. PURIFICATION ET ANALYSE DES ARN MESSAGERS	138
I. Extraction des ARN cellulaires totaux	138
I. 1. Technique au RNAzolB	138
I. 2. Technique à l'isothiocyanate de guanidium	139

II. Technique de Northern	139
III. Rétrotranscription et amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR)	141
III. 1. Rétrotranscription (RT)	141
III. 2. Amplification en chaîne par polymérase (PCR)	141
III. 3. Vérification de la spécificité d'amplification	142
III. 3. 1. Digestion enzymatique	142
III. 3. 2. Technique de Southern	142
D. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES	143
I. Les réactifs utilisés	143
II. Electrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide dénaturant	143
III. Immunoprécipitation	144
III. 1. Préparation des extraits cellulaires totaux	144
III. 2. Préparation des extraits cytoplasmiques et nucléaires.	144
III. 3. Immunoprécipitation simple	145
III. 4. Immunoprécipitation double	145
IV. Réaction kinase <i>in vitro</i>	146
V. Technique de Western	146
E. ETUDE DES INTERACTIONS PROTEINES-ADN: TECHNIQUE DE RETARD	EN
GEL	147
I. Extraits nucléaires	148
II. Préparation des sondes	148
II. 1. Marquage de l'oligonucléotide κB par l'ADN polymérase	148
II. 2. Marquage de l'oligonucléotide oct-1 par la polynucléotide kinase	149
II. 3. Purification des sondes	149
III. Incubation sonde-protéines	149
IV. Migration électrophorétique	150
F. LES OLIGONUCLEOTIDES UTILISES	151
BIBLIOGRAPHIE	153

INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

GENERALITES

Figure G1: La translocation (9;22)(q34;q11) et le chromosome Philadelphie.	20
Figure G2: Les gènes abl, bcr et formation des gènes hybrides bcr-abl	23
Figure G3: Représentation schématique de la protéine BCR	25
Figure G4: Représentation schématique des domaines d'homologie des différentes familles	
de TKNR	29
Figure G5: Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine c-ABL	32
Figure G6: La protéine c-ABL et ses formes oncogéniques	37
Figure G7: Représentation schématique des protéines BCR-ABL	40
Figure G8: Modèle d'activation d'ABL par les séquences BCR au sein de la p210 ^{BCR-ABL}	42
Figure G9: Le cycle des petites protéines G	45
Figure G10: Illustration simplifiée des voies de ERK et JNK	46
Figure G11: Représentation schématique des membres de la famille Rel/NF-ĸB chez les	
mammifères	56
Figure G12: Représentation schématique des membres de la famille IkB chez les	
mammifères	57

RESULTATS

Figure R1 : Expression transitoire de la protéine p210 ^{BCR-ABL} dans les COS7.	64
Tableau R1: Etudes d'activation transcriptionnelle dans les cellules COS7 et Rat-1.	65
Figure R2: Courbes de survie en absence d'IL-3.	69
Figure R3: Les études d'activation transcriptionnelle en expression transitoire	72
Figure R4: Activité tyrosine kinase de la p210 ^{BCR-ABL} dans les cellules DA1 transformées.	75
Figure R5: Etude d'activation transcriptionnelle en expression stable dans les cellules DA1.	. 76
Figure R6: Analyse des complexes nucléaires Rel/NF-KB par retard en gel.	79
Figure R7: Analyse de la composition des complexes Rel/NF-KB.	81
Figure R8 : Distribution subcellulaire de la protéine p65.	84
Figure R9: Analyse des taux d'ARNm p65 par transfert de Northern.	86
Figure R10: Analyse des ARNm p65 par RT-PCR.	88
Figure R11: Analyse du taux de la protéine p65 par immunoprécipitation.	90

Figure R12: Expérience de <i>pulse-chase</i> dans les clones transformés.	91
Figure R13: Analyse de la stabilité de la protéine ΙκΒα.	93
Figure R14: Caractérisation des populations cellulaires.	95
Figure R15: Expérience de pulse-chase dans les populations cellulaires.	96
Figure R16: L'inhibition du taux d'ARNm p65 par l'oligonucléotide antisens.	99
Tableau R2. Effet de l'oligonucleotide antisens p65 sur la transformation médiée par la	
p210 ^{BCR-ABL}	100

MATERIELS ET METHODES

Figure M1 : Représentation schématique des vecteurs de clonage	120
Figure M2: Représentation schématique du plasmide pSP65-CML	121
Figure M3 : Principe de la mutagénèse dirigée.	127
Figure M4: Représentation des mutations créées	130

Lexique

Cellules

DA1 :	Lignée cellulaire dépendante d'IL-3 dérivant d'un progéniteur myéloïde murin.
COS7:	Lignée cellulaire de singe transformée par l'antigène T du virus simien 40 (SV40).
Rat-1:	Lignée établie à partir de fibroblastes de rat.

Gènes

<i>myc</i> :	Oncogène de la leucémie myélo-monocytaire.
cat:	Gène d'origine procaryote codant la chloramphénicol acétyl transférase.
Ha-ras :	Oncogène du sarcome murin de Harvey.
gag:	Gène rétroviral qui code la protéine de la capside.
pol:	Gène rétroviral codant l'enzyme transcriptase inverse.
GAPDH :	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase.

Protéines d'adaptation (adaptatrices)

CRK :	CT10 regulator of kinase.
GRB2 :	Growth factor receptor-bound protein 2.
SHC :	Src homologous and collagen.
SOS :	Son of sevenless.

Réactifs

- BrEt : Bromure d'éthidium.
- BSA : Sérum albumine bovine.
- CsCl : Chlorure de césium.
- DEPC : Diéthyl pyrocarbonate.
- DTT : Dithiothréitol.
- EDTA : Acide éthylène-dinitrilo-tétra acétique.
- G418 : Généticine.
- Hépès : Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-éthanesulfonique.

LB:	Milieu Luria-Bertani.
MOPS :	Acide 3-[N-Morpholino] propane-sulfonique.
NP-40:	Nonidet P40.
PMSF :	Fluorure de phénylméthylsulfonyle.
SDS :	Dodécyl sulfate de sodium.
TEMED :	N, N, N', N'-tetraméthyl éthylène diamine.
TRIS :	Tris (hydroxyméthyl) -aminométhane.

Unités

μF :	Microfarade.
μg :	Microgramme.
Ci:	Curie.
cpm :	Coups par minute.
g :	Accélération de la pesanteur.
g/l :	Gramme par litre.
h :	Heure.
Kb:	kilobase
kDa :	Kilodalton.
mA :	Milliampère.
mn :	Minute.
ng :	nanogramme.
nm :	nanomètre.
nt :	Nucléotide.
P/V	Poids/Volume.
pb :	Paire de bases.
V :	Volt.

Autres

aa :	Acide aminé.
ADN :	Acide désoxyribonucléique.
ADNc :	ADN complémentaire.
Ag:	Antigène.
ARN :	Acide ribonucléique.

ARNm :	ARN messager.
ATP:	Adénosine triphosphate.
dATP :	Désoxyadénosine triphosphate.
dCTP :	Désoxycytosine triphosphate.
dNTP :	Désoxynucléotide triphosphate.
DO :	densité optique.
GDP :	Guanosine diphosphate.
GTP :	Guanosine triphosphate.
Ig:	Immunoglobuline.
LAL:	Leucémie aiguë lymphoblastique.
Ph :	chromosome Philadelphie.
Ph ⁺ :	à chromosome Philadelphie.
RNase :	Ribonucléase.
SVF:	Sérum de veau foetal.
TRE :	TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) reponsive element.
UV:	Ultra violet.

INTRODUCTION

Le chromosome Philadelphie représente la caractéristique cytogénétique de la leucémie myéloïde chronique (LMC), il est retrouvé chez environ 95% des patients atteints. Ce chromosome aberrant résulte de la translocation t(9;22) correspondant au réarrangement génétique au cours duquel la quasi-totalité du gène c-*abl*, normalement situé sur le chromosome 9, fusionne avec une partie du gène *bcr*, situé sur le chromosome 22. Le gène de fusion *bcr-abl* ainsi créé, code une protéine hybride de 210 KDa, désignée p210^{BCR-ABL}. Comparée à la protéine c-ABL normale, la protéine hybride possède une localisation cellulaire exclusivement cytoplasmique et une activité tyrosine kinase élevée nécessaire à son pouvoir oncogénique.

Le rôle étiologique de la p210^{BCR-ABL} dans la LMC a été montré *in vitro* et *in vivo* mais les mécanismes moléculaires conduisant à cette leucémie ne sont pas encore élucidés. La compréhension de ces mécanismes pourrait déboucher sur de nouvelles perspectives thérapeutiques. Ainsi, la recherche des mécanismes d'action de la protéine p210^{BCR-ABL} a été très intensifiée pendant les quatre dernières années. Plusieurs substrats de la protéine hybride ont été identifiés et plusieurs modèles différents ont été proposés pour expliquer la pathogénicité induite par cette protéine. Toutefois, les mécanismes précis de la transformation par la p210^{BCR-ABL} ne sont pas encore établis. La protéine hybride possède une structure très complexe qui devrait permettre son association avec plusieurs protéines signalétiques et donc son interaction avec plusieurs voies de transduction du signal. Les différents modèles proposés sont probablement tous valables, ils pourraient agir dans un ordre chronologique et/ou en coopération pour médier la transformation induite par la protéine BCR-ABL.

L'identification des effecteurs de la protéine hybride permettrait l'établissement d'un lien entre les substrats de la protéine et les gène cibles, pouvant ainsi aider à la compréhension des désordres moléculaires aboutissant à la LMC.

Notre travail, situé dans ce cadre général de recherche, consiste en l'identification de cibles nucléaires de la protéine hybride, il s'est axé sur l'étude des facteurs de transcription Rel/NF- κ B en tant qu'effecteurs de la protéine p210^{BCR-ABL}.

Beaucoup de travaux sont encore nécessaires pour la compréhension du processus de la transformation induite par la protéine p210^{BCR-ABL}. La détermination des voies de transduction

14

du signal de cette protéine et la contribution de chacune d'entre elles à cette transformation pourrait aider à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant le ciblage moléculaire.

Les traitements actuellement utilisés sont essentiellement basés sur l'allogreffe et l'utilisation de l'interféron, ils ne permettent qu'une survie moyenne de 3 à 5 ans. Une collaboration étroite entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée permettra peut-être dans l'avenir la guérison des patients.

Les résultats présentés ont fait l'objet des communications et publications suivantes:

Publications

HAMDANE M, CORDONNIER MH, D'HALLUIN JC.

Activation of p65 NF- κ B protein by p210^{BCR-ABL} -study in a myeloid cell line-Accepté sous reserve de quelques modifications, Mol. Cell. Biol.

Publications annexes aux congrès

HAMDANE M, CORDONNIER MH, D'HALLUIN JC.

The p210^{BCR-ABL} modifies transcription from promoter containing NF- κ B binding sites. Cancer Detection and Prevention, Volume 19/ issue 1 : 040/202. 1995.

HAMDANE M, CORDONNIER MH, PREUDHOMME C., D'HALLUIN JC.

Activation of NF- κ B is involved in transformation of myeloid cells by p210^{BCR-ABL}. Blood, Volume 86/supp 1 :2909. 1995.

<u>HAMDANE M</u>, CORDONNIER MH, D'HALLUIN JC. Activation du facteur de transcription NF- κ B par p210^{BCR-ABL}. Hematology and cell therapy, Volume 38 :156/81. 1996.

Communications orales

HAMDANE M, CORDONNIER MH, D'HALLUIN JC.

Cibles nucléaires de la p210BCR-ABL

XXIe Forum des jeunes chercheurs. Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Reims. 05-08/07/1994.

HAMDANE M, CORDONNIER MH, D'HALLUIN JC.

Activation du facteur de transcription NF-κB par p210^{BCR-ABL}. Congrès de la Société Française d'Hématologie, Paris. 9-10/02/1996.

Communications par affiche

HAMDANE M, CORDONNIER MH, D'HALLUIN JC.

The p210BCR-ABL modifies transcription from promoters containing different responsive elements

The Tenth Annual Meeting on Oncogenes, Frederick (Maryland). 21-25/06/1994

HAMDANE M, CORDONNIER MH, D'HALLUIN JC.

The p210BCR-ABL modifies transcription from promoter containing NFKB binding sites. Impact of Biotechnology on Predictive Oncology and Therapy, Boston, MA, 11-13/12/1994.

Autres travaux:

CORDONNIER MH, <u>HAMDANE M</u>, D'HALLUIN JC.

c-Myb Proto-Oncogene Binds to the EP element and Regulates Transcription from the Hepatitis B Virus Enhancer in synergy with NF-M.

soumis, Oncogene.

CORDONNIER MH, <u>HAMDANE M</u>, D'HALLUIN JC.

Le proto-oncogene c-myb fixe la séquence EP de l'enhancer du virus de l'Hépatite B et le régule en synergie avec le facteur de transcription NF-M dans les lignées hématopoïétiques et hépatiques.

Hematology and cell therapy, volume 38 :134/70. 1996.

GENERALITES

I. La leucémie myéloïde chronique

(Revue générale : Kurzrock et al., 1988)

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne qui affecte la lignée myéloïde. Dans 90 à 95% des cas, elle se caractérise sur le plan cytogénétique par la présence du chromosome Philadelphie (Ph) (du nom de la ville où il a été découvert en 1960, Nowell et Hungerford), qui représente une aberration caryotypique acquise. Le chromosome Ph se forme suite à une translocation entre un chromosome 9 et un chromosome 22 cassés respectivement en q34 et q11. Cette translocation désignée par t(9;22)(q34;q11) est de nature réciproque, elle donne lieu à deux chromosomes réarrangés (Fig. G1):

- Le 9q⁺: à bras long allongé, issu de la fusion des séquences 3' du gène *bcr* provenant du chromosome 22 aux séquences 5' du gène *abl*, localisé sur le chromosome 9. Il en résulte la formation d'un gène hybride *abl-bcr*, transcrit en ARNm chimériques ayant un cadre de lecture ouvert (Melo *et al.*, 1993), mais dont la traduction en protéine n'a pas été mise en évidence jusqu'à présent.
- Le 22q: à bras long raccourci, qui correspond au chromosome Ph. Il résulte de la mise en continuité des séquences 5' du gène *bcr*, localisé sur le chromosome 22, avec les séquences 3' du gène *c-abl* provenant du chromosome 9. La cassure sur le chromosome 22 s'effectue à deux endroits différents (voir plus loin) donnant ainsi deux variants du chromosome Ph :
 (i) Un Ph issu de la cassure au niveau de l'extrémité 5' du gène *bcr*. Le gène hybride *bcr-abl* ainsi formé va coder une protéine de 190 KDa. Ce chromosome Ph est trouvé dans 20% des LAL de l'adulte et 5% des LAL de l'enfant. (ii) Un Ph formé lorsque le point de cassure se trouve au milieu du gène *bcr*, au niveau de la région de cassure majeure de 5 Kb (M-bcr). Dans ce cas, le gène *bcr-abl* produit une protéine de 210 KDa. Ce chromosome est retrouvé dans au moins 90 à 95% des cas de LMC.

La LMC est une maladie d'origine clonale, elle a pour origine une cellule souche hématopoïétique pluripotente, les cellules de LMC les plus primitives qui ont été caractérisées ont un phénotype $CD34^+$ DR⁻ (Leemhuis *et al.*,1993). Cette leucémie se caractérise principalement par deux phases: (i) Une phase initiale, relativement peu maligne, qui s'étend en moyenne sur une période de 2 à 5 ans, appelée phase chronique et caractérisée



Bandes R

Figure G1: La translocation (9;22)(q34;q11) et le chromosome

Philadelphie.

(Tanzer et Guilhot, 1992)

cytogénétiquement par la présence du chromosome Ph. Sur le plan clinique, elle se manifeste par une augmentation importante du nombre des différents progéniteurs myéloïdes qui continuent à se différencier normalement en cellules hématopoïétiques matures. Le rôle causal du gène hybride bcr-abl dans cette affection a pu être démontré dans des modèles animaux. L'expression de la protéine p210^{BCR-ABL}, après son transfert par des vecteurs rétroviraux, entraîne chez la souris l'apparition d'hémopathies très proches de la LMC (Kelliher et al., 1990, Daley et al., 1990). (ii) une phase de transformation aiguë appelée également crise blastique, elle dérive de l'évolution de la phase chronique qui se fait soit sans transition soit après un stade intermédiaire d'accélération progressive. Cette phase hautement maligne se manifeste par la perte de la différenciation terminale et son blocage au stade progéniteur. Le chromosome Ph, à l'origine du déclenchement de la phase initiale de la maladie, n'est pas suffisant à lui seul pour entraîner cette évolution. En effet, des altérations cytogénétiques additionnelles (comme la trisomie du chromosome 8, l'apparition d'un deuxième chromosome Ph et d'autres anomalies) ont été observées chez la majorité des patients à LMC dont l'évolution s'approche de la phase aiguë. Néanmoins, les événements moléculaires qui aboutissent à la crise blastique ainsi que ceux déterminant la fluctuation de l'intervalle de temps requis (de quelques semaines jusqu'à plusieurs années) pour l'évolution vers la phase aiguë restent méconnus.

Dans la revue générale qui suit, seront traitées les données moléculaires et biologiques concernant les deux partenaires *bcr* et *c-abl* impliqués dans la t(9 ;22)(q34 ;q11), ainsi que le gène hybride résultant *bcr-abl*.

II. BCR

II. 1. Organisation du gène et transcription

L'étude moléculaire des points de cassure sur le chromosome 22 dans le cas de la LMC Ph⁺ a révélé que la plupart d'entre eux se trouvent regroupés dans une région de 5,8 Kb désignée M-bcr pour *Major breakpoint cluster region* (Groffen *et al.*, 1984). Il a été montré par la suite que la région M-bcr fait partie d'un grand gène s'étendant sur environ 130 Kb,

comportant au moins vingt exons et dont le premier intron possède une taille de 70 Kb (Heisterkamp *et al.*, 1985). Par extension, ce gène a été désigné sous le nom de *bcr*.

La région de cassures M-bcr comporte 5 exons (b1 à b5) qui correspondent aux exons 12 à 16 du gène *bcr* (Fig. G2). Les cassures se font soit entre b2 et b3 soit entre b3 et b4. L'analyse nucléotidique de la région M-bcr a permis de mettre en évidence, entre les exons b2 et b4, la présence de séquences particulières qui pourraient être à l'origine de la haute fréquence de recombinaison au niveau de cette région (Sowerby *et al.*, 1993). Cependant, l'implication de ces séquences dans le réarrangement chromosomique du gène *bcr* n'a pas été démontrée.

Le promoteur du gène *bcr* a été localisé en 5' au niveau d'une région s'étendant sur environ 1 Kb, ressemblant à la région trouvée dans les promoteurs contrôlant l'expression des gènes dits de ménage ou *housekeeping genes*. Cette région promotrice riche en GC, contient plusieurs sites de fixation pour la protéine Sp1 et ne comprend ni la boite TATA ni la boite CAAT (Shah *et al.*, 1991).

Le gène *bcr* est transcrit de manière ubiquitaire (Lifshitz *et al.*, 1988 ; Collins *et al.*, 1987) en deux ARN messagers, respectivement de 4,5 et de 6,7 Kb. La différence entre ces deux transcrits n'a pas été établie. Tous les deux contiennent l'ensemble de la région codante, la région 3' non codante ainsi que la région 5' non codante (534 nt) riche en GC et contenant une séquence répétée inversée (Hariharan and Adams, 1987). Celle-ci peut former une structure secondaire stable ayant un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle par modulation de l'efficacité de la traduction.

L'origine des séquences additionnelles de 2,2 Kb présentes en 3' du transcrit de 6,7 Kb est inconnue.

En plus du gène *bcr*, trois autres gènes apparentés ont été identifiés. Ces gènes désignés *bcr*2, *bcr*3 et *bcr*4 sont localisés sur le chromosome 22 en 5' et 3' de *bcr*. Ils contiennent uniquement les 7 derniers exons avec les 6 derniers introns du gène *bcr* dont ils dérivent probablement. Ces trois gènes ne sont pas impliqués dans la LMC et semblent être non fonctionnels puisque leur expression n'a pas été détectée (Lifshitz *et al.*, 1988).





Figure G2: Les gènes *abl*, *bcr* et formation des gènes hybrides *bcr-abl* (Daley and Ben-Neriat, 1991)

II. 2. La protéine BCR

Le produit du gène *bcr* est une protéine de masse moléculaire apparente de 160 KDa, elle comprend 1271 aa et possède une activité sérine/thréonine kinase (Stam *et al.*, 1987; Maru *et al.*, 1991). La p160^{BCR} est une protéine complexe ayant différents domaines fonctionnels (Fig. G3):

- Dans sa partie N-terminale se trouve une région (aa 1 à 426) entièrement codée par le premier exon, elle comprend des séquences nécessaires pour l'activation du pouvoir oncogénique de la protéine hybride BCR-ABL (Muller *et al.*, 1991) et dont le rôle sera discuté plus loin. Cette région contient un domaine d'oligomérisation de type *coiled coil* (aa 1 à 63), deux motifs riches en résidus sérine (aa 197 à 385) permettant la liaison aux protéines à domaine SH2 (qui seront définies par la suite) dont la protéine c-ABL. Ces deux motifs chevauchent un domaine sérine/thréonine kinase suivi de deux paires de cystéines nécessaires à son activité enzymatique (Maru and Witte, 1991).
- La région médiane de la protéine BCR (aa 502 à 737) contient un domaine d'homologie avec l'oncogène *Dbl* qui a une fonction de facteur d'échange GDP→GTP pour la petite protéine G: CDC42. Ce domaine présente également des similitudes de séquence avec le proto-oncogène *Vav* et le produit du gène CDC24 de levure *S. Cereviseae* qui est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire (Adams *et al.*, 1992).
- La région C-terminale de BCR, non retrouvée dans la protéine hybride p210^{BCR-ABL}, contient un domaine (aa 1197 à 1226) possédant une activité GAP (GTPase activating protein) pour la petite protéine G p21RAC (Diekmann *et al.*, 1991). Cette région comprend un deuxième domaine (aa 1079 à 1240) présentant des homologies de séquence avec la sous-unité non catalytique p85 de l'enzyme phosphaditylinositol 3-kinase (Otsu *et al.*, 1991).

II. 3. Rôle biologique de BCR

La protéine BCR, de part sa localisation cytoplasmique (Dhut et al., 1990) et ses nombreux domaines fonctionnels, pourrait jouer différents rôles dans la transmission du signal



Figure G3: Représentation schématique de la protéine BCR

Sont représentés les différents domaines fonctionnels de la p160BCR et les points de jonction lors de la formation des protéines hybrides associées à la LAL et la LMC (voir texte) impliquant des protéines kinases et des petites protéines G de la superfamille Ras. Plusieurs travaux effectués à ce propos laissent supposer des fonctions importantes pour cette protéine:

- La protéine BCR a été trouvée en association, via un de ses deux motifs riches en sérine présents dans sa partie N-terminale, à un membre de la famille des protéines 14-3-3 (l'isoforme 14-3-3τ spécifique des cellules T), désigné Bap-1 pour *Bcr-associated protein 1* qui représente un substrat de l'activité sérine/thréonine kinase de la protéine BCR (Reuther *et al.*,1994). Braselmann et McCormick (1995) ont montré par la suite que la protéine BCR peut aussi s'associer à la protéine 14-3-3 β. Cette dernière interagit simultanément avec la protéine RAF (qui active la voie des MAP kinases en réponse à des signaux mitotiques) permettant ainsi, à la manière d'une protéine d'adaptation, la formation d'un complexe entre les protéines BCR et RAF. La formation de ce complexe pourrait avoir un effet biologique important, mais ceci reste à déterminer.
- La protéine BCR a été également identifiée comme substrat de la protéine tyrosine kinase c-FES qui aurait un rôle important dans la régulation de la différenciation des cellules myéloïdes (Maru *et al.*, 1995). Ce travail suppose que la phosphorylation de BCR entraîne son association avec le complexe GRB2/SOS (activateur de la protéine RAS, voir le paragraphe V.1.1, p.43) permettant ainsi de relier la tyrosine kinase cytoplasmique c-FES à la voie de RAS.
- La protéine BCR pourrait également avoir un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. L'analyse de sa localisation subcellulaire au cours du cycle a montré que cette protéine, à localisation cytoplasmique lors de l'interphase, se trouve, au cours de la mitose, dans le noyau en association avec l'hétérochromatine (Wetzler *et al.*, 1995). Ceci a suggéré que BCR aurait un rôle dans les interactions protéiques liées à la condensation de la chromatine.

Toutefois, une fonction biologique de BCR impliquant son domaine GAP (Fig. G3) a été clairement établie, par l'utilisation de souris transgéniques homozygotes. Ces souris, ayant perdu l'expression du gène *bcr* suite à son invalidation par recombinaison homologue, sont viables avec un développement apparemment normal. Cependant, l'induction d'un phénomène inflammatoire entraîne chez ces animaux un choc septique qui peut être mortel. Ce choc se fait suite à une superproduction d'anions superoxyde par les neutrophiles, superproduction due à la présence d'un taux élevé de la forme active de la protéine RAC. Ce

travail a pu ainsi démonter le rôle de BCR via sa fonction GAP (régulateur négatif de l'activité de la protéine RAC) dans la modulation de la fonction de RAC, dans les neutrophiles activés, en contrôlant l'équilibre RAC-GTP (forme active)/RAC-GDP (forme inactive) (Voncken *et al.*, 1995).

III- ABL

III. 1. Organisation du gène et transcription

Le proto-oncogène humain c-*abl* est localisé sur le bras long du chromosome 9 (bande q34) où son extrémité 5' est orientée vers le centromère. Ce gène s'étend sur environ 230 Kb et contient au moins 11 exons. Ses deux premiers exons 1b (le plus centromèrique) et 1a sont alternatifs et sont séparés par un des plus long introns connus chez l'homme (environ 200 Kb) (Bernards *et al.*, 1987), l'exon 1a est distant de 19 Kb de l'exon 2 (Shtivelman *et al.*, 1985). Deux régions promotrices distinctes ont été identifiées, la première en amont de l'exon 1a et la seconde en amont de l'exon 1b. Comme dans le cas du gène *bcr*, ces deux régions promotrices de c-*abl* sont riches en GC, contiennent des sites de fixation pour le facteur Sp1 et ne comprennent ni la boite TATA ni la boite CAAT (Shtivelman *et al.*, 1986).

Dans le cas de la LMC, la majorité des points de cassure au niveau du gène *abl* sont situés dans le premier intron de 200 Kb (Jiang *et al.*, 1990), contrairement au gène *bcr* où les points de cassure se trouvent regroupés dans la région M-bcr de 5,8 Kb. La cassure au niveau du gène c*-abl* peut également se produire, dans certains cas, en amont de l'exon lb ou entre les exons 1a et 2 (Fig. G2, p.23).

Le gène c-*abl* est transcrit en deux ARNm majeurs de 6 et 7 Kb, à partir de promoteurs et de sites d'initiation de la transcription distincts (Shtivelman *et al.*, 1986). Les deux messagers contiennent la totalité des exons en position 3' à partir de l'exon 2 qui se juxtaposent soit à l'exon 1a dans le cas du messager de 6 Kb (messager de type 1a), soit à l'exon 1b dans le cas du messager de 7 Kb (messager de type 1b). Chez la souris, on trouve les messagers de type I et de type IV qui représentent respectivement les équivalents des messagers humains 1a et 1b (Ben-Neriah *et al.*, 1986). De par la nature de leur promoteur, les transcrits du gène *abl* ont une expression ubiquitaire.

III. 2. La protéine c-ABL

Les deux messagers de c-*abl* donnent deux protéines de 145 KDa comprenant environ 1100 aa, qui diffèrent par leur partie N-terminale (1b ou 1a). La partie codée par la séquence 1b (45 aa) contient un site de myristylation qui confère à la protéine la propriété de s'ancrer aux membranes cellulaires, ce qui n'est pas le cas de la protéine contenant la région codée par l'exon 1a (26 aa). La protéine c-ABL est un membre de la superfamille des tyrosines kinases non récepteurs.

III. 2. 1. Les tyrosines kinases non récepteurs (Revue générale: Bolen, 1993)

Ce sont des protéines intracellulaires qui ont un rôle important dans la transduction des signaux contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire. Plusieurs membres de cette superfamille se trouvent associés au domaine intracellulaire de récepteurs membranaires qui n'ont pas d'activité enzymatique, permettant ainsi la transmission du signal transduit par ces récepteurs.

Les différents membres de cette superfamille, groupés dans au moins huit familles (Fig. G4), contiennent des domaines homologues communs mais aussi des domaines particuliers propres. Le domaine SH1, pour *Src homology domain 1*, correspondant au domaine catalytique, est trouvé chez tous les membres de cette superfamille. De plus, et à l'exception des familles Jak et Fak, les membres des autres familles contiennent au moins un domaine SH2 et/ou un domaine SH3 en position N-terminale par rapport au domaine catalytique.

III. 2. 2. Les domaines SH2 et SH3

(Revue générale: Pawson, 1995) :



Figure G4: Représentation schématique des domaines d'homologie des différentes familles de tyrosines kinases non recepteurs

(Bolen, 1993)

29

Les domaines SH2, constitués d'une centaine d'aa, reconnaissent spécifiquement des motifs peptidiques contenant un résidu tyrosine phosphorylé entouré d'aa particuliers. Généralement, ce sont les trois aa situés après la tyrosine phosphorylée qui semblent être importants pour déterminer la spécificité d'interaction du ligand avec le domaine SH2.

Les domaines SH2 ont des affinités variables selon les différents motifs à tyrosine phosphorylée rencontrés. Ces domaines présentent une structure avec une première poche, formée d'aa très conservés entre les différents domaines SH2, qui permet l'interaction avec le résidu tyrosine phosphorylé. Une deuxième région formée d'aa très variables, pouvant former une seconde poche, reconnaît quant à elle spécifiquement et interagit avec les aa en C-terminal de la phosphotyrosine. La régulation de l'interaction des domaines SH2 avec leurs ligands est déterminée par l'état de phosphorylation du résidu tyrosine.

Les domaines SH3 sont constitués d'environ 60 aa et possèdent une structure globulaire avec un grand sillon formé de deux feuillets β . Ces domaines reconnaissent des motifs peptidiques riches en résidus proline, formés d'une dizaine d'aa. Ces motifs adoptent une structure appelée hélice poly-proline de type II, avec trois aa par tour d'hélice. Deux tours de cette hélice interagissent chacun avec un des sites du sillon du domaine SH3, le troisième tour d'hélice permet de stabiliser cette liaison. Les domaines SH3 présentent des affinités variables pour les différents ligands mais ces affinités sont moins strictes que celles présentées par les domaines SH2. La spécificité d'interaction serait conférée d'une part par les résidus non-proline du motif ligand et d'autre part par les aa variables qui flanquent les feuillets β des domaines SH3. L'interaction des domaines SH3 avec leurs ligands semble être régulée soit par la conformation des protéines qui contiennent le domaine SH3 et celles contenant le motif ligand, soit par la phosphorylation du motif ligand qui devient ainsi inaccessible au domaine SH3.

L'élucidation du rôle des domaines SH2 et SH3 a révolutionné la compréhension des mécanismes de transduction signalétique. Le domaine SH2 en se fixant à des motifs phosphotyrosine affecte de plusieurs manières la fonction des protéines qui le contiennent: on peut citer la stimulation de leur activité enzymatique, l'interaction avec leurs substrats et leur relocalisation dans la cellule. De même, le domaine SH3 en assurant les interactions protéiques permet aux protéines de se relocaliser dans la cellule et d'effectuer leurs fonctions biologiques. Les domaines SH2 et SH3 trouvés dans les protéines tyrosines kinases non

récepteurs sont également présents, séparément ou ensemble, dans de nombreuses autres protéines comme les phosphatases, les protéines GAP (régulateurs négatifs de l'activité des protéines de la superfamille RAS), certaines protéines du cytosquelette et également les protéines adaptatrices qui sont dépourvues d'activité catalytique, impliquant ainsi leurs rôles dans différentes voies signalétiques.

III. 2. 3. Les domaines fonctionnels de c-ABL

La protéine c-ABL, membre de la superfamille des protéines tyrosines kinases non récepteurs, possède plusieurs domaines fonctionnels (Fig. G5). Dans sa partie N-terminale se trouvent les trois domaines homologues de Src : SH3, SH2 et le domaine catalytique SH1. Cette protéine possède un domaine variable, en position N-terminale à SH3, de 26 aa dans le cas de la protéine c-ABL de type 1a (exon 1a, protéine de type I chez la souris) et de 45 aa dans le cas de la protéine c-ABL de type 1b (protéine de type IV chez la souris). La protéine de type 1b possède un signal de myristylation, elle va subir une modification post-traductionnelle qui consiste en la myristylation d'un résidu glycine en position +2 de la séquence primaire (Towler *et al.*, 1987), lui octroyant ainsi la propriété de s'ancrer aux membranes cellulaires. Cette modification est également observée chez les membres de la famille Src mais pas chez les autres familles tyrosines kinases non récepteurs.

Les domaines SH3 et SH2 jouent un rôle important dans la régulation de l'activité catalytique de c-ABL. Le domaine SH2 est requis pour l'interaction de la protéine c-ABL avec ses substrats afin de les phosphoryler (Mayer *et al.*, 1995). En revanche, le domaine SH3 a été incriminé en tant que régulateur négatif de l'activité tyrosine kinase. En effet, des mutations au niveau de ce domaine stimulent l'activité enzymatique de c-ABL *in vivo* et démasquent ses propriétés transformantes (Jackson *et al.*, 1993 ; Mayer and Baltimore, 1994). L'inhibition exercée par le domaine SH3 serait médiée via une protéine cellulaire qui se fixerait sur ce domaine afin d'inhiber l'activité enzymatique de c-ABL (Pendergast *et al.*, 1991a ; Mayer and Baltimore, 1994). Ceci a été suggéré par le fait que le domaine SH3 n'a pas d'effet inhibiteur sur l'activité tyrosine kinase de c-ABL ni *in vitro* ni lors de son expression dans des cellules d'insectes. Par ailleurs, il a été montré que la protéine 3BP-1, qui



Figure G5: Représentation schématique des domaines fonctionnels de la protéine c-ABL

stimule l'activité GTPasique de certains membres de la famille des petites protéines G: Rho et dont le domaine GAP est homologue à celui des protéines BCR et n-chimerine, se fixe *in vitro*, via un domaine riche en proline, au domaine SH3 de c-ABL (Cicchetti *et al.*, 1992; 1995). Cependant, l'implication de la protéine 3BP-1 dans l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de c-ABL n'a pas été démontrée. Il a été également proposé que le domaine SH3 inhiberait l'activité enzymatique de c-ABL en interagissant en *cis* avec un domaine riche en proline, en position C-terminale par rapport au domaine SH1, pour donner une conformation inactive dans laquelle le domaine catalytique serait masqué et donc inaccessible (Wang, 1993). Mais récemment, Dai et Pendergast (1995) ont identifié une nouvelle protéine, désignée Abi-2 pour *Abl interactor protein*, qui semble jouer un rôle important dans la régulation de l'activité de la protéine c-ABL. Abi-2 s'associe via un domaine riche en proline dans sa partie N-terminale et un domaine SH3 dans sa partie C-terminale à deux domaines de la protéine c-ABL, respectivement le domaine SH3 et le domaine riche en proline situé dans la région C-terminale. La protéine c-ABL ainsi complexé, se trouve alors dans un état inactif.

La protéine c-ABL forme avec le proto-oncogène ARG (*Abelson-related gene*) une famille à part (Kruh *et al.*, 1990) se distinguant par la présence, en plus des domaines SH, d'un large domaine C-terminal.

Le domaine C-terminal de c-ABL, d'environ 500 aa et codé par le dernier exon, lui confère des propriétés particulières. Ce domaine comporte un signal de localisation nucléaire, une région de fixation à l'ADN et un site de fixation aux molécules d'actine. Ainsi, la protéine c-ABL a en partie une localisation cytoplasmique où elle va s'associer soit à la membrane plasmique soit aux filaments d'actine, mais sa localisation reste principalement nucléaire (van Etten *et al.*, 1989 ; McWhirter and Witte, 1991) où elle se trouve associée à l'ADN (Kipreos and Wang, 1992). Le domaine de liaison à l'ADN de c-ABL serait présent dans une région riche en proline et en aa basiques, ne présentant aucune homologie avec les domaines classiques connus pour fixer l'ADN. La protéine c-ABL a été trouvée dans un complexe protéique qui fixe la séquence EP de l'*enhancer* du virus de l'hépatite B (Dikstein *et al.*, 1992). Cependant, la séquence nucléotidique spécifique pour la fixation de c-ABL et/ou son mécanisme de liaison à l'ADN restent à déterminer.

La localisation subcellulaire de c-ABL suggère qu'elle peut avoir des fonctions à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme, ces fonctions peuvent être soit indépendantes soit complémentaires.

III. 2. 4. Rôle biologique

La fonction de la protéine c-ABL au niveau du cytoplasme est peu étudiée. Ses différents domaines fonctionnels lui confèrent des fonctions potentielles dans la transduction de signaux de croissance ou de différenciation. Les protéines d'adaptation CRK/CRKL (pour *CRK-like protein*), comprenant un domaine SH2 en position N-terminale suivi de deux domaines SH3, ont été identifiées comme substrats de la protéine c-ABL. Elles s'associent via un de leurs domaines SH3 à la région riche en proline de c-ABL située dans son domaine C-terminal (Ren *et al.*, 1994; Feller *et al.*, 1994) et peuvent ainsi la relier à des complexes protéiques signalétiques (Sattler *et al.*, 1996).

En revanche, la fonction nucléaire de c-ABL a fait l'objet de nombreuses études suggérant son implication dans le cycle cellulaire mais la nature de cette fonction est controversée. Les premiers travaux effectués ont attribué à la protéine c-ABL un rôle de régulateur négatif du cycle cellulaire, ressemblant à celui des gènes suppresseurs de tumeurs p53 et pRB (Sawyers *et al.*, 1994). Cependant, et à l'appui de nombreux arguments, c-ABL semble plutôt fonctionner comme un régulateur positif du cycle cellulaire.

L'activité tyrosine kinase de c-ABL est régulée au cours du cycle cellulaire par la protéine pRB (Welch and Wang, 1993). Pendant la quiescence et la phase G1, la protéine pRB hypophosphorylée (forme active) se fixe de façon spécifique via sa poche C (aa 768-869) au domaine ATP-binding (dans le domaine catalytique tyrosine kinase) de c-ABL et inhibe son activité tyrosine kinase. La phosphorylation de pRB pendant la transition G1/S (forme inactive) entraîne la libération de la protéine c-ABL et donc la levée d'inhibition de son activité tyrosine kinase. Ainsi, le fait que pRB cible la protéine c-ABL pour l'inhiber constitue un argument en faveur du rôle de c-ABL comme activateur du cycle cellulaire. D'ailleurs, Welch et Wang (1995a) ont montré que la surexpression de la protéine c-ABL dans des cellules d'ostéosarcome humain, abolit l'effet inhibiteur de croissance de pRB et occasionne l'entrée en cycle de ces cellules. De plus, Rosti *et al.* (1995) ont montré récemment, par

l'utilisation d'oligonucléotides antisens, que l'inhibition de l'expression de c-ABL dans des cellules hématopoïétiques empêche l'entrée de ces cellules en phase S (synthèse d'ADN) du cycle cellulaire, arguant ainsi en faveur d'un rôle activateur de c-ABL.

En plus de l'activité tyrosine kinase, la propriété de fixation à l'ADN de c-ABL est également régulée pendant le cycle cellulaire (Kipreos and Wang, 1992). En effet, la protéine c-ABL est phosphorylée au début de la mitose par la protéine cdc2 kinase, sur des résidus sérine/thréonine localisés dans le domaine de liaison à l'ADN (aa 836-935), et déphosphorylée pendant l'interphase juste après la mitose (Kipreos and Wang, 1990). La protéine c-ABL sous forme phosphorylée perd sa capacité de liaison à l'ADN, alors que la forme déphosphorylée se fixe à l'ADN (Kipreos and Wang, 1992). La protéine cdc2 kinase régule de la même manière d'autres facteurs qui se fixent à l'ADN (c-MYC, c-MYB, histone H1,...) pour permettre l'inhibition de la transcription à la fin de chaque cycle.

La protéine c-ABL pourrait être impliquée dans les événements de transcription liés au cycle cellulaire, en régulant l'expression de gènes nécessaires à l'entrée en phase S. D'ailleurs, la sous unité catalytique de l'ARN polymérase II: RPB1 a été identifiée, par des expériences réalisées *in vitro*, comme une cible de la protéine c-ABL qui la phosphoryle sur plusieurs résidus tyrosine au niveau de son domaine C-terminal (Baskaran *et al.*, 1993; Duyster *et al.*, 1995). Baskaran *et al.* (1996) ont montré très récemment que cette phosphorylation est retrouvée *in vivo* et que c-ABL régule la transcription via la phosphorylation de l'ARN polymérase II. En outre, la protéine c-ABL pourrait réguler l'activité de certains facteurs de transcription lors de son association avec la protéine pRB. En effet, cette dernière possède, en plus de la poche C où se fixe la protéine c-ABL, un deuxième domaine: la poche A/B (aa 379-768), connu pour sa propriété de fixer, quand pRB est hypophosphorylée, différentes protéines dont le facteur de transcription E2F. Les deux poches de pRB sont simultanément occupées et la protéine c-ABL pourrait alors interagir quand elle est associée à la poche C avec les autres protéines fixées à A/B (Welch and Wang, 1995b).

Cependant, le rôle de la protéine c-ABL dans le cycle cellulaire n'a pas pu être démontré par les analyses génétiques utilisant des souris exprimant la protéine c-ABL à activité tyrosine kinase défectueuse ou à domaine C-terminal délété (Tybulewicz *et al.*, 1991; Schwartzberg *et al.*, 1991). Ces souris ne meurent qu'après la naissance, elles présentent des
déficiences dans le développement des cellules T et B mais elles ont un développement embryonnaire apparemment normal, suggérant que la protéine c-ABL n'est pas indispensable au déroulement du cycle cellulaire. Néanmoins, ces analyses ne peuvent pas permettre de conclure quant au rôle de c-ABL puisque sa fonction peut être compensée par d'autres protéines. En effet, l'introduction chez la drosophile de mutations dans l'homologue de c-*abl*: D*abl*, additionnées de mutations dans d'autres gènes entraîne la mort embryonnaire alors que l'introduction de mutations uniquement au niveau du c-ABL, entraîne la mort postnatale (Elkins *et al.*, 1990; Gertler *et al.*, 1989).

Ainsi, la protéine c-ABL pourrait avoir un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire, de la transcription et d'autres événements non encore identifiés. Cette protéine à expression ubiquitaire pourrait agir spécifiquement au niveau de l'hématopoïèse, principalement pour permettre le développement normal de la lignée myéloïde, comme cela a été suggéré, par des expériences utilisant des oligonucléotides antisens (Caracciolo *et al.*, 1989; Rosti *et al.*, 1992)

III. 2. 5. Activation et pouvoir oncogénique de c-ABL

La protéine c-ABL possède un pouvoir oncogénique qui se révèle suite à son activation par différents mécanismes, impliquant généralement des délétions et sa fusion avec des séquences virales ou cellulaires (revue générale: Chung and Wang, 1995). Dans le virus félin HZII-FSV (Hardy-Zukerman-II sarcoma virus), la protéine c-ABL délétée de son domaine C-terminal se trouve insérée entre les séquences virales *gag* et *pol*. Par contre dans le virus Abelson de leucémie murine (A-MuLV), c-ABL est délétée dans sa partie N-terminale (domaine variable et domaine SH3) et se trouve fusionnée à la séquence virale *gag*. Chez l'homme, dans le cas de la LMC et de la LAL Ph⁺, c-ABL est activée suite à sa fusion avec les séquences BCR (Fig. G6).

Contrairement à c-ABL normale, les protéines oncogéniques ont une activité tyrosine kinase élevée constitutive et une localisation principalement ou exclusivement cytoplasmique, elles transforment des cellules *in vitro* et sont à l'origine de leucémies *in vivo*.

Structure des protéines		MM	Localisation	Activité kinase in vivo	fixation à l'ADN	Trf 3T3	IS	Leucémie
V SH3SH2 SH1 NTS DB AB	1b c-Abi 1a	p145	N,C	-	++	-		ND
Gag	v-Abl murin	p160	с	+++	ND	+	+	+
	v-Abl félin	P110	с	+++	ND	+	ND	+
	LMC BCR/ABL	p210	с	+++		-	+	+
	LAL BCR/ABL	p190	с	+++	ND	ND	+	+

Figure G6: La protéine c-ABL et ses formes oncogéniques. *(Chung and Wong, 1995)*

I groupement myristyl; V: région variable codée par le premier exon; NTS: signal de localisation nucléaire; DB: domaine de liaison à l'ADN; AB: domaine de liaison à l'actine; N: nucléaire; C: cytoplasmique; Trf 3T3: transformation des cellules 3T3; IS: indépendance vis à vis des facteurs de croissance; leucémie: initiation de leucémie in vivo; ND: non déterminé.

IV. BCR-ABL dans la LMC

IV. 1. Organisation du gène et transcription

Le gène *bcr-abl*, localisé sur le chromosome Ph associé à la LMC, résulte de la fusion de la quasi totalité des exons du gène c-*abl* (généralement à partir de l'exon 1a mais parfois à partir de l'exon 1b) aux 13 ou 14 premiers exons du gène *bcr* (selon que la cassure ait lieu entre b2 et b3 ou entre b3 et b4 de la région M-bcr). Dans le cas du gène *bcr-abl* associé à la LAL, seul le premier exon du gène *bcr* est présent à côté des exons *abl* puisque la cassure sur le chromosome 22 a lieu dans le premier intron du gène *bcr* (Fig. G2, p.23). Les séquences des gènes *bcr* et *abl* fusionnent dans la même orientation transcriptionnelle et le cadre de lecture reste conservé dans le gène hybride.

Dans le cas de la LMC, le gène *bcr-abl* est transcrit en un ARNm d'environ 8,5 Kb. Lors de l'épissage, l'exon 1a et l'exon 1b, quand il est présent dans le gène hybride, sont éliminés par épissage alternatif (Shtivelman *et al.*, 1986). Le messager mature contient alors les exons en 5' du gène *bcr* jusqu'à, selon le point de cassure, l'exon 13 ou 14 (respectivement l'exon b2 et b3 de la région M-bcr) fusionnés toujours à l'exon 2 de c-*abl*. Dans le cas de la LAL, le messager comporte l'exon 1 du gène *bcr* en fusion avec l'exon 2 de c-*abl*, il possède une taille d'environ 7 Kb.

La transcription du gène hybride est sous le contrôle du promoteur du gène *bcr*, son taux est similaire à celui de *bcr* normal (Shah *et al.*, 1991). Les messagers hybrides sont plus stables que ceux de c-*abl*, ils ont la même durée de vie que les messagers du gène *bcr* (Collins *et al.*, 1987).

IV. 2. La protéine BCR-ABL dans la LMC

Le messager hybride mature de 8,5 Kb est traduit en une protéine de 210 KDa qui contient les 902 ou les 927 premiers aa de BCR (selon que la cassure ait lieu entre b2 et b3 ou entre b3 et b4) dans sa partie N-terminale et environ 1100 aa d'ABL dans sa partie C-terminale. Ainsi, la partie N-terminale de la protéine p210^{BCR-ABL} comporte les séquences de la

protéine BCR comprenant le domaine d'oligomérisation, les motifs de liaison aux domaines SH2, le domaine sérine/thréonine kinase et le domaine d'homologie facteur d'échange. La partie C-terminale de la protéine hybride contient la totalité des domaines de la protéine ABL à l'exception du domaine variable (Fig. G7).

Dans le cas de la LAL, le produit du gène est une protéine de 185-190 KDa. Celle-ci contient les même domaines que la p210^{BCR-ABL} hormis le domaine d'homologie facteur d'échange de BCR, puisqu'elle ne comprend que les 426 premiers aa de la protéine BCR.

La p210^{BCR-ABL}, comme la p190^{BCR-ABL}, a une localisation exclusivement cytoplasmique malgré la présence du signal de localisation nucléaire (Dhut *et al.*, 1990). Cette protéine possède une activité tyrosine kinase constitutive (Konopka *et al.*, 1984; Kloetzer *et al.*, 1985) corrélée à son pouvoir oncogénique (Lugo *et al.*, 1990).

Le pouvoir oncogénique de la protéine BCR-ABL a été bien démontré et semble être spécifique des lignées hématopoïétiques. La protéine BCR-ABL induit la transformation *in vitro* des cellules myéloïdes et lymphoïdes dont la prolifération devient indépendante des facteurs de croissance (Daley and Baltimore, 1988; Mandanas *et al.*, 1992). Elle induit également la transformation des cellules hématopoïétiques immatures qui vont former des colonies *in vitro* (McLaughlin *et al.*, 1987). Mais contrairement à v-ABL, la protéine p210^{BCR-ABL} est incapable d'induire la transformation des fibroblastes NIH-3T3 qui semble requérir le groupement myristyl permettant l'ancrage de la protéine à la membrane cellulaire. En effet, une protéine hybride GAG-BCR-ABL myristylée, grâce à la présence des séquences virales *Gag*, est capable de transformer les NIH-3T3 (Daley *et al.*, 1987; 1992). Cependant, la p210^{BCR-ABL} transforme partiellement la lignée fibroblastique Rat-1 et nécessite la coopération de l'oncogène v-Myc pour entraîner une transformation totale (Lugo and Witte, 1989).

L'implication de la protéine hybride dans la LMC a été démontrée *in vivo* par l'utilisation de modèles animaux : des souris irradiées et greffées par des cellules médullaires exprimant la p210^{BCR-ABL} développent un syndrome proche de le LMC (Daley *et al.*, 1990; Kelliher *et al.*, 1990), alors que des souris transgéniques exprimant la p190^{BCR-ABL} développent une LAL (Heisterkamp *et al.*, 1990).



Figure G7: Représentation schématique des protéines BCR-ABL

oli: domaine d'oligomérisation; SH: *src homology domain*; NTS: signal de localisation nucléaire; DB: domaine de liaison à l'ADN; AB: domaine de fixation à l'actine. IV. 3. Mécanisme de stimulation de l'activité d'ABL au sein de la protéine BCR-ABL

La présence des séquences BCR est responsable de l'activation d'ABL et de ses conséquences sur les propriétés transformantes de la protéine hybride. Deux domaines de la protéine BCR, codés par le premier exon, sont indispensables au pouvoir oncogénique de BCR-ABL (Muller *et al.*, 1991). Les 63 premiers aa de BCR (domaine 1 ou domaine d'oligomérisation) stimulent à la fois l'activité kinase et la propriété de fixation aux filaments d'actine d'ABL dans la protéine hybride (McWhirter and Witte, 1991). La protéine p210^{BCR-ABL} qui a une localisation exclusivement cytoplasmique possède une affinité de liaison à l'actine plus grande que celle de la protéine c-ABL, cette liaison est indispensable au pouvoir transformant de la protéine hybride (McWhirter and Wang, 1993).

Le domaine de BCR contenant les deux motifs riches en sérine (aa 197 à 385 = domaine 2) semble également requis pour l'activation oncogénique de la protéine hybride. Ces motifs interagissent avec le domaine SH2 d'ABL suite à leur phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine (Pendergast *et al.*, 1991b). Il a été suggéré que cette interaction aurait pour conséquence la neutralisation de l'effet inhibiteur du domaine SH3. Cependant, les domaines 2 et SH2 ne semblent pas nécessaires pour induire l'indépendance vis à vis de l'IL-3 qui requiert pourtant une protéine hybride active. En outre, le domaine 1 de BCR fusionné à c-ABL est capable à lui seul de l'activer, suggérant que l'interaction du domaine 2 avec le domaine SH2 ne serait pas à l'origine de l'abolition de l'effet inhibiteur de SH3 au sein de la protéine hybride (McWhirter and Witte, 1991 ; McWhirter *et al.*, 1993).

Un modèle d'activation de la protéine hybride par les séquences BCR a été proposé (McWhirter *et al.*, 1993). Le premier domaine de 63 aa, qui correspond à un domaine d'oligomérisation de type *coiled-coil*, permet la formation de tétramère p210^{BCR-ABL}, il s'en suit la transphosphorylation des molécules et leur activation. La présence au sein du tétramère de quatre sites de liaison à l'actine va stimuler fortement l'interaction des molécules p210^{BCR-ABL} à l'actine. Ainsi, ce domaine serait responsable de la stimulation à la fois de l'activité tyrosine kinase de la protéine hybride et de sa fixation à l'actine. L'interaction du



2

Fonction tyrosine kinase activée

Figure G8: Modèle du mécanisme d'activation d'ABL par les séquences BCR au sein de la p210BCR-ABL (McWhirter et al., 1993) deuxième domaine de BCR avec le motif SH2 d'ABL serait nécessaire à l'activation de la fonction de SH2 et à son interaction avec ses substrats à tyrosine phosphorylée (Fig. G8).

Le premier domaine de BCR (63 aa) permet aussi à la protéine hybride d'interagir avec la protéine $p160^{BCR}$ et de la phosphoryler sur des résidus tyrosine localisés dans la région codée par le premier exon, les conséquences de cette phosphorylation ne sont pas déterminées (Liu *et al.*, 1993). Les équivalents de ces résidus tyrosine de la $p160^{BCR}$ sont autophosphorylés dans la protéine hybride. Parmi ces résidus se trouvent les tyrosines 177, 183 et 360. La phosphorylation de la tyrosine 360 entraînerait l'inhibition de l'activité sérine/thréonine kinase de BCR au sein de la protéine hybride (Liu *et al.*, 1996) alors que celle de la tyrosine 177 permet de relier la protéine hybride à la voie signalétique de RAS (Puil *et al.*, 1994).

V. Mécanismes d'action de la protéine p210^{BCR-ABL}

Les cellules fibroblastiques Rat-1 et les cellules hématopoïétiques ont été utilisées comme modèles de transformation cellulaire *in vitro* afin d'identifier les voies de transmission du signal et les éléments impliqués dans la transformation par BCR-ABL.

V. 1. Implication de la voie de p21RAS et de c-MYC

V. 1. 1. La famille des protéines RAS

La protéine p21RAS est un membre de la superfamille des petites protéines G qui fixent le GTP/GDP et dont les principales sous-familles sont RAS, RHO, RAB et RAN. Ces protéines jouent un rôle important dans la régulation de fonctions cellulaires variées. Les sous-familles RAS et RHO sont impliquées dans la transmission du signal de la membrane vers le noyau. Toutes ces protéines possèdent deux domaines essentiels: un domaine au niveau duquel se fixe le nucléotide GTP ou GDP et un domaine C-terminal dont l'extrémité contient une séquence particulière, qui après modification post-traductionnelle (farnésylation), va permettre à ces protéines de se localiser au niveau des membranes cellulaires. Ces protéines sont régulées positivement par les facteurs d'échange et négativement par les GAP (*GTPase Activating Proteins*) (Fig. G9). La petite protéine G fixant le GDP est inactive, elle est complexée à une cible spécifique de cette forme. Le facteur d'échange permet de remplacer le GDP par le GTP, il s'en suit la dissociation de la protéine spécifique de la forme GDP. La protéine G fixant le GTP, alors sous forme active, va interagir spécifiquement avec ses effecteurs afin de transmettre son signal. Par la suite, une protéine GAP va intervenir pour stimuler l'hydrolyse du GTP en GDP et le retour ainsi à la forme inactive fixant le GDP (Revue générale: Chardin, 1994).

Le principal facteur d'échange de RAS est la protéine SOS (SOS1 et SOS2). Cette protéine est complexée de façon constitutive, via un domaine riche en proline dans sa partie Nterminale, à un domaine SH3 de la protéine d'adaptation GRB2, constituée d'un domaine SH2 central flanqué de deux domaines SH3. L'activation d'un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase est suivie de son autophosphorylation sur des résidus tyrosine et de la phosphorylation de ses substrats. La protéine SOS est alors transloquée sous la membrane plasmique, suite à l'interaction directe de GRB2, via son domaine SH2, à une phosphotyrosine spécifique du domaine intracellulaire du récepteur. La protéine GRB2 peut également être recrutée au niveau du récepteur activé en se fixant à la phosphotyrosine d'une protéine d'adaptation substrat du récepteur activé, tel que la protéine d'adaptation SHC qui interagit avec le récepteur via son domaine SH2 et avec GRB2 via sa tyrosine pohosphorylée. La protéine SOS transloquée se trouve ainsi à proximité de RAS et l'active en permettant l'échange du GDP fixé en GTP. La protéine RAS activée interagit alors avec ses effecteurs spécifiques et active les voies des MAPKinases (Mitogen Activated Protein Kinases). Les MAPKinases correspondent à une cascade de protéines sérine/thréonine kinase activées suite à leurs phosphorylations, qui jouent un rôle important dans la transmission des signaux de la membrane vers le noyau.

Chez les vertébrés, la voie des MAPKinases la mieux connue est celle de ERK (Fig. G10). La protéine RAS activée induit la translocation de la protéine sérine/thréonine kinase RAF, une MAPKKK (K=Kinase), au niveau interne de la membrane plasmique où elle va être activée suite à sa phosphorylation. La protéine RAF sous forme active phosphoryle les protéines cytoplasmiques MEK1/MEK2 (MAPKK) qui à leur tour vont activer ERK1/ERK2 (MAPKs). Une fraction de ces protéines va être transloquée dans le noyau afin de phosphoryler des



Figure G9: Le cycle des petites protéines G

(Chardin, 1994)



Figure G10: Illustration simplifiée des voies de ERK et de JUNK

ELK1 et SAP1: des facteurs de transcription de la famille TCF (ternary complex factors), qui contrôlent la transcription du gène c-fos.

PSKs: protéines sérine/thréonine kinases

Tyrosine kinase récepteur ou non, ou substrats phosphorylées sur résidu tyrosine

Voir texte pour les commentaires

facteurs de transcription et stimuler l'expression de gènes impliqués dans la prolifération ou la différenciation cellulaire dont le gène c*-fos*. ERK activée peut aussi phosphoryler directement des protéines cytoplasmiques qui passent par la suite dans le noyau et phosphorylent d'autres facteurs de transcription (Revue générale: Hunter, 1995).

La protéine RAS activée peut également interagir avec une autre voie de MAPKinases, distincte de celle de ERK : celle de JNK/SAPKs (*Jun N-terminal/Stress-Activated Protein kinases*). La protéine sérine/thréonine kinase MEKK1 étant la MAPKKK, va activer la JNKK qui à son tour active la JNK, celle-ci va entrer dans le noyau pour phosphoryler le facteur de transcription c-JUN. Le mécanisme d'activation de MEKK1 par la protéine RAS est inconnu, RAC 1 la petite protéine G de la famille Rho est un intermédiaire entre RAS et MEKK1 mais le mécanisme d'activation de RAC par RAS et celui de MEKK1 par RAC ne dont pas établis (Minden *et al.*, 1995).

V. 1. 2. Activation de la voie de RAS par BCR-ABL

L'implication de cette voie dans la transmission du signal par la protéine p210^{BCR-ABL} a été très étudiée. Des mutations qui activent RAS ont été observées dans de nombreuses leucémies myéloïdes (Janssen *et al.*, 1987) à l'exception de la LMC à chromosome Ph (Urbano-Ispizua *et al.*, 1992). Ceci a suggéré que la protéine RAS, à défaut de mutations, serait dérégulée dans sa fonction par la protéine p210^{BCR-ABL}. Ainsi, les approches biochimiques et génétiques, utilisées pour étudier le rôle de la p21RAS, ont montré que l'activation de cette protéine est nécessaire pour la transformation induite par la protéine p210^{BCR-ABL}. En effet, dans les cellules transformées par BCR-ABL la protéine RAS se trouve dans un état actif dont le maintien dépend de l'activité tyrosine kinase de la protéine hybride (Mandanas *et al.*, 1993). De plus, l'inhibition de l'activité de RAS empêche la transformation des fibroblastes et des cellules hématopoïétiques, induite par BCR-ABL (Sawyers *et al.*, 1995).

La protéine d'adaptation GRB2 semble jouer un rôle important dans le mécanisme d'activation de la voie de RAS par la protéine BCR-ABL. Des mutants non fonctionnels (dominants négatifs) de GRB2, ne pouvant plus interagir avec la protéine SOS, inhibent spécifiquement l'activation de RAS par BCR-ABL ainsi que la transformation cellulaire qui

s'en suit (Gishizky *et al.*, 1995). La protéine p210^{BCR-ABL} est autophosphorylée sur le résidu tyrosine 177, situé dans le domaine 2 des séquences BCR, elle interagit spécifiquement via ce résidu avec le domaine SH2 de GRB2. Le facteur d'échange SOS, complexé de façon constitutive à GRB2, se trouve ainsi transloqué au niveau membranaire où il va activer la protéine RAS (Pendergast *et al.*, 1993; Puil *et al.*, 1994).

La protéine p210^{BCR-ABL} peut également activer la fonction de RAS sans interaction directe avec GRB2. En effet, la protéine SHC est phosphorylée sur des résidus tyrosine dans les cellules transformées par la protéine hybride. Le recrutement de SOS au niveau de la membrane et l'activation de RAS se feraient dans ce cas suite à l'association du complexe GRB2-SOS avec la protéine SHC phosphorylée (Goga *et al.*, 1995; Gishizky *et al.*, 1995; Puil *et al.*, 1994). Ainsi, l'activation de RAS par BCR-ABL est supposée résulter, suite à la formation de différents complexes GRB2. Cependant, la protéine hybride pourrait aussi activer la voie de RAS en inhibant son régulateur négatif la protéine GAP. La p120GAP de RAS est phosphorylée sur des résidus tyrosine dans les cellules exprimant la protéine BCR-ABL, dans lesquelles elle forme un complexe stable avec la protéine hybride (Druker *et al.*, 1992) et son activité diminuée s'accompagne de l'augmentation du pool intracellulaire de RAS-GTP et de l'hyperphosphorylation de RAF-1 (Skorski *et al.*, 1994).

Les effecteurs de RAS impliqués suite à son activation par la protéine hybride ne sont pas bien déterminés. Cependant, la p210^{BCR-ABL} semble impliquer préférentiellement la voie des JUN-Kinases qui aboutit à l'activation du facteur de transcription c-JUN (Raitano *et al.*, 1995).

V. 1. 3. Implication de c-MYC

L'implication de c-MYC dans la transformation par BCR-ABL est basée sur les résultats obtenus chez les souris transgéniques v-Abl, qui montraient que la formation de plasmacytomes par l'oncogène v-ABL nécessitait l'activation de c-MYC (Rosenbaum *et al.*, 1990). De plus, v-ABL rend des cellules myéloïdes indépendantes de l'IL-3 en stimulant spécifiquement l'expression de c-MYC (Cleveland *et al.*, 1989). La protéine p210^{BCR-ABL} nécessite de son côté la coopération de MYC pour permettre la transformation totale des fibroblastes Rat-1 (Lugo and Witte, 1989). Par la suite, les résultats obtenus en utilisant des

mutants dominants négatifs de MYC ont montré que celui-ci constitue un élément essentiel pour la transformation induite par les différentes formes oncogéniques d'ABL. Il faut rappeler que le facteur de transcription c-MYC nécessite l'association avec son partenaire la protéine MAX pour pouvoir se fixer à l'ADN et activer la transcription des gènes cibles. Les mutants dominants négatifs ont des domaines de dimérisation intacts mais possèdent des mutations soit dans le domaine de transactivation soit dans le domaine de liaison à l'ADN. Ces mutants vont alors inhiber la fonction de c-MYC normal, en entrant en compétition pour la dimérisation avec la protéine MAX et former ainsi des hétérodimères non fonctionnels. L'expression de MYC sous forme dominant négatif, qui inhibe la fonction du c-MYC endogène, réduit fortement la transformation des cellules Rat-1 par les protéines v-ABL et p210^{BCR-ABL} et inhibe la transformation des cellules hématopoïétiques immatures induite *in vitro* par BCR-ABL. Ceci suggère alors que c-MYC agirait en aval des oncogènes ABL (Sawyers *et al.*, 1992). Toutefois, ces résultats n'excluent pas le fait que MYC pourrait constituer une voie indépendante qui coopère avec BCR-ABL pour la transformation cellulaire.

C-MYC qui augmente le pouvoir transformant de la p210^{BCR-ABL} in vitro, pourrait in vivo jouer un rôle dans la progression de la LMC de la phase chronique vers la crise blastique. En effet, cette progression s'accompagne de la perte de la différenciation terminale, or l'inhibition de l'expression de MYC semble nécessaire pour la différenciation terminale des cellules hématopoïétiques (Holt *et al.*, 1988; Prochownik and Kukowska, 1986; Prochownik *et al.*, 1988; Yokoyama and Imamoto, 1987).

La relation entre les voies de MYC et de RAS, qui semblent nécessaires à la transformation induite par BCR-ABL, n'est pas bien établie. Une étude a supposé que ces deux voies sont distinctes et complémentaires (Afar *et al.*, 1994) en se basant sur le fait que l'expression de c-MYC restaure la transformation des cellules Rat-1 par la protéine BCR-ABL mutée au niveau de son domaine SH2 mais ne la restaure pas lorsque la protéine hybride est mutée au niveau de la tyrosine 177, requise pour l'interaction directe avec GRB2 et l'activation de RAS. Cependant, la même équipe a montré par la suite que le mutant tyrosine 177, qui n'interagit plus avec GRB2, est toujours capable d'activer la voie de RAS ceci en phosphorylant la protéine SHC, phosphorylation qui nécessite un domaine SH2 intact de

BCR-ABL (Goga *et al.*, 1995). Il n'est donc pas possible d'affirmer que MYC et RAS constituent deux voies indépendantes en se basant uniquement sur l'incapacité de MYC à complémenter la mutation au niveau de la tyrosine 177 de BCR-ABL pour permettre la transformation. De plus, dans certains modèles de transformation cellulaire c-MYC a été identifié comme étant un effecteur de RAS (Sklar *et al.*, 1991).

V. 2. Inhibition de l'apoptose par la protéine p210^{BCR-ABL}

La plupart des modèles cellulaires utilisés in vitro pour rechercher les mécanismes d'action de la protéine hybride ne reflètent pas les événements biologiques à l'origine de la LMC. Les résultats obtenus dans les fibroblastes sont difficilement extrapolables in vivo puisque ces cellules ne représentent pas la cible naturelle de transformation par BCR-ABL. Les cellules hématopoïétiques utilisées pour étudier les mécanismes d'action de la protéine hybride sont indépendantes des facteurs de croissance suite à leur transformation par BCR-ABL, alors que les cellules hématopoïétiques immatures transformées in vitro par BCR-ABL requièrent toujours la présence des facteurs de croissance et n'acquièrent une croissance indépendante de ces facteurs qu'après plusieurs semaines de culture (Gishisky and Witte, 1992) suggérant ainsi que l'indépendance vis à vis des facteurs de croissance ne constitue pas le premier événement découlant de l'expression de BCR-ABL. En effet, l'utilisation d'un mutant thermo-sensible de la protéine p210^{BCR-ABL}, dont l'activité tyrosine kinase est inhibée à température restrictive mais induite à température permissive, a permis l'étude des effets précoces de la protéine hybride. Les résultats obtenus suggèrent que dans les cellules hématopoïétiques dépendantes de l'IL-3, la première conséquence de l'expression de la p210^{BCR-ABL} n'est pas d'induire leur indépendance vis à vis de ce facteur mais serait plutôt de les protéger de la mort cellulaire et prolonger leur survie en absence d'IL-3 (Carlesso et al., 1994; Kabarowski et al., 1994). Des événements additionnels devraient se produire par la suite pour permettre à la protéine hybride de délivrer un signal prolifératif et d'abolir la nécessité de l'IL-3 pour la croissance des cellules.

Le modèle proposé suppose alors que l'expansion myéloïde lors de la LMC résulte de la prolongation de la survie des cellules, ce qui crée une instabilité génétique rendant ces cellules susceptibles à des mutations qui vont conduire à la transformation. En effet, il a été rapporté que dans des cellules cultivées *in vitro* et exprimant la protéine hybride il y a apparition rapide d'anomalies génétiques (Laneuville *et al.*, 1992). De plus, les progéniteurs cellulaires issus de patients atteints de LMC ont le même potentiel prolifératif que les progéniteurs de sujet normaux, par contre leur taux de mort cellulaire est plus faible, l'inhibition de l'expression de la p210^{BCR-ABL} avec des oligonucléotides antisens entraîne leur mort par apoptose (Bedi *et al.*, 1994). La mort cellulaire programmée ou apoptose agit de concert avec la prolifération et la différentiation afin de maintenir l'homéostasie des différents tissus cellulaires. Ainsi, sa dérégulation n'est pas sans conséquence (Hoffman and Liebermann, 1994; King and Cidlowski, 1995): l'inhibition de l'apoptose se trouve associée à l'apparition de nombreuses tumeurs (Vaux *et al.*, 1988; McDonnel *et al.*, 1989; Fisher,1994; Hermann *et al.*,1994; Thompson, 1995).

V. 3. La protéine p210^{BCR-ABL} et adhésion cellulaire

L'association de la protéine cytoplasmique p210^{BCR-ABL} à l'actine semble nécessaire pour son pouvoir oncogénique. Dans les cellules myéloïdes, la protéine hybride a été trouvée colocalisée avec les filaments d'actine dans des structures particulières du cytosquelette appelées *puctate structure*, similaires aux plaques d'adhésion des cellules épithéliales (Salgia *et al.*, 1995a).

Les plaques d'adhésion (Revues générales: Hynes, 1992; Gumbiner, 1996)

Les plaques d'adhésion sont des structures particulières du cytosquelette et de la membrane plasmique qui constituent des surfaces de contact entre la cellule et la matrice extracellulaire. Les intégrines représentent les récepteurs majeurs qui vont lier les protéines de la matrice extracellulaire à la plaque cytoplasmique sous-membranaire formée de protéines du cytosquelette et au niveau de laquelle vont s'ancrer les filaments d'actine.

Les intégrines constituent une famille de glycoprotéines transmembranaires qui se présentent sous forme d'héterodimères $\alpha\beta$. Il existe au moins 14 sous unités α et 8 sous unités β qui vont s'associer, avec une certaine restriction, par leur domaine extracellulaire pour former différents hétérodimères. Les intégrines se fixent via leurs domaines extracellulaires aux protéines de la matrice en reconnaissant des sites particuliers au sein des ligands, et se fixent directement via le domaine intracellulaire de la sous unité β aux protéines du cytosquelette. A l'état inactif, les intégrines ont une localisation membranaire diffuse alors qu'à l'état actif, induit par un changement de conformation, elles se lient au ligand puis se relocalisent au niveau des plaques d'adhésion où elles vont se fixer directement aux protéines du cytosquelette afin d'induire l'association des différentes protéines de la plaque d'adhésion ainsi que l'interaction de certaines d'entre elles avec les filaments d'actine aboutissant à l'activation des voies signalétiques locales. La dissociation de l'intégrine de son ligand entraîne la dissociation des protéines des plaques d'adhésion.

En plus de l'événement extracellulaire consistant en la liaison de l'intégrine avec son ligand, la formation des plaques d'adhésion est également contrôlée par des signaux intracellulaires et contrôle en retour l'interaction de l'intégrine avec son ligand. Ainsi, les plaques d'adhésion reçoivent des signaux des deux côtés de la membrane, elles reçoivent et transmettent ces signaux par des événements de phosphorylations/déphosphorylations. La fonction des intégrines de même que la formation des plaques d'adhésion sont régulées par plusieurs éléments dont les facteurs de croissance avec lesquels les intégrines peuvent agir en synergie pour transduire des signaux importants pour la prolifération et la différenciation cellulaire.

Les progéniteurs hématopoïétiques dans la LMC présentent des défauts dans leur propriété d'adhésion au stroma médullaire (Gordon *et al.*, 1987; Verfaillie, 1992). Cette déficience d'adhésion serait due à une perte de la fonction des intégrines β_1 ($\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_5\beta_1$) (Bhatia *et al.*, 1994). En effet, le traitement par l'interféron- α restaure l'adhésion médiée par l'intégrine β_1 des cellules Ph+ au stroma médullaire (Bhatia *et al.*, 1995). Cependant, Bazzoni *et al.* (1996) ont montré récemment que l'expression de la protéine hybride stimule la fonction des intégrines, rendant ainsi équivoque l'interprétation des mécanismes moléculaires responsables des altérations des propriétés d'adhésion des progéniteurs hématopoïétiques dans la LMC. Néanmoins, les études moléculaires montrant l'interaction de la p210^{BCR-ABL} avec les protéines d'adhésion focale sont en faveur d'un effet positif de la p210^{BCR-ABL} sur la fonction des intégrines. En effet, la paxilline, une protéine du cytosquelette localisée dans les plaques d'adhésion, est constitutivement phosphorylée dans les cellules myéloïdes transformées par la protéine p210^{BCR-ABL} avec laquelle elle coimmunoprécipite (Salgia *et al.*, 1995b). Dans les cellules hématopoïétiques dépendantes de l'IL-3, la paxilline se trouve phosphorylée sur des résidus tyrosine et en association avec la vinculine, une autre protéine de plaques d'adhésion, ceci de manière transitoire en réponse à la stimulation par l'IL-3. En revanche, dans les cellules transformées par la p210^{BCR-ABL} qui sont devenues indépendantes de l'IL-3, la paxilline ainsi que la vinculine et d'autres protéines de plaques d'adhésion sont dans un état phosphorylé constitutif et la paxilline se trouve complexée avec plusieurs de ces protéines. De plus, l'expression de la p210^{BCR-ABL} dans ces cellules myéloïdes entraîne la formation stable de structures membranaires riches en plaques d'adhésion où les filaments d'actine s'accumulent, alors que la formation de ces structures n'est que transitoire en réponse à la stimulation par l'IL-3. Ceci suggère que la protéine hybride joue un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette et qu'elle interagit avec une fonction médiée par les intégrines (Salgia *et al.*, 1995a). En effet, la phosphorylation de la paxilline et la réorganisation du cytosquelette qui s'en suit est observée lors de l'activation des intégrines (Burridge *et al.*, 1992) ce qui laisse supposer que la protéine p210^{BCR-ABL} active une fonction des intégrines.

La présence de défauts d'adhésion, observés pour les progéniteurs hématopoïétiques, dans la LMC peut être expliquée par le modèle de progression tumorale proposé par Schwartz (1993). Ce modèle stipule que les événements précoces de cancérogenèse activent des voies signalétiques dont celles activées normalement par les intégrines afin d'aboutir à une croissance cellulaire indépendante des facteurs de croissance et de l'adhésion cellulaire. Des mutations surviennent par la suite pour aboutir à la diminution de l'adhésion cellulaire qui n'est plus nécessaire pour la croissance et la survie cellulaire.

La transformation par la protéine p210^{BCR-ABL} est sans doute très complexe mettant en jeu plusieurs mécanismes. L'activation de la p21RAS et de c-MYC semblent nécessaires à l'activité oncogénique de cette protéine. L'inhibition de l'apoptose et l'interaction avec une fonction des intégrines pourraient également jouer un rôle important dans l'établissement, par la protéine hybride, du phénotype transformé. De plus, plusieurs protéines ont été identifiées comme substrats de la p210^{BCR-ABL} (Matsuguchi *et al.*, 1995; Sattler *et al.*, 1996; Danhauser-Riedl *et al.*, 1996; Shuai *et al.*, 1996).

Ainsi, les mécanismes moléculaires conduisant à la LMC ne sont pas encore bien définis. L'identification de nouvelles voies impliquées dans la transformation par BCR-ABL pourrait aider à l'établissement d'un schéma général de ces mécanismes et à comprendre l'apport de chaque voie signalétique altérée par la protéine hybride.

L'identification de cibles nucléaires de la p210^{BCR-ABL} contribuerait à la compréhension de ses mécanismes d'action. En effet, l'identification des effecteurs de la protéine hybride aiderait à reconstituer les voies signalétiques qu'elle active et à établir le lien entre ses substrats, les gènes cibles et les effets biologiques qui en découlent.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la famille des facteurs de transcription Rel/ NF- κ B dont différents membres sont impliqués dans des leucémies et des lymphomes chez l'homme (Gilmore, 1991; Fracchiolla *et al.*, 1993; Neri *et al.*, 1991; Kanno *et al.*, 1994). De plus, cette famille est ciblée par l'oncogène v-ABL qui est responsable de la transformation des lymphocytes B par un arrêt de leur développement au stade pré-B. La protéine v-ABL inhibe l'activité NF- κ B, entraînant ainsi le blocage de la transcription du gène exprimant les chaînes légères κ des immunoglobulines et donc de la différenciation des cellules B (Klug *et al.*, 1994).

VI. La famille Rel/NF-KB

(Revues générales : Lenardo and Baltimore, 1989 ; Liou and Baltimore, 1993 ; Siebenlist et al., 1994 ; Miyamoto and Verma, 1995).

Le facteur de transcription NF- κ B a été décrit à l'origine comme étant le facteur nucléaire à activité constitutive dans les lymphocytes B différenciés où il se fixe spécifiquement sur une séquence nucléotidique de 10 pb de l'*enhancer* de la chaîne légère κ des immunoglobulines (appelée site Ig- κ B). Par la suite, il a été montré que ce facteur est présent sous forme cytoplasmique inductible dans la plupart des autres types cellulaires et qu'il fait partie d'une famille de facteurs de transcription désignée Rel/NF- κ B, impliquée dans la régulation de nombreux gènes cellulaires dont ceux codant pour des molécules d'adhésion ainsi que pour des cytokines et leur récepteurs. Cette famille de facteurs de transcription est également impliquée dans la réplication de virus comme le HIV-1 et le cytomégalovirus, elle peut être ciblée par certains virus afin de médier leurs actions, comme c'est le cas de HTLV-I dont la protéine transactivatrice TAX induit fortement l'activité NF- κ B permettant ainsi une dérégulation de la croissance des cellules T infectées. La famille Rel/NF- κ B comprend plusieurs membres dont 5 sont actuellement connus chez les mammifères: p50 (NF κ B1), p52 (NF κ B2), c-Rel, p65 (Rel A) et Rel B. Contrairement aux autres membres, p50 et p52 sont synthétisés sous forme de précurseurs cytoplasmiques respectivement p105 et p100 (Lyt-10) qui subissent par la suite une modification post-traductionnelle et perdent leur domaine C-terminal par protéolyse. Les membres de la famille Rel/NF- κ B possèdent un domaine d'homologie d'environ 300 aa dans leur partie N-terminale (RHD pour *Rel Homology Domain*) contenant les régions impliquées dans la dimérisation et la liaison à l'ADN ainsi que la séquence de localisation nucléaire (Fig. G11). A l'exception de Rel B, qui ne peut former que des hétéro-dimères avec p50 ou p52, tous les autres membres forment des homo- ou hétéro-dimères.

Les complexes Rel/NF- κ B agissent sur les gènes cibles en se fixant sous forme dimèrique sur des séquences spécifiques, apparentées à celle du site Ig- κ B, dont la comparaison nucléotidique a permis de définir un site décamérique consensus désigné site κ B (5'-GGGRNNYYCC-3', où N est n'importe quel nucléotide, R est un nucléotide à base purine et Y est un nucléotide à base pyrimidique).

Cette famille de facteurs de transcription ubiquitaires régule de manière différentielle des fonctions cellulaires variées (réponse immunitaire, différenciation...). La régulation de son activité est très complexe, elle se fait à différents niveaux pour permettre une spécificité d'action génique et cellulaire.

Le premier niveau de régulation commun à tous les membres de la famille se fait au niveau du transport nucléaire. L'activité NF- κ B est inductible dans la plupart des types cellulaires où différents dimères sont, en l'absence de stimuli, sous forme inactive à cause de leur rétention dans le cytoplasme par interaction avec une protéine de la famille I κ B. Tous les membres de cette famille contiennent une répétition de motifs ankyrine (ANK), qui assure leurs associations avec les complexes Rel/NF- κ B (Fig. G12). I κ B α est la protéine I κ B la mieux caractérisée chez les mammifères, elle inhibe l'activité NF- κ B en séquestrant les dimères dans le cytoplasme des cellules au repos. Lors d'une stimulation par différents inducteurs (interleukine 1, TNF : *tumor necrosis factor*,...), I κ B α est phosphorylée puis dégradée ce qui entraîne la libération des complexes Rel/NF- κ B et leur transport vers le noyau où ils se



Figure G11: Représentation schématique des membres de la famille Rel/NFkB chez les mammifères

(Costello et al., 1995)





Figure G12: Représentation schématique des membres de la famille I KB chez les mammifères (Costello et al., 1995)



Motifs ankyrine

GGG

Région charnière riche en glycine



Région riche en proline et/ou sérine

fixent sur les sites κB appropriés afin d'agir sur les gènes cibles. Ik B α peut aussi avoir une localisation nucléaire et inhiber alors l'activité NF-kB en déplaçant les complexes déjà fixés à l'ADN. I κ B β , une autre protéine de la famille I κ B à localisation cytoplasmique, possède les mêmes activités inhibitrices que I κ B α (Thompson *et al.*, 1995). Les précurseurs cytoplasmiques p100 et p105 possèdent des répétitions de motifs ankyrine dans leur partie Cterminale et peuvent se comporter comme des molécules de type IkB, avant la protéolyse de leur région C-terminale, et retenir les complexes NF-kB dans le cytoplasme. Deux autres protéines IkB ont été identifiées : Bcl 3 à localisation nucléaire est détectée seulement dans certains tissus et IkB-y à localisation cytoplasmique trouvée uniquement dans les cellules pré-B. La protéine IkB-y correspond à la partie C-terminale du précurseur p105, elle dérive du même gène suite à l'utilisation d'un site alternatif d'initiation de la transcription. En plus de son activité IkB, la protéine Bcl 3 peut agir aussi comme coactivateur quand elle est associé aux homodimères p52 (Bours et al., 1993) et activer la transcription sous le contrôle de sites κB soit en déplaçant les homodimères p50 qui agissent dans certains cas comme répresseurs et permettre la fixation du complexe transactivateur p50/p65 (Franzoso et al., 1993), soit en augmentant la capacité de fixation à l'ADN de l'homodimère p50 (Caamano et al., 1996).

Les différents complexes NF-kB ont des sensibilités variables aux différents membres IKB. IKB α et IKB β interagissent préférentiellement avec les dimères contenant les sous unités p65, c-Rel et Rel B qui présentent dans leur partie C-terminale un domaine d'activation transcriptionnel à forte activité, alors que Bcl 3 n'interagit qu'avec les homodimères p50 ou p52 qui ont généralement une faible activité transactivatrice. Ainsi, la présence dans la cellules de différentes formes IkB et leurs sensibilités différentielles à divers stimuli permet l'inhibition/l'activation sélective de différents complexes Rel/NF-kB et une certaine spécificité de réponse (Dobrzanski et al., 1994). Cette spécificité est accentuée par les affinités distinctes des différents dimères NF-kB pour les multiples sites kB et par leurs activités transactivatrices variables (Kunsch et al., 1992; Lernbercher et al., 1993; Perkins et al., 1992). De plus, les membres NF-κB peuvent être directement modifiés par phosphorylations comme c'est le cas de la sous-unité p65 dont l'activité de liaison à l'ADN se trouve augmentée après phosphorylation, ou la p105 dont la phosphorylation entraîne son hydrolyse et la formation de dimères actifs contenant la p50 (Naumann and Scheidereit, 1994). Une spécificité additionnelle est apportée par l'interaction synergique entres les complexes NF-KB et des facteurs de transcription distincts (AP-1, ATF-2, Sp1...). Ainsi, la multiplicité des mécanismes de modulation du système Rel/NF- κ B permet, suite à l'activation d'homo- ou hétéro-dimères spécifiques selon les inducteurs et le type cellulaire, l'expression sélective des gènes et la régulation différentielle des fonctions cellulaires.

L'altération des facteurs Rel/ NF- κ B ou la dérégulation de leurs activités pourrait avoir des conséquences oncogéniques. L'homologue virale de c-Rel: v-Rel a été isolé chez le virus aviaire REV-T à l'origine de tumeurs hématopoïétiques, et la surexpression de c-Rel peut avoir un effet transformant ou apoptotique selon le type cellulaire. De plus *bcl-3* et *lyt-10* (p52) sont impliqués dans des translocations associées à des leucémies humaines lymphoïdes. L'implication de cette famille de facteurs de transcription dans la LMC n'a jamais été décrite.

RESULTATS

A. Introduction

Lors de l'établissement de ce projet de recherche, très peu de données étaient connues sur les voies signalétiques de la protéine p $210^{BCR-ABL}$, en dehors de l'éventuelle implication de la voie de MYC dans la transformation médiée par cette protéine (Sawyers *et al.*, 1992). La détermination des facteurs de transcription cibles de la p $210^{BCR-ABL}$ est l'une des approches possible permettant l'étude des mécanismes d'action de la protéine hybride. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux deux familles de facteurs de transcription AP-1 et Rel/NF- κ B qui jouent un rôle important dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire et dont la dérégulation se trouve impliquée dans de nombreux processus de transformation cellulaire.

La première étude entreprise est celle de l'activation transcriptionnelle qui consiste à analyser de manière indirecte l'activité des deux facteurs de transcription en présence de la protéine p210^{BCR-ABL}, ceci en mesurant l'effet de l'expression de cette dernière sur la transcription d'un gène *reporter* qui se trouve sous le contrôle de l'élément de réponse pour le facteur testé.

Deux modèles cellulaires étaient disponibles pour la réalisation de cette étude:

- des cellules possédant la translocation t(9;22)(q34;q11) comme la lignée K562, issue d'un malade en crise blastique. Cependant, cette lignée ne représente pas un bon modèle d'étude puisqu'elle possède de nombreuses modifications génétiques additionnelles dont les effets ne pourraient être distingués de ceux qui sont propre à la p210^{BCR-ABL}.

- des cellules n'exprimant pas la protéine p210^{BCR-ABL} dans lesquelles serait introduit un vecteur exprimant la protéine hybride. Comme nous ne disposions pas de lignée cellulaire Ph⁻ de type myéloïde non engagée dans un stade avancé de la différenciation, la lignée Rat-1 qui représente un modèle de transformation cellulaire par la protéine hybride a été utilisée. Les résultats obtenus sont présentés dans la première partie de ce chapitre.

Entre temps, le développement des études sur les mécanismes d'action de la p210^{BCR-ABL} ont montré l'implication de la voie de Ras, qui aboutit à l'activation des facteur de transcription AP-1, dans la transformation médiée par la protéine hybride (Mandanas *et al.*, 1993; Pendergast *et al.*, 1993; Puil *et al.*, 1994).

Notre étude, a été réalisée par la suite en utilisant comme modèle cellulaire la lignée murine DA1 correspondant à un progéniteur myéloïde et dont la croissance nécessite la présence de l'IL-3. Suite aux résultats de l'analyse d'activation transcriptionnelle, cette étude s'est focalisée sur les facteurs de transcription de la famille Rel/NF-κB.

Les premiers résultats obtenus, montrant la stimulation spécifique de l'activité NF- κ B par la protéine p210^{BCR-ABL}, nous ont conduit à développer cette étude en recherchant le(s) membre(s) de la famille Rel/NF- κ B activé(s) par la protéine hybride, de même que le mécanisme de cette activation et sa signification biologique. L'ensemble des résultats forme la deuxième partie de ce chapitre.

B. Etude dans les cellules adhérentes

I. Etudes d'activation transcriptionnelle dans la lignée cellulaire COS7

Le vecteur d'expression utilisé pour cloner la région codante de la p210^{BCR-ABL} contient le promoteur précoce du CMV qui permet une expression élevée du transgène dans de nombreuses cellules eucaryotes. De plus, la présence de l'origine de réplication du virus SV40 assure la réplication transitoire de ce vecteur, à la manière d'un épisome, dans les cellules eucaryotes exprimant l'antigène grand T du SV40, comme c'est le cas de la lignée cellulaire COS7. Ainsi, ces cellules ont été utilisées dans un premier temps pour tester l'expression transitoire de la protéine p210^{BCR-ABL}.

Quarante-huit heures après l'introduction de 8 µg du vecteur pcDNA-p210 (transfectamine, matériels et méthodes) dans les cellules COS7, les extraits cellulaires ont été préparés puis soumis à une immunoprécipitation par un anticorps spécifique de la partie ABL, suivie de la réaction d'autophosphorylation *in vitro*. Le résultat obtenu montre que la protéine hybride est bien exprimée et qu'elle possède une activité tyrosine kinase fonctionnelle (Fig. R1).

Nous avons réalisé par la suite une étude d'activation transcriptionnelle dans ces cellules, en co-introduisant le vecteur d'expression contenant ou non la région codante de la p $210^{BCR-ABL}$ avec un vecteur *reporter*: soit le pBLCAT2 (le vecteur basal), soit le pBLCAT-5 κ B (contenant 5 copies de l'élément de réponse Ig κ B) ou le pBLCAT-TRE (contenant l'élément de réponse AP1) (matériels et méthodes)

Les résultats (tableau R1) révèlent qu'en présence de la p210^{BCR-ABL}, l'activité CAT produite à partir du vecteur pBLCAT-5xB se trouve augmentée mais pas celle contrôlée par l'élément AP-1. Cependant, ces cellules étant transformées par l'antigène T du SV40, on ne peut pas affirmer si l'effet observé résulte uniquement de l'expression de la protéine p210^{BCR-ABL} ou si la présence de l'antigène T pourrait y contribuer. Pour cela, la lignée cellulaire Rat-1 a été utilisée comme modèle cellulaire puisqu'elle peut être partiellement transformée par la protéine hybride.



Figure R1 : Expression transitoire de la protéine p210^{BCR-ABL} dans les COS7.

Les cellules COS7 transfectées avec le pCDNA-p210 (puits 1) ou le pCDNA3 (puits 2) sont analysées 48 h plus tard pour l'expression de la p210^{BCR-ABL} en réalisant la réaction kinase *in vitro*, suivie de la séparation des protéines en gel de polyacrylamide-SDS 8%. Les extraits de cellules K562 (3.10⁶) sont utilisées comme témoin positif (puits 3).

Tableau R1: Etudes d'activation transcriptionnelle dans les cellules COS7et Rat-1.

	Activité CAT relative				
	transitoire	semi-stable			
	COS7	Rat-1			
	9999999 99392 - 244 - 244 - 244 - 244 - 244 - 244 - 244 - 244 - 244 - 244 - 244 - 244 - 244 - 244 - 244 - 244 -				
pBLCAT-5ĸB	4 ± 1	$1,05 \pm 0,05$			
pBLCAT-TRE	$1,2 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,1$			

L'activité CAT relative produite par les vecteurs *reporter* indiqués est calculée par rapport à l'activité CAT produite par le vecteur *reporter* basal pBLCAT2. L'activité CAT relative obtenue en présence du vecteur pcDNA3 (cotransfection dans le cas de l'étude transitoire dans les COS7 et transfection préalable avec le pcDNA3 dans le cas de l'étude en expression semistable). Chaque valeur représente la moyenne de 3 expériences indépendantes; les écarts par rapport aux valeurs extrêmes sont indiqués (\pm).

II. Etudes d'activation transcriptionnelle dans la lignée cellulaire Rat-1

Les études réalisées en expression transitoire dans ces cellules ont donné des résultats très variables, allant de l'inhibition à l'activation, selon le rapport quantitatif entre le vecteur d'expression et le vecteur *reporter* cointroduits, ce qui reflète un problème technique de cotransfection (probablement la co-internalisation des deux vecteurs).

Pour remédier à ce problème technique, nous avons alors procédé à l'étude d'activation transcriptionnelle en expression stable. Les cellules Rat-1 ont été transfectées dans un premier temps avec le vecteur pcDNA-p210, puis soumises à la sélection par la généticine, de manière à isoler des clones exprimant de façon stable la protéine hybride et qui seraient transfectés par la suite avec le vecteur *reporter* à analyser. Les clones résistants à la généticine, isolés trois semaines après le début de la sélection ont été caractérisés pour l'expression de la protéine hybride par analyse de l'activité kinase *in vitro*. Le résultat obtenu (non présenté) ne montre aucune expression de la protéine p210^{BCR-ABL} dans les différents clones testés. Un contrôle positif de la transfection et de l'expression stable du transgène a été réalisé en transfectant les cellules Rat-1 avec le vecteur pcDNA3/CAT qui exprime le gène CAT (InVitrogen). L'analyse de l'activité CAT dans les clones résistants à la généticine isolés s'est révélée positive.

Ceci suppose que l'absence de l'expression stable de la p210^{BCR-ABL} dans les clones de cellules Rat-1 serait due à un effet toxique de cette protéine. En effet, il a déjà été rapporté que les oncogènes ABL ont des effets toxiques dans les cellules fibroblastiques, entraînant la perte de leur expression stable dans ces cellules au bout de 2 à 3 semaines de culture (Goff *et al.*, 1982; Daley *et al.*, 1987; Lugo and Witte, 1989).

Nous avons alors essayé de pallier au problème de cytotoxicité en réalisant les études d'activation transcriptionnelle en expression " semi-stable " afin d'écourter le temps de culture cellulaire qui suit l'introduction du vecteur exprimant la protéine hybride. Les cellules transfectées par le vecteur pcDNA-p210 sont soumises à la sélection G418 pendant une semaine et le mélange des clones résistants a été utilisé pour la transfection avec les vecteurs *reporter*. Le résultat obtenu (tableau R1) montre une légère activation de la transcription contrôlée par l'élément AP-1 mais aucune activation n'a été observée à partir de l'élément κ B.

Comme le développement de notre étude nécessite l'établissement de lignées stables, nous avons décidé de travailler par la suite en utilisant un modèle cellulaire plus approprié, où l'expression de la protéine hybride permet une sélection positive des cellules.

C. Les études réalisées dans la lignée myéloïde DA1

Nous avons entrepris notre étude dans la lignée cellulaire myéloïde DA1 (Ihle, 1985) qui, en plus de son état peu différencié (progéniteur myéloïde multipotent), présente l'avantage d'une croissance dépendante de l'IL-3 pouvant servir de sélection pour l'expression de la p210^{BCR-ABL} qui a la propriété de rendre les cellules hématopoïétiques en culture indépendantes des facteurs de croissance. Cette lignée cellulaire représente donc un bon modèle pour la recherche des cibles nucléaires de la p210^{BCR-ABL}.

Cette lignée cellulaire étant résistante aux techniques classiques de transfection, elle a été transfectée par électroporation. Cette technique a été mise au point de manière à obtenir une expression optimale du transgène contenu dans le vecteur d'expression pcDNA3.

I. La p210^{BCR-ABL} rend la croissance des cellules DA1 indépendante de l'IL-3

L'expression de l'oncogène BCR-ABL modifie les caractéristiques biologiques de nombreuses cellules hématopoïétiques en permettant leur survie et leur prolifération en absence d'IL-3 (Daley *et al.*, 1988; Mandanas *et al.*, 1992). Cette propriété transformante de la protéine BCR-ABL a été alors testée dans la lignée cellulaire DA1. Ainsi, la croissance de ces cellules en absence d'IL-3 a été analysée à la suite de leur transfection par le vecteur d'expression basal ou par celui exprimant la forme sauvage de la protéine p210^{BCR-ABL} (voir le chapitre matériels et méthodes). Le vecteur exprimant la forme mutée de la protéine hybride, dont l'activité tyrosine kinase est devenue défectueuse, a été utilisé comme témoin de spécificité. Ce mutant a été obtenu suite à la création d'une mutation au niveau du site de fixation de l'ATP dans le domaine tyrosine kinase de la protéine hybride (matériels et méthodes).

Les résultats (Fig. R2) montrent que pendant les deux premiers jours qui suivent la sélection (privation d'IL-3), toutes les cellules possèdent les mêmes caractéristiques de survie.



Figure R2: Courbes de survie en absence d'IL-3.

Quarante-huit heures après transfection par les différents vecteurs, les cellules DA1 sont lavées puis cultivées à densité égale (10⁵ cellules/ml) dans un milieu sans IL-3 (jour 0). Les cellules vivantes sont énumérées tous les jours par la méthode d'exclusion du bleu Trypan. Les résultats montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Un grand nombre des cellules transfectées par le vecteur pcDNA-p210 restent viables jusqu'au 5^{ème} jour, ceci serait principalement le résultat de l'expression transitoire de la protéine hybride sauvage. Par la suite, seul un petit nombre de ces cellules restent viables, probablement celles qui expriment de manière stable la protéine hybride, et révèlent à partir du 11^{ème} jour une prolifération indépendante de l'IL-3. Par contre, les DA1 transfectées avec le vecteur basal ou le vecteur exprimant la forme défectueuse de la p210^{BCR-ABL} ne survivent pas à la privation d'IL-3 et meurent dans les 6 jours qui suivent le début de la sélection.

Ainsi, la survie et la croissance des cellules DA1 nécessitent la présence d'IL-3. L'expression de la p210^{BCR-ABL} ayant une activité tyrosine kinase fonctionnelle entraîne la transformation de ces cellules, comme cela a été rapporté pour d'autres lignées cellulaires hématopoïétiques, en les rendant indépendantes du facteur de croissance.

L'effet de l'expression du mutant Y177F a été également testée. Ce mutant a été obtenu par mutagénèse dirigée en substituant le codon de la tyrosine en position 177 par un codon phenylalanine (matériels et méthodes), la p210^{BCR-ABL} exprimée sous cette forme ne peut plus interagir avec la protéine d'adaptation GRB2 qui la relie à la voie de Ras (Pendergast *et al.*, 1993).

L'analyse de la croissance des cellules DA1 suite à leur transfection par le pcDNA-Y177F et leur privation d'IL-3 a montré le même profil que celui obtenu avec la protéine sauvage (non présenté). Ceci montre que l'interaction de la p210^{BCR-ABL} avec la protéine GRB2 n'est pas requise pour induire l'indépendance vis à vis du facteur de croissance, confirmant les résultats obtenus dans d'autres lignées hématopoïétiques (Goga *et al.*, 1995).

Il faut noter que l'expression et l'activité tyrosine kinase des trois formes utilisées de la protéine p210^{BCR-ABL} ont été testées. A la suite de chaque transfection, une partie des cellules a été cultivée en présence d'IL-3, avec une sélection à la généticine et l'ensemble de la population cellulaire résistante a été analysée (pour plus de détails techniques, voir matériels et méthodes et le paragraphe VII. 1 des résultats, p.94). Le résultat montre une expression similaire des trois formes de la protéine hybride et que la forme mutée K1171R est effectivement défectueuse en activité tyrosine kinase (Fig. R14).

II. Analyse des activités transcriptionnelles en présence de la protéine p210^{BCR-ABL}

Afin de chercher si les deux familles de facteurs de transcription Rel/NF- κ B et AP1 représentent des cibles de la p210^{BCR-ABL}, l'analyse indirecte de leur activité en présence de la protéine hybride a été réalisée en mesurant l'effet de l'expression de cette protéine sur la transcription du gène *reporter cat* se trouvant sous le contrôle du site consensus κ B ou TRE.

II. 1. Etude d'activation transcriptionnelle en expression transitoire

Dix microgrammes du vecteur d'expression vide ou contenant l'ADNc sauvage de la $p210^{BCR-ABL}$ (respectivement le pcDNA3 et le pcDNA-p210) ont été cointroduits avec 5 µg du vecteur *reporter* dans les cellules DA1. Les cellules transfectées ont été ensuite incubées pendant 48 h en présence ou en absence d'IL3 et les extraits cellulaires ont été préparés puis utilisés pour le dosage de l'activité enzymatique CAT.

Les résultats (Fig. R3) montrent que :

- dans le cas des cellules incubées en présence d'IL-3, l'expression de la p $210^{BCR-ABL}$ entraîne une augmentation d'un facteur 3,6 de l'activité CAT produite par le vecteur pBLCAT-5 κ B, alors qu'une activation peu significative (facteur 1,4) est observée à partir du pBLCAT-TRE - dans le cas des cellules incubées en absence d'IL-3, l'augmentation de l'activité CAT produite par le pBLCAT-5 κ B en présence de la protéine hybride se trouve plus élevée (le facteur d'activation passe de 3,5 à 7,5), alors que l'activité CAT produite par le pBLCAT-TRE ne montre aucune activation sous l'effet de l'expression de la p $210^{BCR-ABL}$.

Ainsi, seule la transcription se trouvant sous le contrôle de l'élément de réponse κB est activée, permettant alors de conclure que la protéine hybride stimule de manière spécifique l'activité NF- κB .

L'augmentation faible de la transcription dépendante de l'élément TRE (facteur 1,4), obtenue dans l'étude réalisée en présence d'IL-3, serait une conséquence générale de l'état de




Les résultats présentés montrent les activités CAT obtenues avec les extraits des cellules incubées, après cotransfection, en présence (A) et en absence d'IL-3 (B). Les valeurs montrées correspondent chacune à l'activité CAT relative à celle du vecteur *reporter* basal pBLCAT2. Les activités CAT relatives obtenues à partir des extraits des cellules cotransfectées avec le vecteur d'expression vide (pcDNA3) ont été ramenées à la valeur 1.

Les valeurs représentent la moyenne des résultats de 5 expériences indépendantes.

prolifération des cellules et non pas un effet inhérent à l'expression de la protéine hybride. En effet, cette activation n'est pas retrouvée lorsque les cellules, suite à la privation d'IL-3, ne sont pas en prolifération. Mais nous ne pouvons pas exclure la possibilité que cette augmentation puisse résulter de la coopération entre la p210^{BCR-ABL} et un signal médié par l'IL-3.

Par contre, la transcription contrôlée par l'élément κB se trouve davantage augmentée par la protéine p210^{BCR-ABL} en absence d'IL-3. Cette augmentation pourrait être expliquée par la présence d'une activité NF- κB basale dans les cellules incubées avec l'IL-3 qui masquerait l'importance de l'effet propre à la p210^{BCR-ABL}, révélé lorsque les cellules sont cultivées en absence d'IL-3.

Afin de vérifier la spécificité des effets observés et de chercher si l'activité tyrosine kinase, qui est essentielle au pouvoir oncogénique de la protéine BCR-ABL, est requise pour l'activation de NF- κ B, les activités transcriptionnelles ont été analysées sous l'effet de l'expression de la forme défectueuse de la protéine p210^{BCR-ABL} (cotransfection des vecteurs *reporter* avec le vecteur pcDNA-K1171R).

Les résultats (Fig. R3) montrent que contrairement à la forme sauvage de la p $210^{BCR-ABL}$, la forme mutée n'entraîne aucune augmentation de l'activité NF- κ B.

Ceci démontre que la protéine hybride stimule spécifiquement l'activité NF- κ B et qu'elle requiert une activité tyrosine kinase fonctionnelle pour médier cet effet.

Ce résultat nous a conduit à focaliser notre étude sur la famille des facteurs de transcription Rel/NF- κ B.

II. 2. Etude d'activation transcriptionnelle en expression stable

Le développement de l'étude entreprise nécessitait l'établissement de cellules exprimant de manière constitutive la protéine p210^{BCR-ABL}. Ces cellules ont été utilisées dans un premier temps pour analyser les activités CAT des vecteurs *reporter* utilisés plus haut.

II. 2. 1. Génération des cellules DA1 transformées

Les clones de cellules DA1 transformées ont été obtenus après introduction du vecteur plasmidique contenant l'ADNc de la protéine p210^{BCR-ABL} suivie d'une sélection de 2 semaines permettant l'obtention des cellules qui auraient intégrées dans leur génome l'ADNc et qui expriment la protéine correspondante. Deux types de sélection ont été utilisées (matériels et méthodes):

- Le premier mode de sélection est basé sur la propriété de la protéine oncogénique p210^{BCR-ABL} de rendre les lignées de cellules hématopoïétiques indépendantes vis à vis de l'IL-3. Ainsi, les DA1 qui expriment de manière stable la protéine hybride vont survivre et proliférer en absence du facteur de croissance (Fig. R2).

- Le deuxième mode de sélection est basé sur la résistance à la généticine. Le vecteur pcDNA3 contient le gène de résistance pour la néomycine (*néo*) permettant ainsi la survie et la prolifération des cellules qui l'auraient intégré, en présence de la généticine. Ces cellules présentent normalement une grande probabilité d'exprimer la p210^{BCR-ABL} dont l'ADNc se trouve inséré dans le même vecteur que le gène *néo*. Des clones indépendants de cellules résistantes à la généticine ont été isolés au bout de deux semaines de sélection puis cultivés en absence d'IL-3 afin de favoriser la prolifération des cellules qui expriment, en plus du gène de résistance *néo*, la protéine hybride.

Des clones individuels isolés à la suite de chacune des deux sélections ont été immédiatement analysés pour l'expression de la protéine p210^{BCR-ABL}. Les extraits cellulaires issus d'un même nombre de cellules ont été immunoprécipités, en utilisant l'anticorps Ab-3 dirigé contre la partie ABL, et les complexes résultants ont été utilisés pour la réaction d'autophosphorylation *in vitro*. Comme le montre la figure R4, tous les clones testés expriment l'activité tyrosine kinase de la p210^{BCR-ABL}. Les clones 11a (puits 2) et 3b (puits 8) ont été retenus pour la suite des études.

II. 2. 2. Etude d'activation transcriptionnelle

Dix microgrammes de vecteur *reporter* ont été introduits dans les clones 11a et 3b, de même que dans les cellules parentales qui ont été incubées après transfection avec ou sans



Figure R4: Activité tyrosine kinase de la p210^{BCR-ABL} dans les cellules DA1 transformées.

Des clones indépendants de cellules DA1 sont analysés pour l'expression de la p210^{BCR-ABL} par la technique d'autophosphorylation *in vitro*. Les clones sont obtenus suite à la sélection par la privation en IL-3 (clones a: puits 1 à 6) ou par addition de G418 (clones b: puits 7 et 8). Les cellules DA1 parentales (puits 9) de même que le contrôle positif K562, avec un temps d'exposition similaire (puits 10) ou 10 fois plus court (puits 11) que les autres puits (1 à 9), sont également représentés.



Figure R5: Etude d'activation transcriptionnelle en expression stable dans les cellules DA1.

Les résultats présentés montrent les activités CAT relatives au vecteur basal pBLCAT2 et sont représentatifs de 4 expériences indépendantes. Les deux clones transformés (11a et 3b) présentent les mêmes activités CAT.

IL-3. Les extraits cellulaires ont été préparés 48 h plus tard et les activités CAT ont été mesurées.

La comparaison des activités CAT relatives entre les différentes cellules (Fig. R5) montre que l'activité produite par le pBLCAT-5 κ B est fortement stimulée dans les clones transformés par rapport aux cellules parentales incubées en absence d'IL-3, alors que l'activation produite par le pBLCAT-TRE ne l'est que peu. En revanche, les activités CAT relatives produites par ces deux vecteurs *reporter* dans les DA1 transformées sont similaires à celles observées dans les cellules parentales incubées en présence d'IL-3.

Ces résultats montrent que les activités transcriptionnelles transitoires sont les mêmes entre les cellules exprimant la protéine p210^{BCR-ABL} dont la croissance est devenue indépendante de l'IL-3 et les cellules parentales incubées en présence d'IL-3. Mais ces résultats ne permettent pas de distinguer les activations dues à un effet général lié à l'état de prolifération des cellules des activations propres à l'expression de la protéine hybride. En effet, les activités CAT produites dans les cellules transformées ne peuvent pas être rapportées sur celles obtenues dans les cellules parentales cultivées en présence d'IL-3, étant donné que les deux types cellulaires ont des propriétés de prolifération différentes.

A défaut de pouvoir comparer les activités NF- κ B entre les cellules transformées et les cellules parentales par l'étude d'activation transcriptionnelle, nous avons procédé à la comparaison directe des complexes Rel/NF- κ B actifs dans les deux types cellulaires.

III. Analyse des complexes nucléaires Rel/NF-KB

De manière générale, les complexes Rel/NF- κ B deviennent actifs suite à leur translocation du compartiment cytoplasmique vers le compartiment nucléaire, où ils peuvent interagir sous forme dimèrique avec les sites consensus κ B et réguler ainsi la transcription des gènes cibles. La technique de retard en gel, qui permet l'analyse des interactions protéines-ADN, a été utilisée dans le but de caractériser l'interaction des facteurs Rel/NF- κ B, présents dans les noyaux des cellules parentales et des clones de cellules transformées, avec le site consensus κ B (Ig κ κ B, voir matériels et méthodes). Une différence dans les profils d'interaction entre les deux types cellulaires refléterait une modification qualitative ou

quantitative des complexes Rel/NF- κ B présents et serait un argument en faveur d'une différence d'activités transcriptionnelles.

Afin de réaliser les expériences de retard en gel, les extraits nucléaires ont été préparés à partir des DA1 parentales cultivées en présence d'IL-3 et à partir des clones de cellules DA1 transformées. Dix microgrammes de chacun de ces extraits ont été incubés avec l'oligonucléotide κ B marqué (une gamme de quantités de protéines nucléaires a été utilisée pour optimiser la réaction de fixation sonde-protéines et la quantité de 10 µg a été retenue). La sonde oligonucléotidique correspondant au site de fixation du facteur de transcription OCT-1 a été utilisée comme témoin. Les complexes formés ont été analysés après migration en gel de polyacrylamide non dénaturant.

Les résultats (Fig. R6A) révèlent que les extraits nucléaires des cellules parentales forment un complexe (A) avec la sonde κ B dont la migration sur gel est retardée par rapport à la sonde libre (migration de la sonde libre non montrée). Ce complexe disparaît lorsque la réaction d'incubation a été réalisée en présence d'un excès d'oligonucléotide κ B non marqué (puits 3) mais pas en présence du même excès d'un oligonucléotide non spécifique (puits 2). Ceci montre que la formation du complexe A est spécifique à l'élément κ B et qu'il contient alors des protéines de la famille Rel/NF- κ B. Les extraits nucléaires des cellules transformées forment le même complexe spécifique A avec la sonde κ B (puits 4), mais forment en plus un deuxième complexe spécifique (complexe B dont la migration en gel est plus retardée que celle du complexe A). Pour la sonde Oct-1 (Fig. R6B), les extraits issus des deux types cellulaires forment un complexe retardé ayant la même intensité.

Ainsi, les DA1 exprimant la protéine hybride montrent une différence qualitative au niveau de l'interaction des facteurs Rel/NF- κ B avec le site consensus κ B, par rapport aux cellules parentales. Cette différence pourrait refléter des activités NF- κ B différentes entre les deux types cellulaires, qui ne pouvaient pas être mises en évidence par l'étude d'activation transcriptionnelle réalisée en expression stable.

IV. Analyse de la composition des complexes Rel/NF-KB

La différence de migration entre les complexes A et B, révélés par l'expérience de retard en gel, serait due à une différence dans la nature des facteurs NF- κ B impliqués dans



Figure R6: Analyse des complexes nucléaires Rel/NF-KB par retard en gel.

(A) Les extraits nucléaires issus des cellules parentales (puits 1 à 3) et des cellules transformées (clone 11 a, puits 4 à 6) sont incubés avec la sonde Ig- κ B. La réaction de fixation a été réalisée sans compétition (puits 1 et 4) ou en présence d'un excès molaire (200 X) d'oligonucléotide soit aspécifique (ns) (puits 2 et 5) soit spécifique (s) (puits 3 et 6). Les flèches indiquent les complexes spécifiques formés. La nature de la bande à faible migration en gel (puits 1, 2 et 5) est inconnue, sa formation avec la même préparation d'extraits nucléaires n'est pas reproductible d'une expérience à l'autre.

(B) Les extraits nucléaires issus des cellules parentales (puits 1) et des cellules transformées (puits 2) sont incubés avec la sonde Oct-1.

Le même résultat a été obtenu avec les extraits nucléaires des cellules du clone 3b.

leur formation. Nous avons alors entrepris l'identification de ces facteurs par l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre des membres de la famille Rel/NF- κ B, dans les expériences de retard en gel (*supershift assays*). Les anticorps utilisés sont dirigés contre des régions protéiques situées en dehors du domaine de liaison à l'ADN et n'interagissent alors pas avec la propriété de fixation à l'ADN. Ainsi, l'anticorps qui reconnaît sa protéine cible dans un complexe ADN-protéines s'y fixe et le nouveau complexe migrera plus lentement que le complexe témoin formé en absence de l'anticorps.

L'expérience a été réalisée en incubant la sonde κB avec les extraits nucléaires seuls (de la même manière que cela a été décrit plus haut) ou en présence de l'anticorps dirigé contre les sous-unités NF- κB : soit anti-p50, soit anti-p65 (Rel A), soit anti-c-Rel. Les complexes formés ont été ensuite analysés après migration en gel de polyacrylamide non dénaturant.

Le résultat présenté (Fig. R7.A) montre que la migration en gel du complexe A, commun aux deux types cellulaires, est retardée par l'anticorps dirigé contre la sous-unité p50 NF- κ B (puits 2 et 6) mais ne l'est pas par l'anticorps anti-p65 (puits 3 et 7) ni par l'anti-c-Rel (puits 4 et 8). Ceci démontre que le complexe A contient la protéine p50 NF- κ B mais pas les deux autres protéines testées. En revanche, la migration en gel du complexe B, spécifique aux clones de cellules transformées, est retardé uniquement par l'anticorps dirigé contre la sous-unité p65 (puits 7), montrant ainsi la présence de cette protéine dans le complexe B.

Ces résultats nous ont permis de conclure que les complexe A et B contiennent respectivement la p50 et la p65, qui se fixent au site κ B probablement sous forme d'homodimères ou en hétérodimère avec d'autres facteurs non testés. Ainsi, l'activité de fixation à l'ADN de la sous-unité p65 se trouve stimulée par la protéine p210^{BCR-ABL}, elle pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'activité observée lors des études d'activation transcriptionnelle réalisées en expression transitoire.

Il faut noter que la qualité du résultat obtenu dépend des conditions expérimentales utilisées (matériels et méthodes). Le résultat montré sur la figure R7.A est obtenu en incubant les extraits nucléaires avec les anticorps pendant 30 mn à 4°C, avant d'ajouter la sonde oligonucléotidique et de réaliser la réaction de fixation standard à 30°C. Dans ce cas, la fixation de la p65 à sonde κ B est très faible (complexe B). Quant au résultat montré sur la figure R7.B, il est obtenu suite à l'incubation des extraits nucléaires en même temps avec la



Figure R7: Analyse de la composition des complexes Rel/NF-KB.

A: La réaction de fixation a été réalisée en incubant les extraits nucléaires des cellules parentales (les puits 1 à 4) et des clones transformés (clone 3b, puits 5 à 8) avec la sonde κ B, ceci en absence d'anticorps (puits 1 et 5), ou en incubant les extraits nucléaires au préalable avec les anticorps spécifiques : anti p50 (puits 2 et 6), anti-p65 (puits 3 et 7) et anti-c-rel (puits 4 et 8). La préincubation des extraits nucléaires avec l'anticorps a été réalisée à 4°C pendant 30 mn avant d'ajouter la sonde et d'effectuer l'incubation à 30°C. Les flèches C et D indiquent le retard de migration respectivement du complexe A et du complexe B.

B: incubation des extraits nucléaires du clone transformé (3b, puits 1 à 4) à la fois avec la sonde et l'anticorps à 4°C pendant 3 h avant d'effectuer l'incubation standard à 30°C.

Les extraits nucléaires du clone 11a montrent le même profil.

81

sonde κB et les anticorps, à 4°C pendant 3 h avant de passer à l'étape d'incubation standard à 30°C. Le résultat obtenu montre dans ce cas une fixation très nette de la p65 à la sonde κB (complexe B) et confirme l'absence de la sous-unité p50 dans le complexe B (puits 2).

La différence entre les résultats obtenus dans les deux conditions expérimentales peut être expliquée par une différence dans la cinétique de fixation des différentes sous-unités: la p50 pourrait se fixer plus rapidement à la sonde (ce qui explique le résultat de la figure R7.A qui représente un temps d'incubation relativement court), mais elle peut également s'expliquer par une différence dans la stabilité des différents complexes formés.

La variation de l'intensité des bandes entre les différents puits représentés sur la figure R7.B, peut être due à une compétition entre les différentes sous-unités NF- κ B pour la fixation à la sonde. En effet, le puits n°1 montre que la sous-unité p65 se fixe au dépend de la p50 ; alors que lorsque l'anticorps anti-p65 est utilisé (puits 3) la p50 se fixe mieux, probablement parce que l'incubation des protéines en même temps avec l'anticorps et la sonde pourrait gêner la fixation de la protéine cible à la sonde. Par ailleurs, l'intensité de la bande retardée par l'antip65 ne reflète pas la quantité de p65 qui se fixe normalement à la sonde κ B (comparer la bande D du puits 3 et la bande B du puits 1).

V. Recherche du niveau d'activation de la protéine p65 par la p210^{BCR-ABL}

L'activation de la protéine p65 dans les cellules qui expriment de manière stable la protéine p210^{BCR-ABL} (révélée par sa présence dans les extraits nucléaires de ces cellules et sa fixation à l'élément de réponse κ B) peut se produire, à l'instar de l'activité de tous les membres de la famille Rel/NF- κ B dont la régulation est très complexe, à différents niveaux de régulation comme la localisation subcellulaire ou la modification directe de la protéine.

V. 1. Analyse de la distribution subcellulaire de la protéine p65

Nous avons commencé alors par chercher si l'activation de la p65 NF- κ B par la protéine p210^{BCR-ABL} se fait suite à l'induction de la translocation des complexes

cytoplasmiques contenant la p65 vers le compartiment nucléaire. Dans un premier temps, nous voulions analyser la distribution subcellulaire de la protéine p65 par la technique d'immunofluorescence indirecte, mais les résultats obtenus n'étaient pas concluants puisque l'anticorps anti-p65 dont nous disposions s'est révélé non approprié pour cette étude. Ainsi, nous avons procédé à l'analyse de la présence de la protéine p65, séparément dans les extraits nucléaires et cytoplasmiques par immunoprécipitation.

Pour cela, les cellules DA1 parentales et les clones de cellules transformées ont été marquées « *in vivo* », les extraits cytoplasmiques et nucléaires ont été préparés à partir des deux types cellulaires puis soumis séparément à une double immunoprécipitation, en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre la p65. Un anticorps non spécifique (anti IgG de lapin) a été utilisé comme témoin négatif.

Le résultat (Fig. R8) montre que, dans les cellules parentales, la protéine p65 est à peine détectable dans le cytoplasme (puits 2) et qu'elle est absente dans le noyau (puits 5). Par contre, la p65 est largement présente dans le cytoplasme (puits 3) mais également, à plus faible quantité, dans le noyau (puits 6) des cellules DA1 exprimant la protéine hybride. Ces résultats supposent que l'activation de la p65 dans les cellules transformées ne se fait pas au niveau de la localisation subcellulaire. En effet, ce mode d'activation se serait traduit par un résultat montrant la présence du même taux de la protéine p65 dans les deux types cellulaires avec une localisation exclusivement cytoplasmique dans le cas des cellules parentales et une localisation principalement nucléaire dans les cellules transformées, ce qui n'est pas le cas ici. Ce résultat suggère alors que l'activation de la p65 dans les cellules transformées se fait plutôt suite à une modification directe soit au niveau des ARNm (transcription ou post-transcription) soit au niveau de la protéine (traduction ou post-traduction) entraînant la présence abondante de la protéine p65.



Figure R8 : Distribution subcellulaire de la protéine p65.

Les extraits cytoplasmiques et nucléaires, préparés après marquage métabolique des cellules parentales et des cellules transformées, sont soumis à une double immunoprécipitation par l'anticorps anti-p65. Les taux d'incorporation totale du ³⁵S ont été normalisés entre les différents échantillons avant d'effectuer la première immunoprécipitation. Les puits 3 et 6 correspondent respectivement aux extraits cytoplasmiques et nucléaires des cellules DA1 transformées (clone 3b). Les puits 2 et 5 correspondent respectivement aux extraits cytoplasmiques et nucléaires des cellules comme témoin négatif avec les extraits cytoplasmiques (puits 1) et nucléaires (puits 4) du clone 3b. Les niveaux de migration des marqueurs de taille sont indiqués en KDa. La flèche indique la protéine p65.

Le même résultat a été obtenu avec le clone 11a.

84

V. 2. Analyse des taux d'ARNm p65

V. 2. 1. Northern blot

Afin de chercher si l'activation de la p65 par la protéine hybride a lieu au niveau de la transcription, les taux d'ARNm p65 ont été comparés entre les cellules parentales et les clones de cellules transformées en utilisant la technique de *northern blot*.

Les ARN totaux (30 μ g) ont été séparés en gel d'agarose dénaturant puis hybridés, après transfert sur membrane de nitrocellulose, avec une sonde désoxyribonucléotidique complémentaire du messager p65. L'expression de la β actine a été analysée comme témoin interne dans les mêmes échantillons d'ARN totaux.

Le résultat obtenu (Fig. R9) ne montre aucune différence dans les taux d'ARNm entre les cellules parentales et les cellules transformées. En effet, le rapport de la quantité du messager p65 entre les cellules parentales et les cellules transformées est similaire à celui de la β actine (quantification par le PhosphorImager). Ainsi, la protéine hybride p210^{BCR-ABL} n'active pas la p65 au niveau transcriptionnel.

Cependant, il existe un produit d'épissage alternatif désigné p65 Δ qui ne peut pas être distingué par *northern blot* du messager p65 normal. Le messager p65 Δ a été identifié dans des cellules hématopoïétiques primaires et sa quantité par rapport au messager p65 semble être variable selon le type cellulaire et le stade de différenciation (Narayanan *et al.*, 1992a). La présence du p65 Δ devrait jouer un rôle important dans la régulation de l'activité de la protéine p65 normale. En effet, la protéine p65 Δ présente une délétion entre les résidus d'acides aminés en position 222 et 231 ce qui inhibe sa propriété de fixation à l'ADN et donc la formation d'hétérodimères non fonctionnels lors de son interaction avec la protéine p65 (Ruben *et al.*, 1992).

Afin de vérifier que les messagers détectés par *northern blot* correspondent uniquement au transcrit p65, nous avons analysé les messagers p65 par la technique de RT-PCR en utilisant des amorces adéquates pouvant distinguer les deux types de transcrits.



Figure R9: Analyse des taux d'ARNm p65 par transfert de Northern.

Des échantillons de 30 μ g d'ARN totaux des cellules parentales (puits 1) et des clones transformés (le clone 3b: puits 2, le clone 11a : puits 3) ont été hybridés, après électrophorèse et transfert, avec la sonde p65 *Eco*RI. L'expression de la β -actine a été analysée sur les mêmes échantillons d'ARN, après dé-hybridation de la sonde p65.

V. 2. 2. RT-PCR

Les ARN totaux, isolés à partir des cellules parentales et des clones de cellules transformées, ont été rétrotranscrits en une copie d'ADNc, en utilisant des amorces aléatoires. Les produits de la rétrotranscription ont été utilisés par la suite comme matrice pour amplifier par PCR la région codante p65. Les deux amorces utilisées sont situées en dehors de la zone de délétion et ont été choisies de manière à distinguer l'amplification de la p65 de celle de la p65 Δ générant respectivement un fragment de 196 pb et de 176 pb. L'efficacité de la rétrotranscription a été vérifiée en utilisant les même ADNc comme matrice pour amplifier le produit du gène GAPDH.

Le résultat obtenu (Fig. R10) montre le même taux d'amplification p65 entre les cellules parentales et les clones de cellules transformées.

La spécificité des produits amplifiés par les amorces p65 a été vérifiée par *southern blot*. Les produits d'amplification ont été séparés en gel d'agarose, transférés sur membrane de nitrocellulose puis hybridés avec une sonde complémentaire de la région codante p65. La bande amplifiée correspond bien à la p65 (Fig. R10).

L'identité de l'ampligène a été analysée par digestion enzymatique, en utilisant une enzyme de restriction à site de coupure unique (*Bst*NI) présent dans la zone de délétion de l'ampligène p65 Δ et qui permet donc de cliver l'ampligène p65 mais pas le p65 Δ . Le résultat obtenu montre que le produit d'amplification est coupé par cette enzyme et qu'il génère deux fragments de tailles respectives de 119 et 77 pb, révélant alors que la bande amplifiée correspond uniquement à l'ampligène p65 de 196 pb (non présenté).

Ce résultat confirme celui obtenu par la technique de *northern blot* et montre qu'il n'y a aucune différence quantitative ou qualitative au niveau des transcrits p65 entre les cellules parentales et les cellules transformées. Ceci suppose que l'activation de la p65 se fait au niveau traductionnel ou post-traductionnel.



Figure R10: Analyse des ARNm p65 par RT-PCR.

Les ARN totaux des cellules parentales (puits 2) et des cellules transformées (puits 3: clone 3b, puits 4: clone 11a) ont été analysés par RT-PCR, suivie du transfert de Southern, en utilisant une sonde spécifique de la p65. La bande détectée correspond à l'ampligène p65 attendu, de 196 pb. L'expression du GAPDH a été analysée pour vérifier l'efficacité de la rétrotranscription, la PCR a été réalisée en présence d' α -³²P dCTP. Un témoin négatif de PCR a été réalisé en absence de la matrice (puits 1).

Les produits de la PCR ont été visualisés et quantifiés en utilisant un PhosphorImager.

VI. Analyse de la stabilité de la protéine p65

Lors de la réalisation d'expériences d'immunoprécipitation, nous avons remarqué que la différence du taux de la protéine p65 entre les cellules parentales et les cellules transformées variait selon la durée du marquage métabolique effectué. La figure R11.A montrant le résultat de l'immunoprécipitation des extraits de cellules qui ont été marquées pendant 3 h, ne révèle pas de différence significative du taux de la protéine p65 entre les cellules parentales (puits 1) et les cellules transformées (puits 2). Par contre, l'analyse des extraits cellulaires après un marquage d'environ 4 h 30 montre un taux élevé de la protéine p65 dans les cellules transformées par rapport aux cellules parentales (Fig. 11.B). Ceci suggérait que l'activation de la p65 ne se produit pas au niveau de la traduction mais plutôt au niveau de la stabilité protéique.

Afin de tester cette hypothèse, la stabilité de la protéine p65 a été analysée à la fois dans les cellules parentales et les clones exprimant la p210^{BCR-ABL}, en utilisant la technique de *pulse-chase*. Cette technique consiste à marquer les protéines cellulaires au cours de leur synthèse « *in vivo* », par incorporation d'acides aminés marqués à l'isotope ³⁵S, pendant un temps déterminé après lequel le marquage est arrêté pour pouvoir suivre la stabilité au cours du temps des protéines néosynthétisées marquées.

Un marquage métabolique au ³⁵S d'une durée de 30 mn a été alors effectué dans les cellules DA1 cultivées en présence de l'IL-3 ainsi que dans les cellules transformées (clones 11a et 3b). Le marquage a été arrêté en replaçant les cellules dans le milieu de culture standard (non radioactif). A chaque temps indiqué, des extraits cellulaires ont été préparés à partir d'un nombre égale de cellules (le temps 0 correspond au moment de l'arrêt du marquage métabolique). Les extraits cellulaires ont été immunoprécipités en utilisant un anticorps anti-p65, séparés en gel de polyacrylamide-SDS puis analysés par un PhosphorImager.

Les résultats (Fig. R12) montrent que dans les cellules parentales, le taux de la protéine p65 diminue de moitié cinq heures après l'arrêt du marquage (comparer les puits 1 et 2 de la figure. R12.B) ce qui permet de conclure que la protéine p65 possède dans ces cellules un temps de demi-vie au plus égal à 5 h. En revanche, dans les clones exprimant la p210^{BCR-ABL}, la demi-vie de la p65 est d'environ 24 h (comparer les puits 1 et 4 de la figure R12.A).



Figure R11: Analyse du taux de la protéine p65 par immunoprécipitation.

Les extraits cellulaires préparés après marquage métabolique des cellules parentales (puits 1) et des cellules transformées (clone 11a, puits 2), sont soumis à une immunoprécipitation simple par l'anticorps anti-p65, puis analysés après migration en gel de polyacrylamide-SDS 15%.

A: marquage métabolique pendant 3 h.

B: marquage métabolique pendant 4 h 30.

Le 3b montre le même résultat.



Figure R12: Expérience de pulse-chase dans les clones transformés.

Après marquage pendant 30 mn, les cellules sont lavées puis incubées dans le milieu de culture standard. Les extraits cellulaires ont été préparés à partir de 3.10⁶ cellules, à différents temps (indiqués en heures) après l'arrêt du marquage. Les extraits protéiques préparés juste après le lavage correspondent au temps 0 après arrêt du marquage métabolique (puits 1). Les différents extraits ont été immunoprécipités en utilisant l'anticorps anti-p65 puis séparés en gel de polyacrylamide-SDS 15% et analysés par un PhosphorImager.

A: les lysats préparés à partir des cellules transformées: le clone 3b. les cellules du clone 11a montrent le même résultat.

B: les lysats préparés à partir des cellules parentales.

91

Ces résultats révèlent clairement que la stabilité de la protéine p65 se trouve augmentée dans les clones exprimant la protéine hybride, ce qui pourrait être à l'origine de son activation.

En parallèle à l'étude de la stabilité de la protéine p65, nous avons analysé dans les mêmes cellules la stabilité de la protéine I κ B α . Cette protéine joue un rôle important dans la régulation de l'activité des complexes contenant la sous-unité p65. Scott *et al.* (1993) ont montré que lorsque la protéine p65 est surexprimée, la stabilité de la protéine I κ B α , généralement faible, se trouve aussi augmentée que celle de la protéine p65 quand elle y est associée. Les résultats de notre analyse (Fig. R13) montrent que la demi-vie de cette protéine est inférieure à 30 mn à la fois dans les cellules parentales (B) et les cellules transformées (A). Cependant, alors que la protéine I κ B α n'est plus détectable par la suite dans les cellules parentales, elle le reste en faible quantité 24 h après dans les cellules transformées. Ceci laisse supposer que seule une partie de l'ensemble des molécules I κ B α synthétisées serait associée à la protéine p65.

VII. Implication de la fonction tyrosine kinase de la p210^{BCR-ABL} dans l'activation de la protéine p65

Les études d'activation transcriptionnelle ont montré l'importance de l'activité tyrosine kinase de la protéine p $210^{BCR-ABL}$ dans l'augmentation de l'activité NF- κ B. Comme la corrélation des différents résultats obtenus laisse supposer que la protéine hybride stimule l'activité NF- κ B au moins via l'activation de la sous-unité p65, nous avons cherché alors si la fonction tyrosine kinase est requise pour l'augmentation de la stabilité de la protéine p65. Pour cela, les expériences de *pulse-chase* ont été réalisées dans des cellules qui expriment de manière stable la forme mutée de la p $210^{BCR-ABL}$ (K1171R), à activité tyrosine kinase défectueuse. La forme mutée Y177F, qui n'interagit plus avec la protéine d'adaptation GRB2, a été utilisée comme témoin de spécificité.



Figure R13: Analyse de la stabilité de la protéine IkBa.

La stabilité a été analysée dans les cellules parentales (B) et les clones transformés (clone 3b, A) de la même manière décrite dans la légende de la figure R12.

VII. 1. Obtention des populations cellulaires

Les cellules DA1 ont été transfectées par le vecteur exprimant la forme sauvage de la protéine p210^{BCR-ABL} ou exprimant la forme mutée soit Y177F soit K1171R puis sélectionnées sur la base de leur résistance à la généticine, en présence de l'IL-3.

Afin d'éviter les altérations génétiques qui peuvent survenir lors des conditions de culture défavorables liées à la sélection, le temps entre le début de la sélection et l'utilisation des clones a été écourté en utilisant directement l'ensemble de la population cellulaire résistante à la généticine, obtenue au bout de deux semaines de sélection. Ceci permet en même temps de confirmer que le résultat obtenu plus haut, dans les clones transformés isolés (11a et 3b), est spécifique de l'expression de la protéine p210^{BCR-ABL} et non pas un effet de la variabilité clonale. Les populations cellulaires ont été caractérisées pour l'expression des protéines BCR-ABL. Les extraits issus d'un même nombre de cellules ont été analysés parallèlement par *western blot* (analyse de l'expression protéique) et par réaction d'autophosphorylation *in vitro* (analyse de l'activité tyrosine kinase).

La figure R14 montre que la protéine hybride est exprimée de manière constitutive aussi bien dans la population cellulaire issue des cellules transfectées par le vecteur pcDNA-p210 que dans celle issue des cellules transfectées par pcDNA-Y177F ou le pcDNA-K1171R (Fig. R14.A puits 1, 2 et 3). Par contre l'activité tyrosine kinase a été détectée dans les cellules expriment la forme sauvage ou le mutant Y177F (puits 1 et 3) mais pas dans celles qui expriment le mutant K1171R (Fig. R14.B, puits 2).

VII. 2. Analyse de la stabilité de la protéine p65

La stabilité de la protéine p65 a été analysée dans les trois populations cellulaires, en utilisant la même procédure décrite précédemment. Le résultat de l'analyse effectuée dans la population cellulaire exprimant la protéine hybride sauvage est le même que celui obtenu dans les clones isolés de cellules transformées (Fig. R12.A). L'analyse de la population cellulaire exprimant le mutant Y177F (Fig. R15.A) montre que la stabilité de la protéine p65, demi-vie



Figure R14: Caractérisation des populations cellulaires.

Les extraits cellulaires d'un même nombre de cellules de la population ayant intégré le vecteur d'expression vide (puits 4) ou contenant soit le mutant Y177F (puits 3) soit le mutant K1171R (puits 2), soit la forme sauvage p210^{BCR-ABL} (puits 1) ont été analysés par immunoblot (A) ou par réaction kinase (B). La flèche indique la p210^{BCR-ABL} ou la p145^{c-ABL}.



Figure R15: Expérience de pulse-chase dans les populations cellulaires. Cette expérience a été réalisée comme décrit dans la légende R12, dans la population

cellulaire exprimant le mutant Y177F (A) et celle exprimant le mutant K1171R (B).

d'environ 24 h, est similaire à celle observée dans les cellules exprimant la p210^{BCR-ABL} sauvage (comparer avec la figure R12. A). En revanche, la stabilité de la protéine p65 dans la population cellulaire exprimant la forme mutée à activité tyrosine kinase défectueuse (Fig. R15. B) est la même que dans les cellules parentales, sa demi-vie est d'environ 5 h.

Ceci démontre clairement que l'augmentation de la stabilité de la protéine p65 est bien le résultat de l'expression de la protéine hybride et que la fonction tyrosine kinase est requise pour cet effet.

VIII. Le rôle de la p65 dans la transformation médiée par la p210^{BCR-ABL}

Dans le but d'aborder l'étude de la fonction de la p65 dans le pouvoir oncogénique de la p210^{BCR-ABL}, l'expression de la p65 a été inhibée par l'utilisation d'oligonucléotides antisens et l'effet de cette inhibition a été analysé sur la capacité de la protéine hybride à induire la survie et la prolifération des cellules privées d'IL-3.

VIII. 1. Vérification de la spécificité d'action des oligonucléotides

L'oligonucléotide antisens utilisé (matériels et méthodes) est un désoxyribonucléotide modifié comportant des liaisons phosphorothioates et il est complémentaire de la région du messager recouvrant le codon d'initiation. Cet oligonucléotide a déjà été décrit pour sa propriété d'inhiber spécifiquement l'expression de la sous-unité p65 mais pas celle des autres membres de la famille NF- κ B (Fujita *et al.*, 1992). Néanmoins, la diminution du taux d'ARNm p65 par cet oligonucléotide a été vérifiée afin de s'assurer que l'effet qui sera analysé par la suite est bien le résultat de l'inhibition de l'expression de la p65 et non pas le résultat d'un phénomène de cytotoxicité, lié généralement à l'utilisation des oligonucléotides. Ainsi, des cellules (clone 3b) ont été incubées (10⁵ cellules/ml) en présence de l'oligonucléotide (30 μ M) sens (témoin de spécificité) ou antisens de la p65 et les taux d'ARNm p65 ont été analysés 48 h plus tard, par la technique de RT-PCR. La comparaison des taux d'ARNm p65 entre les cellules traitées avec l'oligonucléotide sens et celles traitées avec l'oligonucléotide antisens montre que ce

dernier entraîne une diminution d'au moins un facteur 15 de ces ARNm (Fig. R16, comparer les puits 1 et 2); le taux d'ARNm témoins (GAPDH) reste invariable (puits 3 et 4). Ceci montre que l'oligonucléotide antisens diminue de manière spécifique le taux des ARN messagers p65.

VIII. 2. Effet des oligonucléotides antisens

L'introduction du vecteur exprimant la protéine p210^{BCR-ABL} dans les cellules DA1 permet la survie de ces cellules en absence d'IL-3 et entraîne la formation de colonies indépendantes du facteur de croissance dans les deux semaines qui suivent la transfection. Par contre, les DA1 n'exprimant pas la protéine hybride ne survivent pas en absence d'IL-3 (voir paragraphe I).

Les cellules DA1 ont été transfectées par le pcDNA3 ou le pcDNA3-p210 puis incubées à la même densité (10⁴ cellules) dans un milieu sans IL-3, en absence ou en présence d'oligonucléotides soit sens soit antisens de la p65. Deux semaines plus tard, les clones de cellules apparus ont été dénombrés (tableau. R2). Les cellules transfectées par le vecteur pcDNA-p210 engendrent 40 clones cellulaires (0,4% du nombre de cellules de départ) et 21 clones lorsqu'elles sont traitées par l'oligonucléotide sens, mais aucun clone n'est obtenu après traitement par l'oligonucléotide antisens. Ces résultats montrent que l'oligonucléotide antisens interfère avec l'activité transformante de la protéine p210^{BCR-ABL}.

L'effet de l'antisens a été testé par la suite sur la prolifération des clones stables exprimant la protéine hybride. Une semaine après le traitement oligonucléotidique, les cellules ont été dénombrées (l'effet a été analysée sur la prolifération cellulaire car le clone 3b est déjà indépendant de l'IL-3). Le résultat (tableau. R2) montre que, par comparaison à l'effet de l'oligonucléotide sens, l'oligonucléotide antisens n'a aucun effet sur la prolifération du clone établit.

La différence dans le nombre de cellules entre celles traitées au départ avec les oligonucléotides et celles non traitées est due à un effet cytotoxique des oligonucléotides qui est le même pour le sens et l'antisens. Cet effet cytotoxique explique la différence dans le





Figure R16: L'inhibition du taux d'ARNm p65 par l'oligonucléotide antisens.

Les cellules (clone 3b) ont été mises en culture en présence de l'oligonucléotide sens (S) (puits 1 et 3) ou antisens (AS) (puits 2 et 4) de la p65. Les ARN totaux ont été analysés pour l'expression de la p65 et le GAPDH, par RT-PCR en présence d' α -³²P dCTP. Les produits de la PCR ont été analysés et quantifiés, après électrophorèse, par un PhosphorImager.

DA1 ^a		3b ^b
pcDNA3	pcDNA-p210	
0	40	10
0	21	5.3
0	0	5
	DA pcDNA3 0 0 0	DA1 ^a pcDNA3 pcDNA-p210 0 40 0 21 0 0

Tableau R2. Effet de l'oligonucléotide antisens p65 sur la transformationmédiée par la p210

^a 10⁴ cellules à partir des cellules DA1 transfectées ont été traitées avec les oligonucléotides après privation en IL-3. Les résultats indiquent le nombre de clones apparus 2 semaines plus tard.

^b 10^4 cellules du clone 3b ont été traitées avec les oligonucléotides. Une semaine plus tard, les cellules vivantes ont été dénombrées par la méthode d'exclusion du bleu Trypan. Les valeurs représentent le nombre de cellules vivantes X 10^4 .

Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

nombre de clones obtenus plus haut entre les cellules transfectées par le pcDNA-p210, après traitement ou non avec l'oligonucléotide sens.

Ces résultats laissent supposer que l'activation de la protéine p65 devrait jouer un rôle important dans la transformation médiée par la p210^{BCR-ABL}, probablement un rôle précoce au niveau de la survie cellulaire ou l'établissement de l'état transformé puisque l'oligonucléotide antisens n'a aucun effet sur la prolifération des cellules transformées qui sont déjà indépendantes de l'IL-3.

DISCUSSION

I. Stimulation de l'activité NF-KB par la protéine p210^{BCR-ABL}

Les études d'activation transcriptionnelle, entreprises dans le cadre général de la recherche des cibles nucléaires de la protéine hybride, nous ont amené à focaliser notre travail sur la famille des facteurs de transcription Rel/NF- κ B en tant que cibles potentielles de cette protéine. En effet, les résultats des études réalisées dans la lignée myéloïde DA1 ont révélé la stimulation spécifique de l'activité NF- κ B sous l'effet de l'expression de la protéine p210^{BCR-ABL} mais aucune activation n'a été observée à partir de l'élément de réponse AP1.

Etant donné que l'activation de la voie signalétique de Ras a été montrée nécessaire pour la transformation mediée par la protéine BCR-ABL (Pendergast *et al.*, 1993; Puil *et al.*, 1994), on peut se demander pourquoi l'élément AP1, qui est un élément de réponse de la voie de Ras, n'est pas activé par la protéine p $210^{BCR-ABL}$ dans les cellules DA1. Kabarowski *et al.* (1994) ont montré que, dans les lignées de cellules hématopoïétiques dépendantes de l'IL-3, l'effet précoce de la protéine hybride est de prolonger la survie des cellules en absence du facteur de croissance. L'induction du signal de prolifération, qui implique entre autre l'activation de la voie des MAP kinases aboutissant à la stimulation de l'activité des facteurs de transcription AP-1, est un effet secondaire de l'expression prolongée de la protéine p $210^{BCR-ABL}$ et qui nécessiterait la coopération d'autres événements cellulaires. Ceci pourrait expliquer le résultat obtenu lors des études d'activation transcriptionnelle que nous avons réalisées, où l'activation de l'élément AP-1 par la protéine hybride dans les cellules cultivées en présence de l'IL-3 n'est pas retrouvée en absence du facteur de croissance (Fig. R3). En revanche, la stimulation de l'activité NF- κ B révélée par ces études en expression de la protéine p $210^{BCR-ABL}$.

L'effet de la protéine p $210^{BCR-ABL}$ sur l'activité NF- κ B, révélé par nos expériences, diffère de celui montré pour l'oncogène v-ABL dans les cellules pré-B où il régule négativement l'activité NF- κ B (Klug *et al.*, 1994). Cette différence n'est pas surprenante et peut être attribuée à plusieurs facteurs.

 D'une part, l'inhibition de l'activité NF-κB par v-ABL peut être restreinte à l'oncogène v-ABL dans les cellules pré-B. Généralement, l'activité des facteurs Rel/NF-κB est étroitement régulée pour produire une action spécifique du gène cible et du type cellulaire (Lernbecher et al., 1993 ; Brown et al., 1994, Shu et al., 1993).

• D'autre part, elle peut être attribuée aux différences fondamentales qui existent entre les deux oncogènes. Les protéines p210^{BCR-ABL} et v-ABL présentent une différence structurale (Fig. G6, p.37) pouvant impliquer des différences au niveau des interactions avec les protéines signalétiques. La partie N-terminale de BCR (les 902 ou 927 premiers acides aminés) présente au sein de la p210^{BCR-ABL}, mais absente dans la protéine v-ABL, est essentielle au pouvoir oncogénique de la protéine hybride (Muller et al., 1991 ; McWhirter and Wang, 1991, 1993; Pendergast et al., 1991) et offre des propriétés d'interactions protéines-protéines additionnelles à celles apportées par la région ABL. Le domaine d'oligomérisation BCR (aa 1 à 63), à l'origine de la formation des tétramères p210^{BCR-ABL}, permet aussi l'interaction de la protéine hybride avec la protéine BCR (McWhirter et al., 1993 ; Liu et al., 1993) et la tyrosine en position 177 de la région BCR permet à la protéine hybride d'interagir directement avec la voie signalétique de RAS en s'associant à la protéine d'adaptation GRB2 (Pendergast et al., 1993). En outre, le domaine BCR de fixation aux motifs SH2 (aa 197 à 385) permet l'interaction potentielle de la protéine hybride avec de nombreuses protéines signalétiques (Reuther et al., 1994). La différence structurale entre les oncogènes v-ABL et p210^{BCR-ABL} se reflète également sur la localisation cellulaire. La protéine v-ABL, contrairement à la p210^{BCR-ABL}, peut se fixer à la membrane du fait de sa myristylation (Daley et al., 1987). De plus, dans les cellules myéloïdes, la protéine p210^{BCR-ABL} se trouve colocalisée avec les filaments d'actine dans des structures particulières du cytosquelette : punctate structure où elle interagit avec les protéines d'adhésion focale (Salgia et al., 1995a; b), ce qui n'est pas le cas de v-ABL. Les deux oncogènes possèdent également des propriétés transformantes différentes dans les fibroblastes (Daley et al., 1987, Renshaw et al., 1995) et induisent des maladies différentes chez la souris: le v-ABL induit des lymphomes B (Cook, 1982; Scott et al., 1991) alors que la p210^{BCR-ABL} induit des leucémies myéloïdes et lymphoïdes (Daley et al., 1990; Heisterkamp et al., 1990).

L'analyse de l'effet de l'expression de v-ABL dans la lignée cellulaire myéloïde DA1 pourrait clairement montrer si l'activité NF-kB se trouve différemment régulée par les oncogènes v-ABL et BCR-ABL, ou si la régulation de cette activité dépend plutôt du type cellulaire.

II. Activation de la propriété de fixation à l'ADN de la p65 NF- κ B dans les cellules exprimant la protéine p210^{BCR-ABL}

L'augmentation de l'activité NF- κ B sous l'effet de l'expression de la protéine p210^{BCR-ABL} nous a conduit à rechercher les membres de cette famille de facteurs de transcription qui sont activés par la protéine hybride. Ainsi, l'utilisation d'anticorps spécifiques dans les expériences de retard en gel a montré que la p210^{BCR-ABL} active la protéine p65 puisque cette dernière est présente dans les complexes NF- κ B actifs des cellules exprimant la protéine hybride mais pas dans ceux des cellules parentales. Cependant, on ne peut pas affirmer que la p65 est le seul membre activé de la famille Rel/NF- κ B. La présence de la protéine Rel B n'a pas été testée lors de ces expériences ; de plus, les membres de la famille Rel/NF- κ B ont des affinités variables pour les différents sites consensus et on ne peut donc pas exclure le fait que certaines combinaisons de sous-unités Rel/NF- κ B ne puissent pas être mise en évidence par le site κ B utilisé dans nos expériences (Ig $\kappa \kappa$ B). En revanche, comme il existe des sites κ B spécifiques de la protéine p65 qui sont plus actifs que le site testé Ig $\kappa \kappa$ B (Krunsh *et al.*, 1992), le taux de la p65 active détecté par retard en gel peut être d'une grande importance physiologique.

Les résultats des expériences de retard en gel nous ont amené à conclure que la $p210^{BCR-ABL}$ stimule l'activité NF- κ B au moins via l'activation de la protéine p65.

III. Activation de la p65 par augmentation de la stabilité protéique

La détection de la forme active de la sous-unité p65 dans les clones de cellules exprimant la protéine p210^{BCR-ABL} nous a conduit à rechercher le niveau de son activation. L'analyse de la distribution cellulaire de la protéine p65 a suggéré qu'elle serait activée suite à une modification directe soit au niveau du transcrit soit au niveau de la protéine, puisque cette

dernière a été détectée dans les extraits à la fois cytoplasmiques et nucléaires des clones exprimant la p210^{BCR-ABL} et seulement en faible quantité dans le cytoplasme des cellules parentales. L'analyse des taux d'ARNm p65 n'a montré aucune différence entre les cellules parentales et les clones de cellules transformées, supposant que l'activation a eu lieu au niveau de la protéine.

L'analyse de la stabilité protéique a montré que l'expression de la p210^{BCR-ABL} augmente la demi-vie de la protéine p65. Cet effet serait médié par l'activité tyrosine kinase de la protéine hybride puisqu'il n'est pas retrouvé lorsque la p210^{BCR-ABL} est exprimée sous sa forme défectueuse.

La dégradation protéique joue un rôle important dans la régulation de l'abondance tissulaire mais également temporaire des facteurs de transcription afin qu'ils puissent agir de manière appropriée dans le contrôle des étapes de la différenciation et du cycle cellulaire où ils seraient impliqués (Carillo *et al.*, 1995 a et b). Plusieurs arguments sont en faveur d'une corrélation entre les altérations de stabilité protéique et la transformation cellulaire (Treier *et al.*, 1994 ; Scheffner *et al.*, 1990 ; Cohn *et al.*, 1990).

Les complexes Rel/NF- κ B qui contiennent la sous-unité p65 ont généralement une activité inductible de type transitoire, on peut alors concevoir que l'augmentation de la stabilité de la protéine p65 entraînerait son abondance cellulaire et donc la persistance de sa fonction au delà des temps appropriés.

Cependant, les cellules possèdent généralement un système de régulation étroit qui assure l'activité transitoire des complexes contenant la p65. En effet, à l'état inactif ces dimères sont retenus dans le cytoplasme via leur association avec la protéine inhibitrice I κ B α . Sous l'effet de divers stimuli, I κ B α est rapidement dégradé et les complexes libérés sont transloqués vers le noyau où ils vont agir sur les gènes cibles. Le retour à l'état inactif se fait rapidement, car d'une part I κ B α possède un taux de renouvellement très élevé (Rice and Ernst, 1993), d'autre part son expression est augmentée par l'activité NF- κ B du fait de la présence de sites κ B dans son promoteur (Brown *et al.*, 1993 ; Sun *et al.*, 1993) et les molécules I κ B α néo-synthétisées vont alors séquestrer de nouveau les dimères dans le cytoplasme. De plus, Scott *et al.* (1993) ont montré que la surexpression cellulaire de la p65 augmente également la stabilité de I κ B α : la demi-vie de I κ B α , généralement de l'ordre de 30 mn, devient aussi longue que celle de la protéine p65 quand elle y est associée. Dans nos expériences, nous avons montré la présence continue de la protéine p65 dans le noyau des cellules DA1 exprimant la p210^{BCR-ABL} (analyse de la distribution cellulaire, et retard en gel). Ainsi, on peut se demander comment l'activité p65 peut échapper dans ce cas au système d'autorégulation négative impliquant la protéine I κ B α . Plusieurs explications peuvent être avancées sur la base de la complexité de la régulation de l'activité NF- κ B, qui n'est d'ailleurs pas totalement explorée:

- D'abord, on peut supposer que l'abondance de la protéine p65 excède la capacité de la cellule à synthétiser le nombre de molécules IκBα suffisant pour entraîner l'inhibition totale de son activité. D'ailleurs, il a été montré que lors de la surexpression de la p65 dans certains modèles cellulaires, une quantité assez importante de cette protéine échappe à l'interaction avec IκBα et se trouve localisée dans le noyau (Beg *et al.*, 1992 ; Zabel *et al.*, 1993).
- En outre, la concentration des autres sous-unités Rel/NF-κB peut également jouer un rôle, plus particulièrement celle de la protéine c-Rel dont l'expression est stimulée par la p65 (Hannink and Temin, 1990; Sun *et al.*, 1994). Comme la protéine inhibitrice IκBα interagit à la fois avec la p65 et c-Rel, sa quantité dans la cellule pourrait être insuffisante pour séquestrer dans le cytoplasme tous les complexes Rel/NF-κB présents.
- Il faut également tenir compte du rôle de la protéine inhibitrice IκBβ qui apporte un autre niveau de complexité dans la régulation de l'activité NF-κB. Cette protéine est exprimée de la même manière que IκBα dans les cellules et s'associe aux mêmes complexes Rel/NF-κB, à savoir ceux contenant les sous-unités p65, c-Rel et Rel B. Mais ces deux protéines inhibitrices répondent différemment aux signaux inducteurs : ceux qui induisent une réponse transitoire (comme le PMA et le TNFα) entraînent la dégradation de IκBα et l'activation des complexes associés mais la synthèse des nouvelles molécules IκBα permet le retour rapide à l'état latent de départ ; par contre d'autres stimuli (comme le LPS et IL-1) permettent en plus la dégradation de IκBβ dont l'expression n'est pas régulée par l'activité NF-κB et ainsi, les complexes associés vont persister plus longtemps dans le noyau probablement pour réguler des gènes dont l'activation n'est pas de nature transitoire, comme ceux impliqués dans la régulation de la différenciation (Thompson *et al.*, 1995). La question qui reste posée est comment les dimères NF-κB associés à IκBβ demeurent, après leur activation, insensibles à l'inhibition par la protéine IκBα.
Lorsque nous avons comparé la stabilité de la protéine I κ B α entre les cellules parentales et celles exprimant la protéine p210^{BCR-ABL} (Fig. R13) nous avons trouvé dans les deux cas une demi-vie inférieure à 30 mn. Mais contrairement aux cellules parentales où I κ B α disparaît juste après, cette protéine reste détectable en faible quantité 24 h après sa synthèse dans les cellules exprimant la protéine p210^{BCR-ABL}. En se basant sur le fait que la stabilité de I κ B α reflète son association avec la protéine p65 (Scott *et al.*, 1993), ce résultat suggère que seule une faible quantité de I κ B α sont associées à d'autres complexes Rel/NF- κ B et/ou que la p65 est également ciblée par un autre inhibiteur comme la protéine I κ B β qui n'est pas impliquée dans l'autorégulation négative.

Il serait ainsi intéressant d'analyser, dans les cellules DA1 transformées par la $p210^{BCR-ABL}$, l'interaction de la p65 avec les molécules IkB de même que le taux d'expression de la protéine c-Rel et son interaction avec les protéines inhibitrices.

L'activité tyrosine kinase de la p $210^{BCR-ABL}$ étant requise pour l'augmentation de la stabilité de la protéine p65, il faudrait examiner si la p65 est un substrat direct de la phosphorylation. Mais, il faudrait aussi rechercher si dans les cellules exprimant la p $210^{BCR-ABL}$, l'activation de la p65 résulte uniquement de l'augmentation de la stabilité de la protéine ou si elle s'accompagne de modifications supplémentaires au niveau de la p65 ou au niveau des protéines inhibitrices I κ B. En effet, les tyrosines kinases pourraient jouer un rôle important dans la régulation des facteurs Rel/NF- κ B. Dans des cellules stimulées, les protéines c-Rel, p105 et p65 ont été trouvées sous une forme phosphorylée (sur des résidus tyrosine pour les deux premières protéines) par des kinases non encore identifiées. Ces phophorylations pourraient jouer un rôle dans la sélectivité d'interactions entre les différents membres de la famille Rel/NF- κ B et leurs interactions avec les protéines I κ B (Neumann *et al.*, 1992 ; Naumann and Scheidereit, 1994).

IV- Les implications potentielles de l'activation de la p65 par la protéine p210^{BCR-ABL}

Les expériences d'oligonucléotides antisens supposent que la p65 joue un rôle important dans le pouvoir transformant de la p210^{BCR-ABL}. Mais, l'effet biologique de la protéine hybride au niveau duquel intervient l'activation de la p65 reste à préciser. En effet, nous avons analysé lors de nos expériences l'effet de l'antisens p65 sur l'apparition de clones cellulaires indépendants de l'IL-3. Or, on sait que l'action primaire de la protéine p210^{BCR-ABL} sur les lignées cellulaires hématopoïétiques est de permettre leur survie en l'absence du facteur de croissance requis (IL-3); l'acquisition des propriétés de prolifération par ces cellules est un événement secondaire découlant du premier.

Néanmoins, nous pensons que la p65 serait impliquée dans les effets précoces de la protéine hybride. D'une part, l'inhibition de l'apparition de clones transformés à partir des cellules transfectées traitées par l'antisens p65, a été obtenue sans renouveler l'addition de l'oligonucléotide qui n'est pas très stable dans le milieu de culture. Ceci suppose que l'effet de l'antisens a eu lieu au moins les premiers jours qui ont suivi la privation en IL-3, et aurait donc un effet probable sur la survie des cellules.

D'autre part, l'oligonucléotide antisens n'a aucun effet sur la croissance des clones de cellules indépendants de l'IL-3. Cependant, l'effet de l'oligonucléotide sur ces cellules transformées est à vérifier, compte tenu de la stabilité élevée de la protéine p65.

La corrélation entre différentes données est en faveur d'un rôle important de la p65 en tant que médiateur du pouvoir oncogénique de la p210^{BCR-ABL}:

L'inhibition de l'expression de la p65 par des oligonucléotides antisens spécifiques, entraîne la régression des tumeurs établies *in vivo*, à partir de cellules transformées par le HTLV-1 (Kitajima *et al.*, 1992). De la même manière, les antisens anti-p65 ont un effet inhibiteur sur la croissance *in vitro* de différentes cellules transformées ainsi que sur le développement de tumeurs *in vivo*, et entraînent également la régression de tumeurs établies (Higgins *et al.*, 1993); cet effet antitumoral résulterait de l'interférence avec les mécanismes d'adhésion cellulaire.

Plusieurs travaux attestent du rôle important que pourrait avoir l'interférence de la protéine p210^{BCR-ABL} avec le système d'adhésion cellulaire dans le pouvoir oncogénique de la protéine hybride. Renshaw et al. (1995) ont montré que la protéine p210^{BCR-ABL} rend la prolifération de fibroblastes indépendante de l'ancrage mais pas du sérum (n'induisent pas de signal mitogène) et ont supposé que la protéine hybride active un signal médié par l'adhésion cellulaire. La protéine p210^{BCR-ABL} a été effectivement trouvée localisée, dans les cellules myéloïdes, dans des structures similaires aux plaques d'adhésion focale, qui constituent les sites de régulation de la fonction des intégrines (Hynes, 1992 ; Miyamoto et al., 1995), où elle phosphoryle de manière constitutive des protéines d'adhésion focale (Salgia et al., 1995a; b; c). Les protéines d'adhésion focale sont impliquées dans la transduction du signal des intégrines, elles reçoivent et transmettent les signaux en faisant intervenir des événements de phosphorylation/déphosphorylation sur les résidus tyrosine (Burridge et al., 1992; Juliano and Haskill, 1993). Les intégrines activent plusieurs signaux impliqués dans différentes fonctions cellulaires dont le contrôle de la réponse apoptotique, l'effet anti-apoptotique médié par les intégrines fait intervenir des événements de phosphorylation (Meredith et al., 1993; Ruoslahti and Reed, 1994). L'activation des intégrines aboutit à l'expression sélective d'un certain nombre de gènes, principalement ceux contrôlés par l'activité NF-KB, cette expression est également sous la dépendance des événements de phosphorylation (Juliano and Haskill, 1993).

Nos résultats montrant l'activation spécifique de la protéine p65 par l'oncogène p210^{BCR-ABL} et sa nécessité pour la transformation de la lignée myéloïde DA1, supposent que la p65 est une cible de la protéine hybride. La fonction tyrosine kinase de la protéine hybride est requise pour l'activation de la p65. Ces résultats placés dans le contexte des données montrant d'une part que la protéine p210^{BCR-ABL} interagit via son activité tyrosine kinase avec un signal médié par les intégrines et d'autre part, que les événements de phosphorylation sont impliqués dans le signal de survie médié par les intégrines mais aussi dans l'induction de l'activité NF- κ B suite à l'activation des intégrines, permettent d'émettre l'hypothèse que la p65 pourrait être un composant du signal des intégrines ciblé par la protéine hybride.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le rôle causal du gène hybride *bcr-abl* dans la leucémie myéloïde chronique a été démontré dans des modèles animaux mais les mécanismes moléculaires conduisant à l'établissement de cette leucémie restent à élucider. La protéine hybride p210^{BCR-ABL}, produit du gène *bcr-abl*, possède une structure complexe comprenant plusieurs domaines et motifs fonctionnels qui traduisent une interaction complexe avec les voies signalétiques cellulaires. Les mécanismes d'action de cette protéine ont fait l'objet de nombreuses études au cours des quatre dernières années dont les résultats principaux dégagés sont l'implication des voies de RAS et de c-MYC dans la transformation par la protéine hybride. Ces études ont également révélé le rôle anti-apoptotique et la protéine p210^{BCR-ABL}, ainsi que son interaction avec les mécanismes d'adhésion cellulaire. La protéine hybride est également supposée induire la prolifération des cellules hématopoïétiques, en activant des voies signalétiques normalement activées par des facteurs de croissance, principalement la voie des protéines JAK/STAT (Shuai *et al.*, 1996; Wilson-Rawls *et al.*, 1996).

Le travail que nous avons effectué ouvre de nouvelles perspectives quant à l'étude du mécanisme d'action de la protéine oncogénique p $210^{BCR-ABL}$. Il montre que l'expression de la protéine hybride, dans la lignée cellulaire myéloïde murine DA1, stimule l'activité NF- κ B. La protéine p $210^{BCR-ABL}$ semble particulièrement activer la protéine p65 NF- κ B dont la propriété de fixation à l'ADN a été révélée dans les cellules exprimant de manière stable la protéine hybride mais pas dans les cellules parentales. La protéine p $210^{BCR-ABL}$ augmente la stabilité de la protéine p65 et semble médier cet effet via sa fonction tyrosine kinase. L'utilisation d'oligonucléotides antisens anti p65 inhibe la propriété de la protéine p $210^{BCR-ABL}$ de transformer les cellules DA1 en les rendant indépendantes de l'IL-3. Ces résultats laissent supposer que la p65 NF- κ B pourrait jouer un rôle important dans le pouvoir oncogénique de la protéine hybride.

Neumann *et al.* se sont intéressés très récemment (1996) à l'étude de l'effet de l'expression de la p $210^{BCR-ABL}$ sur la protéine c-Rel. Ce travail, réalisé dans une lignée myéloïde humaine, a montré que l'effet de certaines cytokines sur la protéine c-Rel (son expression, sa phosphorylation et son activité de liaison à l'ADN) se trouve modifié en présence de l'expression de la protéine p $210^{BCR-ABL}$. Cette étude rejoins la notre pour suggérer l'éventuelle implication de la famille des facteurs de transcription Rel/NF- κ B dans la LMC.

Il est donc intéressant de développer l'étude du rôle de cette famille dans la transformation médiée par l'oncogène p $210^{BCR-ABL}$. Dans notre cas, il faudrait approfondir l'étude en recherchant de manière plus précise le mécanisme d'activation de la protéine p65 et la contribution des autres membres de la famille Rel/NF- κ B ou I κ B. Il faudrait également étendre l'étude à d'autres lignées cellulaires afin de chercher si l'activation de NF- κ B par la protéine p $210^{BCR-ABL}$ est retrouvée dans différents types cellulaires ou si elle est spécifique des cellules myéloïdes.

Il est aussi intéressant de déterminer le rôle exact de la p65 dans la transformation médiée par la protéine p210^{BCR-ABL} plus particulièrement en recherchant un éventuel lien entre l'activation de la protéine p65 et le rôle anti-apoptotique de la protéine hybride et/ou son interaction avec le signal des intégrines.

MATERIELS ET METHODES

A. Analyse, purification et manipulations génétiques de l'ADN plasmidique

I. Electrophorèse d'ADN en gel non dénaturant

I. 1. Gel d'agarose

Le gel d'agarose est utilisé pour la séparation en migration horizontale, selon leur poids moléculaire, des fragments d'ADN linéaires de taille comprise entre 200 pb et 50 Kb. La concentration en agarose du gel varie de 0,3% à 2% (P/V), selon la taille des fragments à séparer. L'échantillon d'ADN à analyser est mélangé à une solution de BB ϕ (bleu de bromophénol 0,25 %; saccharose 40 %) à raison de 5 volumes pour 1 volume, puis déposé dans les puits du gel. La migration se fait sous une tension de 90 V, dans du tampon TBE (Tris 135 mM; acide borique 45 mM; EDTA 2,5 mM; pH 8,3). L'ADN est ensuite visualisé sous lumière UV (366 nm) grâce au BrEt, intercalant fluorescent contenu dans le gel (0,5 µg/ml).

I. 2. Gel de polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide permet la séparation en migration verticale des petits fragments d'ADN (5pb-500 pb), avec une résolution élevée. Sa concentration en acrylamide varie de 3,5 à 20%, selon la taille des fragments à séparer. Le gel est formé suite à la polymérisation de la solution d'acrylamide (acrylamide/bisacrylamide 29/1), en présence de persulfate d'ammonium 0,07 % et de TEMED 0,1 %. L'ADN est mélangé à une solution de BB¢ contenant en plus du xylène cyanol 0,25 %, puis déposé dans les puits du gel. La migration se fait dans le tampon TBE, sous une tension de 90 V. Le gel est ensuite immergé dans une solution de BrEt (0,5 µg de BrEt/ml de TBE) pendant 30 mn, l'ADN est alors visualisé sous UV.

II. Purification des fragments d'ADN séparés en gel

II. 1. A partir d'un gel d'agarose

II. 1. 1. Geneclean II[®] Kit

Ce système commercialisé (BIO 101 Inc) a été utilisé pour la purification, à partir d'un gel d'agarose, de fragments d'ADN dont la taille est supérieure à 500 pb. Il permet une purification rapide et de bonne qualité, avec un bon rendement.

Après électrophorèse, la partie du gel d'agarose contenant le fragment d'ADN d'intérêt, visualisé sous UV, est excisée puis mise dans un tube Eppendorf après estimation de son volume (1 g correspond approximativement à 1 ml). L'agarose est ensuite dissout par addition de 4,5 volumes de la solution NaI et 1/2 volume de la solution TBE modifier (solution concentrée en sel), suivie d'une incubation de 5 mn à 50°C. La suspension GLASSMILK est alors ajoutée à raison de 5 µl pour une quantité d'ADN, contenu dans la solution d'agarose, estimée \leq à 5 µg (pour une quantité d'ADN supérieure à 5 µg, il faut ajouter 1 µl de la suspension pour chaque 0,5 µg d'ADN supplémentaire). Cette suspension contient des billes de silice qui vont fixer l'ADN après incubation 15 mn dans la glace. Les billes fixant l'ADN sont récupérées au fond du tube après une centrifugation de 5 secondes à 5 500 g et élimination du surnageant, puis sont lavées 3 fois avec la solution NEW WASH afin d'éliminer les contaminants. A la suite de la dernière centrifugation, l'ADN est élué des billes en remettant en suspension l'ensemble dans un volume d'eau déminéralisée au moins égal au volume de GLASSMILK utilisé au départ et en incubant à 50°C pendant 3 mn. Une centrifugation de 30 secondes à 5 500 g permet alors la récupération de l'ADN pur dans le surnageant.

II. 1. 2. DEAE-élution

Cette méthode est utilisée pour purifier des fragments d'ADN, sans restriction de taille, après leur séparation en gel d'agarose. Une membrane DEAE-cellulose (NA 45

Schleicher and Schuell) est insérée dans une incision effectuée dans le gel, juste devant le fragment d'ADN d'intérêt (dans le sens de la migration), l'électrophorèse est poursuivie jusqu'à ce que le fragment d'ADN soit transféré sur la membrane (environ 15 mn sous 90 V). La membrane est ensuite placée dans 400 µl d'une solution Tris 20 mM; EDTA 1 mM; NaCl 1 M; pH 7,5, puis incubée pendant 30 mn à 68°C; l'ADN ainsi élué se retrouve en solution. L'ADN est précipité pendant 20 mn à -70°C après addition de 2,5 volumes d'éthanol, puis centrifugé 15 mn à 12 000 g, rincé à l'éthanol 70 % et séché sous vide. L'ADN contenu dans le culot est repris dans un volume approprié d'eau déminéralisée ou de TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8).

II. 2. A partir d'un gel de polyacrylamide

II. 2. 1. DEAE-élution

La partie du gel de polyacrylamide contenant le fragment d'ADN d'intérêt est excisée puis enfoncée dans une fente qui a été faite dans un gel d'agarose et devant laquelle la membrane DEAE-cellulose a été placée. L'ADN est récupéré comme précédemment.

II. 2. 2. Elution directe

Le fragment de polyacrylamide excisé est découpé en petits morceaux, et l'ADN est élué par incubation de ces morceaux dans 1 à 2 volumes d'un tampon à forte concentration saline (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M; pH 7,5) à 37°C pendant 3 h. L'ADN est ensuite récupéré dans la solution obtenue après centrifugation dans un tube contenant un filtre 0,22 μ m (SPIN-X, Costar), puis précipité à l'éthanol, rincé à l'éthanol 70% et finalement repris dans un volume approprié d'eau ou de TE.

III. Sous-clonage moléculaire

Il consiste en l'insertion dans des vecteurs plasmidiques de choix, soit de fragments d'ADN issus par digestion enzymatique d'un autre plasmide, soit d'oligonucléotides de synthèse. Après ligature *in vitro*, les plasmides recombinés sont introduits dans une souche bactérienne appropriée et les clones recombinés sont analysés par des endonucléases de restriction.

III. 1. Matériel

III. 1. 1. Souches bactériennes

TOP10F' (F' [Tn10, proAB, lac^qZ Δ M15], msrA, Δ (mrr, hsdRMS, mcrBC), Φ 80 lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ (ara, leu), 7697 ga/U ga/K λ -, rpsL(streptomycin^r), endA1, nupG)

Cette souche est déficiente en système de restriction et de recombinaison *E. coli*, ce qui permet le maintien stable des inserts dans les plasmides recombinés. Elle a donc été utilisée pour l'amplification et le maintien de tous les plasmides, hormis ceux utilisés lors de la mutagénèse dirigée.

Cette souche est cultivée dans du milieu LB (extrait sec de levure 5 g/l, peptone 10 g/l, NaCl 86 mM [pH 7,5]) additionné de 15 μ g/ml de tétracycline afin de maintenir la présence de l'épisome (F'). Lorsque ces bactéries contiennent un plasmide, la tétracycline est remplacée par l'antibiotique correspondant au gène de résistance porté par ce plasmide, il s'agit généralement de l'ampicilline.

La conservation de cette souche se fait à -20°C dans du milieu riche 2XTY (extrait sec de levure 10 g/l, tryptone 16g/l, NaCl 86 mM) contenant 50% de glycérol.

JM109(endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17(\mathbf{r}_{k}^{-} , \mathbf{m}_{k}^{+}), relA1, supE44, λ -, Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lac^qZ Δ M15]

Les principales caractéristiques de cette souche sont les suivantes:

- la déficience en activité β -galactosidase suite à des délétions dans la copie génomique et épisomale du gène *lacZ*. La copie épisomale est déletée de la région correspondant au peptide- α . L'introduction dans cette souche d'un plasmide exprimant le peptide- α permet la restauration de l'activité β -galactosidase, qui peut être alors visualisée par l'utilisation d'un substrat chromogène: le X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, Sigma) donnant une coloration bleue après catalyse. Ceci permet la sélection rapide des clones recombinés: après étalement sur des boites de Pétri contenant du LB gélosé (15g d'agar-DIFCO pour un litre de LB; pH 7) en présence de l'inducteur IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyanoside, Sigma) et du substrat X-gal, les bactéries contenant le plasmide d'origine vont donner des colonies de couleur bleue alors que les bactéries contenant le plasmide recombiné dont le peptide- α a été inactivé, suite au clonage d'un insert dans les sites de clonage multiples, vont donner des colonies de couleur blanche.

- la présence de l'épisome F', requis pour l'infection par un phage *helper* (phage assistant) permettant de produire l'ADN simple brin à partir d'un phagemide.

- la déficience en système de restriction et de recombinaison E.coli.

Cette souche a été utilisée pour les clonages réalisés dans le phagemide pSELECT[™] et pour la production d'ADN simple brin (matrice de la mutagénèse dirigée) à partir de ce dernier.

BMH 71-18 mut S (*thi*, supE, Δ (*lac-proAB*), [*mutS*::Tn10], [F', *proA*⁺B⁺, *lac*^qZ\DeltaM15]

Cette souche a été utilisée pour la transformation de l'ADN double brin issu de l'étape de synthèse de la réaction de mutagénèse dirigée. Cet ADN possède deux zones de mésappariement au niveau des bases changées pour restaurer la résistance à l'ampicilline et pour introduire la mutation d'intérêt. Cette souche est déficiente en système de réparation des zones de mésappariement et permet donc d'augmenter l'efficacité de réplication des brins d'ADN mutés.

Les souches JM109 et BMH 71 sont maintenues dans le milieu minimum M9 (Na₂HPO 34 mM; KH₂PO₄ 22 mM; NaCl 9 μ M; NH₄Cl 20 mM; MgSO₄ 2 mM; glucose 0,2%; CaCl₂ 0,1 mM; vitamine B1 9 μ M; pH 7,5) gélosé et additionné de thiamine-HCl 1 mM. Ce milieu permet la sélection continue de la présence de l'épisome (F') qui assure l'apport nutritionnel requis pour la croissance (*pro*A⁺B⁺).

III. 1. 2. Les vecteurs



Figure M1 : Représentation schématique des vecteurs de clonage



Figure M2 : Représentation schématique du plasmide pSP65-CML

..... pSP65 ____ ADNC p210BCR-ABL

La position des sites de coupure des enzymes de restriction utilisées pour les différents sous-clonages et les analyses est indiquée. *pBLCAT2* (Fig. M1): décrit par Luckow et Scultz (1987), contient le gène *reporter cat* (chloramphenicol acetyl transferase) dont l'expression dans les cellules eucaryotes se trouve sous le contrôle du promoteur minimal *tk* (tymidine kinase). En amont de ce dernier se trouve un site multiple de clonage au niveau duquel peuvent être insérées des fragments d'ADN dont on veut tester l'activité transcriptionnelle.

pcDNA3 (Fig. M1): est un vecteur d'expression dans les cellules eucaryotes qui est commercialisé par InVitrogen Corporation, il a été utilisé pour le sous-clonage de la région codante, formes sauvage et mutées, de la p210^{BCR-ABL}.

pSP65CML (Fig. M2): ce vecteur, fourni par le Dr Canaani (Israël), contient la région codante de la protéine p210^{BCR-ABL} type LMC insérée entre les sites *Eco*RI et *Hin*dIII du plasmide pSP65.

 $pSELECT^{TM}$ -1 (Fig. M1): ce phagemide utilisé pour la mutagenèse dirigée présente les caractéristiques suivantes:

- la présence, en plus de l'origine de réplication chez *E.coli* (ori col E1), de l'origine de réplication du phage f1 qui lui permet de se multiplier sous forme simple brin lorsque la bactérie hôte est infectée avec les phages *helper* R108 ou M13KO7 (dérivés du bactériophage M13).

- les sites de clonage multiples sont insérés dans la séquence codante du peptide- α de *LacZ*. Le clonage d'un insert dans ces sites entraîne l'inactivation du peptide- α permettant ainsi, lors de la transformation dans une souche bactérienne appropriée, la sélection rapide des colonies contenant les plasmides recombinés sur la base de leur incapacité à complémenter la mutation de la cellule hôte pour une activité β -galactosidase fonctionnelle.

- la présence d'un gène de résistance à la tétracycline fonctionnel et un gène de résistance à l'ampicilline inactivé par mutation ponctuelle.

PBLCAT-TRE: fourni par le Dr Wasylyk (Strasbourg), ce vecteur dérive du pBLCAT2 après insertion d'une séquence oligonucléotidique (TRE (*TPA responsive element*) du promoteur du gène de la collagénase) correspondant à un élément de réponse pour le facteur AP-1 et qui peut être stimulé suite à l'activation de la voie de Ras (Angel *et al.*, 1987).

III. 2. Méthode

III. 2. 1. Ligature

Elle permet de joindre bout à bout les fragments d'ADN d'intérêt (en l'occurrence, l'insertion d'oligonucléotides de synthèse ou de fragments issus d'un plasmide par digestion enzymatique, dans un vecteur de choix), ceci par formation de liaisons phosphodiesters, catalysées *in vitro* par l'ADN ligase du bactériophage T4.

Les plasmides sont clivés par les endonucléases de restriction appropriées dans les conditions indiquées par le fabricant (Boehringer, Eurogentec). Pour le clonage, les enzymes sont généralement choisies de manière à générer des extrémités, de préférence cohésives, qui sont complémentaires entre le vecteur et l'insert. Après électrophorèse, le vecteur et l'insert sont purifiés à partir du gel puis ligaturés dans un rapport équimolaire par l'ADN ligase T4 (Boehringer), pendant une nuit à 16 °C.

III. 2. 2. Transformation bactérienne

Le plasmide recombiné issu de la ligature est amplifié par introduction dans une souche *E. coli* appropriée (voir souches bactériennes). La technique utilisée pour préparer les bactéries pour la transformation est celle décrite par Cohen et *al.* (1973): elle consiste en un traitement au chlorure de calcium froid suivi de chocs thermiques, ce qui crée un état de "compétence" transitoire permettant ainsi la pénétration de l'ADN dans la bactérie.

Les bactéries sont mises en culture dans 30 ml de milieu LB à 37°C avec agitation. Lorsque sa turbidité à DO_{580} nm est d'environ 0,5, cette culture est centrifugée à 4 000 g pendant 10 mn à 4°C. Les bactéries sont ensuite lavées dans 20 ml de CaCl₂ 0,1 M froid, puis reprises dans le même volume et laissées dans la glace pendant 20 mn. Les bactéries sont centrifugées une dernière fois, puis mises en suspension dans 0,6 ml de CaCl₂ 0,1 M. Un aliquote de 0,1 ml est mélangé avec la solution d'ADN (environ 1 µg), soumis à 5 chocs thermiques de 30 secondes chacun (37°C/0°C) puis remis pendant 20 mn dans la glace. Ces bactéries sont ensuite mises en culture dans 1 ml de milieu 2XTY pendant 45 mn, à 37 °C avec agitation, puis étalées sur

milieu LB gélosé additionné, selon le vecteur et la bactérie utilisés, de l'antibiotique de sélection (125 μ g/ml d'ampicilline ou 15 μ g/ml de tétracycline) et/ou de l'IPTG (0,5 mM) et du X-gal (40 μ g/ml)(pour le test d' α -complémentation). Les boites sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 1 nuit.

III. 2. 3. Identification des clones recombinés

Les clones contenant l'ADN recombiné sont identifiés par digestion enzymatique, à la suite d'une minipréparation de plasmides qui permet d'obtenir environ 15 µg d'ADN, quantité suffisante pour 3 analyses enzymatiques.

Une douzaine de clones parmi ceux qui ont été sélectionnés (résistance à l'antibiotique, et/ou couleur blanche) sont ensemencés chacun dans 10 ml de LB additionné de l'antibiotique de sélection, puis mis en culture pendant une nuit à 37°C avec agitation. Les bactéries sont centrifugées à 4 000 g pendant 10 mn puis soumises à une lyse alcaline (le principe de cette lyse est décrit dans le paragraphe suivant): le culot est repris dans 100 µl de tampon de lyse (Tris-HCl 25 mM [pH8]; EDTA 10 mM; glucose 50 mM) puis incubé dans la glace pendant 5 mn; 200 µl de la solution de lyse (NaOH 0,2 N; SDS 1 %) sont ensuite ajoutés avant une deuxième incubation de 5 mn dans la glace; 150 μ l du tampon de neutralisation à pH 4,8 (préparé en mélangeant 60 ml d'une solution d'acétate de potassium 5M avec 11,5 ml d'acide acétique glacial et 28,5 ml de H₂O, ceci de manière à obtenir une solution de potassium 3M et d'acétate 5 M) sont enfin ajoutés avant une dernière incubation de 5 mn dans la glace. Après centrifugation à 12 000 g, pendant 5 mn à 4°C, l'ADN plasmidique est récupéré dans le surnageant. L'ADN est séparé des protéines par une extraction au phénol/chloroforme/ alcool isoamylique (rapport 25/24/1) suivie d'une extraction chloroforme/alcool isoamylique (rapport 24/1). Pour cela, un volume égal de mélange phénol/chloroforme est ajouté au surnageant suivi d'une agitation vigoureuse de 5 mn et d'une centrifugation de 5 mn à 12 000 g, deux phases sont alors obtenues: la phase inférieure organique qui contient les protéines et la phase supérieure acqueuse qui contient l'ADN. Ce dernier est ensuite précipité en ajoutant à la phase aqueuse 2,5 volumes d'éthanol, pendant 20 mn à -70°C. Après une centrifugation de 10 mn à 12 000 g, le culot d'ADN est séché puis repris dans 50 µl d'eau et traité à l'ARNase A (1 µg/ml), 5 mn à température ambiante. L'ADN est alors clivé par les enzymes de restriction appropriées et comparé, après électrophorèse, aux plasmides témoins. Les clones identifiés comme étant bons, sont conservés à -20°C et utilisés pour effectuer de grandes préparations de plasmides.

III. 3. Construction des plasmides recombinés

III. 3. 1. Construction du pBLCAT-5kB

Cinq µg du plasmide pBLCAT2 ont été linéarisés par digestion avec l'enzyme *Bam*HI puis purifiés par **Geneclean**, après électrophorèse en gel d'agarose. La solution d'ADN purifié a été divisée en 3 volumes auxquels l'oligonucléotide κ B (paragraphe F, p.151) a été rajouté dans des rapports molaires, par rapport au vecteur, de 3:1, 6:1 et 10:1, ceci afin de favoriser la ligature de plusieurs copies de l'oligonucléotide dans le pBLCAT2. Après transformation de la souche bactérienne Top10F' et sélection sur du LB gélosé-ampicilline, les clones recombinés ont été identifiés par la perte du site de restriction *Bam*HI: l'oligonucléotide possède des extrémités *Bam*HI du vecteur, après ligature le site *Bam*HI devrait être perdu.

La séquence de l'insert dans les plasmides recombinés a été ensuite déterminée, en utilisant un ensemble de réactifs (Sequenase Version 2.0) selon les instructions données par le fabricant (Amersham), afin de caractériser le nombre de copies insérées de l'oligonucléotide et leur orientation. Le pBLCAT-5kB retenu contient 5 copies de l'oligonucléotide, orientées dans le même sens.

III. 3. 2. Construction du pcDNA-p210

Le fragment *EcoRI-SpeI* de 6193 pb a été récupéré à partir du plasmide pSP65-CML (Fig. M2), et a été ligaturé dans un rapport molaire de 1/1 avec le plasmide pcDNA3 (Fig. M1) préalablement digéré par les enzymes *Eco*RI et *XbaI*. La digestion par l'endonucléase de restriction *XbaI* donne des extrémités compatibles à celles générées par l'enzyme *SpeI*, ces deux sites de restriction sont perdus dans le plasmide recombiné et génèrent un nouveau site de restriction pour l'enzyme *MaeI*. Les produits de ligature ont été introduits dans la souche bactérienne Top10F' et sélectionnés sur LB gélosé-ampicilline. Les plasmides recombinés ont

été identifiés par digestion enzymatique *Hin*dIII suivie d'une électrophorèse en gel d'agarose: le pcDNA3 vide génère une bande linéaire de 5 200 pb, alors que le plasmide recombiné pcDNA-p210 génère 2 bandes respectivement de 2621 et 8772 pb.

IV. Mutagénèse dirigée

IV. 1. Principe

Afin de créer des mutations ponctuelles, nous avons utilisé un système de mutagénèse dirigée (Altered SitesTM Mutagenesis System, Promega) dont le principe est le suivant (Fig. M4): le fragment d'ADN au niveau duquel on veut introduire la mutation est inséré dans le phagemide pSELECTTM-1. L'ADN recombiné simple brin, obtenu après coinfection de la souche bactérienne JM109 avec le phage *helper*, est utilisé comme matrice pour la réaction de mutagénèse: un oligonucléotide contenant la mutation d'intérêt est hybridé à la matrice en même temps que l'oligonucléotide qui permet la restauration de la résistance à l'ampicilline. Après synthèse *in vitro* du brin muté complémentaire à la matrice (sauf au niveau des bases changées pour restaurer la mutation du gène amp^r et pour introduire la mutation d'intérêt) et ligature de ses deux extrémités, l'ADN double brin est introduit dans la souche *minus repair* BMH 71-18. La culture de ces bactéries en présence de l'ampicilline favorise davantage l'expansion des clones dont les plasmides ont restauré la résistance à l'antibiotique et qui portent normalement la mutation d'intérêt. Un deuxième tour de transformation est effectué dans la souche JM109 afin de permettre la ségrégation des clones contenant les plasmides sauvages de ceux contenant les plasmides mutés.

IV. 2. Construction du mutant K1171R

Cette mutation a été réalisée dans le but de changer le codon AAC en position 1171 (au niveau du nucléotide en position 4107), dans la partie *abl* de la région codante de la p210^{BCR-ABL}, en un codon CGC ce qui permet d'avoir au niveau de la protéine un résidu arginine à la place du résidu lysine 1171. La mutation ainsi introduite dans le site de fixation de l'ATP inhibe l'activité tyrosine kinase de la protéine.



- ADN recombiné simple brin matrice (Amp^s, Tet^R)
- Hybridation de l'oligonucléotide Amp^R et de l'oligonucléotide de mutagénèse.
- 2 Synthèse du brin muté avec la T4 DNA polymérase et ligature.

- Transformation de BMH 71-18 mut S et culture en présence de l'ampicilline
 minipréparation d'ADN
- transformation de JM109, et sélection des mutants sur LB gélose-ampicilline
- 6. Analyse par digestion enzymatique ou sequençage.

Figure M3 : Principe de la mutagénèse dirigée.

IV. 2. 1. Construction du pSELECT-Abl

Le fragment *Hin*dIII (contenant les nucléotides compris entre les positions 3206 et 7475) issu par digestion enzymatique du plasmide pSP65-CML (Fig. M2) a été inséré dans le site *Hin*dIII du phagemide pSELECTTM-1 (Fig. M1). Après transformation de la souche bactérienne JM109 et étalement sur LB gélosé contenant la tétracycline, le X-gal et l'IPTG, les clones recombinés, de couleur blanche, ont été analysés par digestion enzymatique afin d'identifier les plasmides recombinés ayant inséré le fragment *Hin*dIII et afin de déterminer le sens de l'insert.

IV. 2. 2. Préparation de l'ADN simple brin

Une pré-culture bactérienne est obtenue en ensemençant une colonie de JM109 contenant le phagemide recombiné dans 2 ml du milieu 2XTY additionné de 15 μ g/ml de tétracycline, et en l'incubant à 37°C avec agitation pendant 1 nuit. Cette pré-culture est ensuite diluée au 1/50 dans 10 ml du milieu 2XTY contenant la tétracycline, puis mise en culture à 37°C avec agitation pendant environ 30 mn (DO₅₈₀=0,3). Le phage *helper* R408 est alors ajouté à raison de 10 particules par bactérie (40 μ l de la suspension fournie dans le *kit*), et la culture est remise en agitation à 37°C pendant une nuit afin de permettre l'infection des bactéries et la production du phagemide recombiné sous forme simple brin.

Les bactéries sont ensuite éliminées par centrifugation à 12 000 g pendant 15 mn; Le surnageant, contenant les phages *helper* et recombiné, est centrifugé une deuxième fois, puis précipité par 0,25 volume de la solution suivante: acétate d'ammonium 3,75 M [pH 7,5] et PEG-8000 (polyéthylène glycol de PM 8000) 20 %, pendant 30 mn dans la glace. Les phages, contenus dans le culot obtenu après une centrifugation de 15 mn à 12 000 g, sont remis en suspension dans 400 µl de TE (Tris-HCl 10 mM [pH8]; EDTA 1 mM), puis lysés par addition de 400 µl d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (rapport 24/1) suivie d'une agitation vigoureuse pendant 1 mn et d'une centrifugation de 5 mn à 12 000 g. Deux extractions au phénol sont ensuite effectuées afin d'éliminer les protéines. L'ADN est alors précipité par addition de 0,5 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M et de 2 volumes d'éthanol, pendant 30 mn à -70°C. Après une centrifugation de 10 mn à 12 000 g et un rinçage à l'éthanol 70%, le

culot d'ADN est séché sous vide puis repris dans 20 μ l d'eau déminéralisée. Un aliquote (2 μ l) est utilisé pour estimer la concentration en ADN total par mesure de la D0₂₆₀ (1 unité de D0₂₆₀ correspond à 33 μ g/ml d'ADN simple brin); un autre aliquote est déposé sur un gel d'agarose 0,8 % afin d'estimer la quantité d'ADN recombiné par rapport à la quantité totale d'ADN; en effet sur le gel on distingue 2 bandes: une correspondant à l'ADN du phage *helper* d'une taille de 6,4 Kb, et l'autre correspondant à l'ADN recombiné d'une taille de 8 Kb. L'ADN peut ensuite être conservé à -20°C.

IV. 2. 3. Réaction de mutagénèse

En premier lieu, une étape d'hybridation est réalisée en mélangeant 0,05 pmol de l'ADN recombiné simple brin avec 0,25 pmol de l'oligonucléotide qui restaure la résistance à l'ampicilline (fourni dans le *kit*) et 1,25 pmol de l'oligonucléotide de mutagénèse (paragraphe F, p.151), dans le tampon d'hybridation (Tris-HCl 20 mM [pH 7,5]; MgCl₂10 mM; NaCl 50 mM), pour un volume final de 20 μ l. Ce mélange est chauffé pendant 5 mn à 70°C puis laissé refroidir lentement jusqu'à température ambiante (environ 20 mn). Par la suite, la réaction de synthèse-ligature est réalisée en ajoutant l'ADN polymérase T4 (10 unités) et l'ADN ligase du bactériophage T4 (2 unités), de même que le tampon de synthèse (Tris-HCl 10 mM [pH 7,5]; dNTP 0,5 mM; ATP 1 mM; DTT 0,2 mM) et de l'eau pour un volume final de 30 μ l. Le mélange est incubé à 37°C, pendant 90 mn.

Le produit de cette réaction a été introduit dans la souche bactérienne BMH 71-18 mut S, les bactéries ont été ensuite cultivées dans 4 ml du milieu LB pendant 1 h avant d'ajouter l'ampicilline (125 μ g/ml) et de les remettre en culture pendant la nuit. Une minipréparation de plasmides a été réalisée à partir de cette culture et l'ADN récupéré a été réintroduit dans la souche bactérienne JM109. Les clones recombinés mutés ont été identifiés par digestion enzymatique par l'enzyme de restriction *Mst*I dont le site a été créé lors de l'introduction de la mutation K1171R (Fig. M4).

IV. 2. 4. Construction du vecteur pcDNA-K1171R

La mutation K1171R

La mutation Y177F



Figure M4: Représentation des mutations créées.

La figure montre

-la séquence nucléotidique sauvage et les acides aminés correspondants. Le codon et l'acide aminé ciblés par la mutagenèse sont représentés en caractères gras

- La séquence nucléotidique mutée.

Le nouveau codon et l'acide aminé correspondant sont représentés en caractère gras.

- La séquence oligonucléotidique soulignée correspond à celle de l'oligonucléotide utilisé pour la réaction de mutagénèse.

La séquence encadrée correspond au site de restriction créé lors de la mutagénèse

La position des nucléotides et des acides aminés est indiquée.

Le vecteur utilisé pour l'expression dans les cellules eucaryotes de la forme mutée de la p210^{BCR-ABL}, défective en activité tyrosine kinase, a été obtenu en deux étapes; le fragment *KpnI-SpeI* (contenant les nucléotides entre les positions 3680 et 6778) a été récupéré à partir du pSELECT-Abl et réintroduit dans le plasmide pSP65-CML à la place du fragment sauvage correspondant, enlevé par digestion enzymatique. La deuxième étape de clonage dans le vecteur pcDNA3 a été effectuée de la même manière que pour le clonage pcDNA-p210.

IV. 3. Construction du mutant Y177F

Cette mutation a permis de changer le codon TAC en position 177 (au niveau du nucléotide 1127), dans la partie *bcr* de la région codante de la p210^{BCR-ABL}, en un codon TTC permettant ainsi le changement du résidu tyrosine en un résidu phenylalanine. La protéine mutée perd alors son site d'interaction avec la protéine d'adaptation GRB2.

IV. 3. 1. Construction du pSELECT-bcr

Le fragment *Eco*RI-*Hind*III (comprenant les nucléotides entre les positions 585 et 3206) issu du pSP65-CML (Fig. M2) a été inséré dans le pSELECTTM-1 (Fig. M1) entre les sites *Eco*RI et *Hind*III. Après transformation de la souche bactérienne JM109, les clones recombinés ont été caractérisés par digestion enzymatique.

IV. 3. 2. Mutagénèse dirigée

Après préparation de l'ADN simple brin, la réaction de mutagénèse a été réalisée comme décrit plus haut en utilisant l'oligonucléotide de mutagénèse (paragraphe F, p.151). Les clones recombinants mutés ont été identifiés par digestion enzymatique par l'enzyme *Hpa*I dont le site a été créé lors de la mutagénèse (Fig. M4).

IV. 3. 3. Construction du vecteur pcDNA-Y177F

Ce clonage a été effectué en une seule étape en substituant le fragment *Eco*RI-*Xho*I du pcDNA-p210 par le fragment *Eco*RI (585)-*Xho*I (1256) du pSELECT-bcr contenant la mutation.

V. Purification des plasmides

Pour préparer les plasmides en grande quantité, nous avons utilisé un système commercialisé (Qiagen plasmid kit), dont le principe est une lyse alcaline des bactéries suivie par une purification des plasmides par chromatographie d'échange d'anions. Il présente l'avantage, par rapport à la technique classique de gradient de chlorure de césium, d'une préparation rapide et d'une récupération des plasmides sous leur forme superenroulée.

Les bactéries sont cultivées dans 100 ml de milieu LB additionné de 50 µg/ml d'ampicilline, une nuit à 37°C avec agitation. La culture bactérienne est centrifugée 10 mn à 4 000 g, à 4°C, et les bactéries sont remises en suspension dans 4 ml du tampon 1 (tampon salin [pH 8], contenant l'enzyme ARNase A). Une lyse alcaline est effectuée en ajoutant 4 ml du tampon 2 qui contient du SDS et du NaOH: le SDS permet la solubilisation des phospholipides et des protéines de la membrane entraînant ainsi la lyse et la libération du contenu cellulaire dans le milieu tandis que le NaOH permet la dénaturation à la fois de l'ADN chromosomique, des plasmides et des protéines. Après 5 mn d'incubation, le lysat est neutralisé par addition de 4 ml du tampon 3 dont la forte concentration saline permet la précipitation du SDS entraînant avec lui les protéines, l'ADN chromosomique dénaturé ainsi que les débris cellulaires, alors que l'ADN plasmidique de taille plus petite se renature et reste en solution. Cette étape est effectuée 15 mn dans la glace. Les débris précipités sont éliminés par une centrifugation à 30 000 g, 30 mn à 4°C suivie d'une filtration du surnageant à travers la laine de verre. Les plasmides contenus dans le surnageant sont purifiés en utilisant les colonnes Qiagen-tip 100. Ces colonnes sont préalablement équilibrées par passage de 4 ml du tampon QBT; après écoulement total du tampon, la solution filtrée est appliquée à son tour sur les colonnes et seuls les plasmides se fixent sur la résine contenue dans les colonnes alors que les protéines cellulaires restantes et les ARN dégradés sont éliminés dans le flux puis par deux lavages avec le tampon QC (NaCl 1 M, pH 7). Les plasmides sont finalement élués par 5 ml de tampon QF (NaCl 1,25 M; pH 8) et précipités par addition de 0,7 volume d'isopropanol suivie d'une centrifugation à 15 000 g, 30 mn à 4°C. Les sels précipités sont éliminés par un lavage à l'ethanol 70%. Après un séchage rapide sous vide du culot, les plasmides sont solubilisés dans un volume approprié de tampon TE et leur concentration est évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm (une absorbance de 1 correspond à une concentration en ADN double brin de 50 μ g/ml).

B. Manipulations des cellules eucaryotes

I. Cellules et milieux de culture

I. 1. Les cellules adhérentes

Les lignées cellulaires Rat-1 et COS7 sont cultivées dans le milieu DULBECCO (Gibco BRL) contenant 10 % sérum de veau foetal (SVF, Boehringer), à une température de 37° C. Les cellules décollées au versène (EDTA 3 mM; NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 16 mM; KCl 2,7 mM) sont multipliées deux fois par semaine.

I. 2. Les cellules en suspension

La lignée cellulaire DA1 dérive d'un précurseur multipotent de la lignée myéloïde murine (Ihle, 1985). Ces cellules sont cultivées dans le milieu RPMI (Gibco BRL) additionné de 10% de SVF et de 2 ng/ml de l'interleukine-3 recombinante de souris : IL-3 (Santa Cruz Biotechnology-USA-), ceci dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2 à une température de 37°C. Le milieu de culture est changé deux fois par semaine, en centrifugeant les cellules à 600 g pendant 5 mn et en reprenant le culot cellulaire dans du milieu frais. La lignée cellulaire K562 dérive d'un patient en crise blastique de LMC (Lozzio and Lozzio, 1975). Ces cellules sont cultivées dans les mêmes conditions que les DA1 mais sans addition d'IL-3.

II. Les techniques de transfection

II. 1. Liposomes

Le réactif Lipofectamine (Gibco BRL) contenant une solution de lipide cationique qui forme des liposomes se complexant de manière stable avec l'ADN, a été utilisé pour la transfection des cellules adhérentes. Les complexes Liposomes-ADN adhèrent à la surface des cellules et fusionnent avec la membrane permettant ainsi la libération de l'ADN dans le cytoplasme cellulaire.

Trois à six µg d'ADN dilués dans 300 µl du milieu OPTI-MEM (Gibco BRL) sont mélangés à 12 µl de la solution Lipofectamine également dilués dans 300 µl du milieu OPTI-MEM. Les complexes liposome-ADN sont formés par incubation pendant 45 mn à température ambiante. Après addition de 2,4 ml du milieu de culture sans sérum, le mélange est mis sur les cellules cultivées à 50-80% de confluence dans des boites de Pétri (Falcon de 60 mm de diamètre) préalablement rincées avec du milieu sans sérum. Les cellules sont ensuite incubées 6 h en présence du mélange puis cultivées à nouveau dans le milieu de culture standard.

II. 2. Electroporation

Cette technique de transfection est basée sur l'utilisation d'un courant électrique qui entraîne l'ouverture transitoire de pores au niveau de la membrane plasmique permettant ainsi la pénétration de l'ADN dans les cellules. Cette technique, contrairement aux méthodes classiques de transfection, peut être utilisée sur pratiquement tous les types cellulaires et donne en plus une bonne efficacité de transfection. L'optimisation du temps de décharge se fait en variant le voltage et la capacité du condensateur.

Les cellules cultivées en suspension et en croissance exponentielle (5 x 10⁵ cellules /ml) sont centrifugées, puis 3 à 5 x 10⁶ cellules sont remises en suspension dans 500 μ l de RPMI sans sérum et mélangées à 10-15 μ g d'ADN total dans les cuves d'électroporation (Eurogentec). L'ADN est introduit dans les cellules en imposant un voltage de 270 V et une capacité de 1500 μ F (Appareil Easy Ject+ commercialisé par Eurogentec) à température ambiante. Immédiatement après la fin du *pulse* électrique (durée d'environ 40 ms), les cellules sont placées dans 10 ml de milieu de culture standard puis incubées à 37°C.

III. Etude de l'activité CAT

Quarante-huit heures après transfection, les cellules sont lavées deux fois dans du tampon PBS (Na_2HPO_4 58 mM; NaH_2PO_4 17 mM; NaCl 68 mM; pH 7,4), remises en suspension dans 150 µl de Tris-HCl 0,25 M [pH 7,5] et lysées aux ultrasons. Les extraits cellulaires sont récupérés après une centrifugation 10 mn à 13 000 g et la concentration en protéines est évaluée par mesure de l'absorbance à 280 nm.

La réaction chloramphénicol acétyl transférase est réalisée à 37°C pendant 30 à 60 mn, après incubation de volumes d'extraits cellulaires correspondant à une quantité égale de protéines, en présence de 0,5 µl de ¹⁴C-chloramphénicol à 0,1 µCi/ml (98 mCi/mmol, Amersham) et 20 µl d'acétyl coenzyme A (4 mM) dans un volume total de 130 µl (en complétant avec le Tris-HCl 0,25 M [pH 7,5]). L'addition de 800 µl d'acétate d'éthyle permet à la fois d'arrêter la réaction et d'extraire le chloramphénicol et sa forme acétylée, qui se retrouvent dans la phase supérieure organique après une centrifugation de 5 mn à 12 000 g. Cette phase est séchée sous vide, reprise dans 20 µl d'acétate d'éthyle puis déposée sur un gel de silice (0,25 mm ; MACHERY-NAGEL). Les dépôts sont concentrés dans l'acétone, avant d'effectuer une chromatographie ascendante d'environ 1 h, dans un mélange chloroforme/méthanol (rapport 95/5), les formes acétylées du chloramphénicol sont ainsi séparées des formes non acétylées. Le pourcentage d'acétylation est déterminé en analysant le gel par un phosphorImager (Molecular Dynamics,In).

IV. Oligonucléotides antisens

Vingt-quatre heures après électroporation, les cellules mortes sont éliminées par centrifugation sur un milieu de densité 1,077 (milieu de séparation des lymphocytes, Boehringer) : les cellules sont centrifugées dans un premier temps à 600 g pendant 5 mn, reprises dans 4 ml de milieu de culture puis déposées dans un tube polypropylène 15 ml, sur 6 ml du milieu de séparation. Après une centrifugation de 30 mn de 500 g, les cellules vivantes sont récupérées à partir de l'anneau formé dans le milieu de séparation alors que les cellules

mortes se retrouvent au fond du tube). Les cellules sont ensuite lavées 3 fois dans le milieu RPMI additionné de 10% de SVF inactivé (l'inactivation se fait par incubation 1 h à 50 °C ; l'inactivation du sérum est nécessaire afin de permettre une meilleur stabilité des oligonucléotides qui vont être ajoutés). Les cellules sont énumérées par la méthode d'exclusion de bleu trypan (Gibco BRL), qui permet de visualiser les cellules vivantes par l'absence de la coloration bleue. Dix mille cellules sont alors mises en suspension dans 100 μ l de RPMI + 10% SVF inactivé et cultivées dans les cuvettes de plaques de culture (plaques MICROTEST III 96 cuvettes, Falcon), seules ou en présence de 30 μ M d'oligonucléotides modifiés sens ou antisens (paragraphe F, p.151).

V. Les lignées stables

V. 1. Les cellules adhérentes

Quarante huit heures après transfection, les cellules sont cultivées dans le milieu de culture standard en présence de 400 μ g/ml de G418 (Gibco BRL). Le milieu est changé tout les 5 jours jusqu'à l'obtention des foyers de résistance cultivés séparément par la suite.

V. 2. Les clones isolés de cellules DA1

Quatre à six heures après électroporation, les cellules vivantes sont énumérées par la méthode d'exclusion du bleu trypan, puis une dilution limite est effectuée (cultures séparées, dans les plaques à 24 cuvettes, de 10⁵, 10⁴, 10³, et 10² cellules par cuvette) dans le milieu de culture standard. Quarante-huit heures plus tard, les cellules sont soumises à l'une ou l'autre des sélections suivantes :

 Sélection G418 : les cellules sont additionnées de 1 mg/ml de G418, dose préalablement déterminée comme étant totalement toxique pour les cellules DA1, en présence d'IL-3. Le milieu de sélection est renouvelé tous les 4 jours après centrifugation des boites à 600 g pendant 5 min. Au bout de 2 semaines, des colonies de cellules résistantes ont été isolées à partir des faibles dilutions et cultivées séparément dans le milieu de culture standard en l'absence d'IL-3, ceci afin de favoriser l'expansion des colonies qui expriment la p210^{BCR-} ^{ABL} en plus du gène de résistance à la généticine. Une semaine plus tard, les colonies de cellules indépendantes de l'IL-3 ont été caractérisées pour l'expression de la protéine hybride et utilisées pour les différentes études.

 Sélection en absence d'IL-3 : les cellules sont lavées 3 fois dans le milieu de culture pour enlever toute trace d'IL-3 (par centrifugation à 600 g pendant 5 mn), puis cultivées en absence d'IL-3. De la même manière que pour la sélection G418, les colonies de cellules indépendantes de l'IL-3 ont été isolées deux semaines après le début de la sélection, cultivées séparément pendant une semaine puis caractérisées.

V. 3. La population cellulaire

Quarante-huit heures après électroporation, le G418 est ajouté dans le milieu de culture, en présence de l'IL-3. Deux semaines plus tard l'ensemble de la population cellulaire résistante à la généticine est immédiatement caractérisé puis utilisé pour les études prévues.

VI. Marquage métabolique des cellules

VI. 1. Marquage classique

Les cellules en croissance exponentielle $(5.10^5 \text{ cellules/ml})$ sont lavées deux fois dans le milieu de marquage (milieu DMEM sans acides aminés [Gibco BRL] additionné d'un mélange d'acides aminés ne contenant ni méthionine ni cystéine, de 5% de SVF dialysé, et de 3% de glutamine) puis incubées dans ce même milieu (5.10^6 cellules/ml) à 37°C. Une heure après, un mélange de méthionine et cystéine marquées au ³⁵S (pro-mix ³⁵S, Amersham) est ajouté dans le milieu (360 µCi /ml de milieu), et le marquage des cellules se fait à 37°C pendant une duré de 3 à 5 h.

VI. 2. Pulse-chase

Les cellules lavées sont incubées dans le milieu de marquage pendant 30 mn à 37°C, puis marquées pendant 30 mn. Le marquage métabolique est arrêté en enlevant le milieu de culture radioactif, par une centrifugation de 5 mn à 600 g, et en remettant les cellules dans le milieu de culture standard: RPMI additionné de 10% de SVF (temps 0 post-marquage). Les cellules sont ensuite lysées à différents temps après l'arrêt du marquage métabolique.

C. Purification et analyse des ARN messagers

I. Extraction des ARN cellulaires totaux

I. 1. Technique au RNAzolB

Cette technique permet l'extraction des ARN totaux à partir d'un petit nombre de cellules, ainsi que leur purification en une seule étape.

Les cellules en suspension sont lavées dans le tampon PBS puis le RNAzol B (Bioprobe Systems) est ajouté au culot de cellules (0,2 ml pour 10⁶ cellules). Les ARN sont solubilisés par plusieurs passages du lysat dans une pipette pasteur, et sont ensuite extraits du lysat cellulaire par addition du chloroforme (0,1 volume) suivie d'une agitation vigoureuse de 15 secondes et d'une incubation de 5 mn dans la glace puis d'une centrifugation à 12000 g pendant 15 mn à 4°C. Ceci permet la séparation de l'homogénat en deux phases: la phase inférieure organique bleue et la phase supérieure aqueuse incolore; les ARN se trouvent dans cette dernière alors que l'ADN et les protéines se trouvent dans la phase organique et à l'interface. La phase aqueuse est transférée dans un tube Eppendorf exempt d'activité ribonucléasique (traitement préalable au DEPC: Diéthyl pyrocarbonate) et les ARN sont précipités par addition d'un volume égal d'isopropanol suivie d'une incubation de 30 mn à -70°C. Les ARN sont ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 15 mn à 4 °C puis rincés à l'éthanol 75%. Après un bref séchage sous vide, le culot d'ARN est solubilisé dans un volume approprié d'eau exempte d'activité ribonucléasique. La concentration et la pureté des ARN est

évaluée par mesure de la densité optique respectivement à 260 nm et 280 nm (une unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration en ARN de 40 μ g/ml). Un rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ compris entre 1,8 et 2 atteste d'une préparation d'ARN exempte de contaminants protéiques. Les ARN sont aliquotés et conservés à -70°C après addition de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et de 2 volumes d'éthanol absolu.

I. 2. Technique à l'isothiocyanate de guanidium

Les cellules lavées dans le PBS sont lysées dans une solution d'isothiocyanate de guanidium (isothiocyanate de guanidium 4 M; Tris-HCl 0,1 M [pH 7,5]; β-mercaptoéthanol 1% (0,14 M); sarcosyl 0,5%; traitement au DEPC 1% suivi d'une filtration sur filtre Wattman No 1). Les lysats cellulaires sont homogénéisés dans un dounce puis par quelques passages au travers d'une aiguille de calibre 21 permettant la cassure de l'ADN génomique. L'homogénat est déposé par la suite sur un coussin de chlorure de césium (CsCl 5,7 M; EDTA 0,01 M [pH 7,5]) à raison de 9,7 ml pour 3,5 ml, puis soumis à une ultracentrifugation d'environ 18 h, à 18°C, à 29 500 tours/mn (rotor SW41, Beckman). Ainsi, les ARN vont se retrouver dans le culot alors que l'ADN et les protéines se trouvent dans le surnageant. Les ARN sont solubilisés dans une solution TES (Tris-HCl 10 mM [pH 7,4]; EDTA 5 mM, SDS 1%), récupérés dans la phase supérieure acqueuse après une extraction au chloroforme/butanol (rapport 4/1) puis précipités dans 2,2 volumes d'éthanol et 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M, pendant 2 h à -70°C. Après centrifugation à 12 000 g pendant 45 mn à 4°C, les ARN sont solubilisés dans l'eau déminéralisée et leur concentration est évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm.

II. Technique de Northern

Les aliquotes d'ARN cellulaires totaux (30 µg) sont centrifugés 45 mn à 12 000 g à 4 °C, puis dénaturés dans 20 µl du tampon de dénaturation (formamide désionisé 50%; formaldéhyde désionisé 17,8%; tampon d'électrophorèse 1 X) par incubation à 68°C pendant 5 mn. Deux µl de la solution BB¢ sont ajoutés, et les ARN sont séparés en gel d'agarose dénaturant (agarose 1,2%; tampon d'électrophorèse 1X; formaldéhyde désionisé 6,6% ; DEPC 1%), dans le tampon d'électrophorèse (MOPS 20 mM [pH 7]; acétate de sodium 8 mM, EDTA 1 mM), sous un courant de 25 mA, pendant une nuit. Les ARN sont ensuite transférés du gel sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C extra, Amersham) par le courant d'absorption du tampon SSC 20X (*1*), pendant une nuit, puis fixés par chauffage à 80°C pendant 2 h. La membrane est ensuite incubée dans le tampon de pré-hybridation (Formamide désionisé 50%; Solution de Denhart (*2*) 0,1%; SSPE (*3*) 5X; sulfate de dextran 5%; SDS 1%; ADN dénaturé de sperme de saumon 200 μ g/ml) pendant 1 h à 42°C sous agitation, puis la sonde dénaturée est ajoutée (environ 1.10⁷ cpm) et l'hybridation a lieu à 42°C pendant 1 nuit. La sonde en excès ou retenue de manière non spécifique est éliminée par rinçage de la membrane : 1 rinçage de 5 mn dans le SSC 2X à température ambiante et 3 rinçages de 5 mn dans du SSC 2X-SDS 0,1% dont les deux premiers à température ambiante et le troisième à 65°C. La membrane est alors analysée par PhosphorImager.

- (1) SSC 20X : NaCl 3 M; Citrate trisodique 0,3 M
- (2) Solution de Denhart 100X : Ficol 2% ; Polyvinylpyrrolidone 2% ; BSA 2%.
- (3) SSPE 20X : NaCl 3,6 M; NaH₂ PO₄ 0,2 M; EDTA 0,02 M; pH 8,3.

Afin de ré-hybrider la membrane avec une seconde sonde de spécificité différente, une étape de dé-hybridation est nécessaire pour enlever la totalité de la première sonde hybridée. Cette dé-hybridation comporte une étape de dénaturation réalisée en plaçant la membrane pendant 5 mn à 68 °C dans la solution SSC 3X ; Formamide 50 % et SDS 0,1 % chauffée à 68°C, suivie d'une étape de neutralisation par 3 lavages de 5 mn par le SSC 0,1 X.

La sonde a été préparée en marquant le fragment *Eco*RI de 900 pb, purifié après digestion enzymatique de l'ADNc de la p65 NF- κ B, sous cloné dans un vecteur plasmidique (fourni par le Dr Huscott, Montréal). Vingt nanogrammes de ce fragment ont été dénaturés par chauffage 5 mn à 100°C, marqués avec 50 μ Ci [α -³²P] dCTP (3 000 Ci/mmol, Amersham) en utilisant un *kit (rediprime* DNA labelling system), selon les recommandations du fabricant (Amersham) : ce *kit* contient des hexanucléotides aléatoires qui vont s'hybrider avec l'ADN simple brin et servir d'amorce pour l'ADN polymérase fragment de Klenow, l'ADN néosynthétisé est alors marqué.

La sonde est ensuite séparée des nucléotides non incorporés par passage sur une colonne de Sephadex G-50, selon les recommandations du fabricant (Quick Spin Columns, commercialisé par Boehringer). Le Sephadex va retenir les nucléotides de petite taille (< 70 pb) et permettre l'élution des grands fragments d'ADN. La sonde est dénaturée à la soude 0,3 N puis utilisée pour l'hybridation, après avoir évalué le nombre de cpm/µl.

III. Rétrotranscription et amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR)

III. 1. Rétrotranscription (RT)

Une première copie d'ADNc a été obtenue à partir de 2 μ g d'ARN cellulaires totaux, en utilisant 1 μ l de la solution des hexamères desoxynucléotidiques aléatoires (Hexanucleotide Mix 10X, commercialisé par Boehringer Mannheim) comme amorces pour l'enzyme reverse transcriptase M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Gibco BRL). La réaction a été effectuée dans un volume final de 10 μ l en mélangeant les ARN avec les hexamères, en présence des 4 dNTP (2,5 mmol chacun), de DTT 10 mM, de 1 μ g d'enzyme *RNase inhibitor* (Boehringer) et de tampon 1X (fourni avec l'enzyme). Le mélange est chauffé à 70°C pendant 5 mn avant d'ajouter 200 unités d'enzyme M-MLV et de réaliser la réaction de rétrotranscription à 37°C pendant 1 h.

III. 2. Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Les ADNc produits ont été utilisés comme matrice pour la réaction de PCR comme suit: 1/10 du produit de la RT est mélangé à 0,25 mmol de chacun des 4 dNTP, 0,6 pmol de chacune des 2 amorces (paragraphe F, p.151), 0,5 unité de la Taq polymérase (Appligene) et le tampon adéquat, dans un volume final de 20 μ l. Pour la PCR marquée, 1 μ Ci de [α -³²P]dCTP est ajoutée dans le mélange. Le témoin négatif de la PCR a été réalisé en excluant la matrice du mélange réactionnel.

Après avoir mélangé l'ensemble, 15 µl d'huile minérale (Sigma) sont déposés au dessus afin d'éviter l'évaporation des échantillons lors des étapes d'amplification. Les conditions de PCR utilisées sont les suivantes: un premier cycle comportant une étape de dénaturation de 5 mn à 94°C et une étape d'hybridation de 4 mn à 58°C, suivi de 30 cycles d'amplification; chaque cycle comportant une étape de dénaturation: 1 mn à 94°C, une étape d'hybridation: 2 mn à 58°C et une étape d'extension: 3 mn à 72°C. Les 30 cycles ont été suivis d'une longue étape d'extension: 10 mn à 72°C, pour permettre une synthèse complète des produits amplifiés. Après avoir éliminé l'huile minérale, les produits ont été séparés soit sur un gel de polyacrylamide 8%, dans le cas des produits radioactifs puis analysés en utilisant un PhosphorImager, soit sur un gel d'agarose 2% puis visualisés sous UV. Dans les deux cas, l'ampligène (produit amplifié) d'intérêt est repéré par sa taille en se basant sur la migration des marqueurs de taille.

III. 3. Vérification de la spécificité d'amplification

L'identité de l'ampligène peut être confirmée soit par digestion enzymatique, soit par la technique de Southern.

III. 3. 1. Digestion enzymatique

Cinq μ l du produit d'amplification sont digérés par une enzyme de restriction dont le site se trouve dans la bande d'ADN amplifié attendue. Leur migration sur un gel d'agarose 2% est comparée à celle de la bande non digérée.

III. 3. 2. Technique de Southern

Après migration en gel d'agarose, les produits amplifiés sont transférés sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-C extra), ceci après traitement préalable du gel par une solution de dénaturation (NaOH 0,2 N; NaCl 0,6 M) pendant 30 mn afin de rendre l'ADN simple brin en vue de l'hybridation ultérieure avec une sonde, puis dans une solution de neutralisation (Tris-HCl 0,5 M [pH 7,5]; NaCl 1,5 M) pendant 30 mn. Le transfert a lieu pendant une nuit, dans une solution de SSC 6X. L'ADN est ensuite fixé à la membrane par

chauffage à 80°C pendant 2 h. Les étapes de pré-hybridation et d'hybridation sont réalisées dans les mêmes conditions que pour la technique de Northern, alors que les rinçages de la membrane sont effectués comme suit: 1 rinçage de 5 mn dans le SSC 2X à température ambiante suivi de 4 rinçages de 5 mn dans du SSC 0,1X-SDS 0,1% dont 2 à température ambiante et 2 à 65°C. La membrane est alors analysée par le PhosphorImager.

D. Techniques immunologiques

I. Les réactifs utilisés

Ab-3 (Oncogene Science) est un anticorps monoclonal produit chez la souris (IgG₁), conditionné à 0,1 μ g/ μ l, il réagit à la fois avec les protéines v-ABL, c-ABL, p190^{BCR-ABL} et la p210^{BCR-ABL} sans inhiber l'activité tyrosine kinase.

NF-\kappaBp65(C-20), **NF-\kappaBp50**(NLS), **c-rel**(C), $I\kappa B\alpha/MAD-3$ (C-15) (X TransCruzTM, Santa Cruz Biothechnology, Inc.) sont des anticorps polyclonaux produits chez le lapin (IgG), conditionnés à 1 µg/µl. Chacun de ces anticorps réagit spécifiquement avec la protéine contre laquelle il est dirigé sans toutefois interagir avec les autres membres de la famille.

Protéine A/G Gel (Pierce) cette protéine hybride se fixe à toutes les sous-classes IgG de différentes espèces. Etant couplée à l'agarose, elle a été utilisée dans les expériences d'immunoprécipitation pour purifier les complexes immuns.

II. Electrophorèse de protéines en gel de polyacrylamide dénaturant

Les échantillons de protéines à séparer sont mélangés à volume égal avec une solution de dénaturation (Tris 125 mM; glycérol 20%; SDS 2%; β -mercaptoéthanol 2%; bleu de bromophénol 1%; pH 6,8); quand il s'agit de protéines immunoprécipitées, elles sont reprises dans 40 μ l de la solution de dénaturation. Les protéines sont ensuite bouillies 5 mn et déposées dans les puits du gel de tassement à 5% de polyacrylamide (rapport
acrylamide/bisacrylamide: 50/1,33) dans une solution Tris-HCl 125 mM [pH 6,8] contenant 0,1% de SDS. Les protéines vont migrer rapidement en ce gel peu réticulé pour se tasser à la limite du gel de résolution. Ce gel a une concentration variant de 8 à 15% (rapport acrylamide/bisacrylamide 50/0,235) dans une solution Tris-HCl 375 mM [pH 8,9] contenant 0,1% de SDS. Les protéines sont alors séparées dans ce gel, très réticulé, en fonction de leur poids moléculaire. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon Tris 25 mM; glycine 192 mM et SDS 1%; pH 8,9, pendant une nuit sous une tension de 40 à 70 V selon le niveau de migration désiré. La migration est contrôlée par celle des marqueurs de poids moléculaire de protéines pré-colorés visualisés au cours de la migration (standards *haute gamme*, Gibco BRL). Le gel est ensuite, soit utilisé pour le transfert de Western, soit séché et analysé par le PhosphorImager dans le cas des protéines radioactives.

III. Immunoprécipitation

III. 1. Préparation des extraits cellulaires totaux

Les cellules en croissance exponentielle sont centrifugées à 600g pendant 5 mn, puis lavées deux fois dans du tampon PBS. Toutes les étapes qui suivent sont effectuées à 4°C ou dans la glace. Les cellules sont remises en suspension, à raison de 3.10^6 cellules/ml, puis lysées dans le tampon RIPA (Triton X-100 1%; SDS 0,1%; déoxycholate de sodium 0,5%; dans du PBS) additionné d'inhibiteurs de protéases: 1 mM de PhénylMéthylSulfonyl Fluoride (PMSF; Sigma) et 10 µg/ml d'aprotinine (Sigma). L'incubation se fait dans la glace pendant 10 mn. Les extraits cellulaires sont homogénéisés par 3 passages au travers d'une aiguille (calibre 21), et les protéines solubilisées sont récupérées dans le surnageant après une centrifugation de 30 mn à 13 000 g. Ces extraits sont soit utilisés immédiatement soit conservés à -70°C.

III. 2. Préparation des extraits cytoplasmiques et nucléaires.

Les culots cellulaires sont repris dans 200 µl du tampon A (HEPES 10 mM [pH 7,9]; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM et DTT 0,5 mM) contenant 0,15% de détergeant NP-40, puis incubés dans la glace pendant 10 mn. Après une centrifugation de 10 mn à 1 000 g, les surnageants, correspondant aux extraits cytoplasmiques, sont récupérés et les noyaux contenus dans les culots sont lysés par remise en suspension dans 200 µl de tampon C (Hépès 20 mM [pH 7,9]; glycérol 25%; NaCl 420 mM; MgCl₂ 1,5 mM; EDTA 0,2 mM, PMSF 0,5 mM et DTT 0,5 mM) suivie d'une incubation de 10 mn dans la glace. Les extraits nucléaires sont récupérés dans les surnageants obtenus après une centrifugation de 5 mn à 12 000 g. Les extraits cytoplasmiques et nucléaires sont séparément dilués dans 4 volumes de tampon RIPA additionné des inhibiteurs de protéases, puis utilisés pour l'immunoprécipitation.

III. 3. Immunoprécipitation simple

Dans un tube Eppendorf, les extraits cellulaires (1 ml) sont mélangés avec 1 μ g de l'anticorps spécifique, puis mis en agitation faible à 4°C pendant 1 h. Quinze μ l de la suspension protéine A/G sont ensuite ajoutés et le mélange est remis en agitation à 4°C pendant 1 h à une nuit. Après une centrifugation à 600 g pendant 5 mn à 4°C, le surnageant est éliminé et les complexes immuns dans le culot sont lavés deux fois dans le tampon RIPA, puis deux fois dans un tampon à forte concentration saline (Triton-X100 1%; NaCl 0,5 M; Tris-HCl 20 mM [pH 7,6]) et finalement deux fois dans un tampon à faible concentration saline (Triton-X100 1%; NaCl 10 mM; Tris-HCl 20 mM [pH 7,6]). Ces lavages sont effectués en reprenant les complexes immuns dans 1 ml de tampon de lavage et en effectuant une centrifugation à 600 g pendant 5 mn à 4°C. Après la dernière centrifugation, les complexes immuns sont remis en suspension dans le tampon de dénaturation et analysés en gel.

III. 4. Immunoprécipitation double

A la suite de la première immunoprécipitation, les complexes immuns récupérés avant les lavages, sont remis en suspension dans 200 μ l du tampon de dénaturation (Tris-HCl 50 mM [pH 7,5]; SDS 0,5%; β -mercaptoéthanol 70 mM), bouillis pendant 10 mn, replacés dans la glace, puis dilués dans 4 volumes du tampon RIPA sans SDS pour une concentration finale de SDS à 0,1%. Une deuxième immunoprécipitation est alors réalisée de la même manière que la première.

IV. Réaction kinase in vitro

Les cellules en croissance exponentielle sont lavées deux fois dans le tampon PBS, et la lyse cellulaire a été effectuée en remettant en suspension le culot à raison de 3.10⁶ cellules/ml dans un tampon de lyse approprié à la réaction kinase (Triton X-100 1%; SDS 0,05%; Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 10 mM [pH 7,4]; NaCl 150 mM; EDTA 5 mM) additionné d'inhibiteurs de protéases. Ce tampon diffère du tampon de lyse classique RIPA, par l'absence du déoxycholate de sodium et par l'utilisation d'une concentration en SDS à 0,05% au lieu de 0,1%, puisque ces deux détergents diminuent l'activité tyrosine kinase ABL récupérée (Konopka and Witte, 1985). Après une incubation de 10 mn dans la glace, les extraits cellulaires sont homogénéisés par 3 passages successifs à travers une aiguille (calibre 21), puis récupérés par une centrifugation de 30 mn à 13 000 g. A la suite de l'étape d'immunoprécipitation, les complexes immuns sont lavés une fois dans le tampon de lyse puis deux fois dans le tampon de lyse sans SDS. La réaction kinase est initiée dans la glace, en remettant en suspension le culot dans 50 µl du tampon kinase (HEPES 20 mM [pH 7,2]; NaCl 100 mM; Triton X-100 0,1%; MnCl₂ 10 mM) en présence de 10 μ Ci de [γ -³²P]ATP, puis incubée à température ambiante pendant 10 mn (Li et al., 1988). La réaction est arrêtée par addition de 1 ml de tampon RIPA. Les produits réactionnels sont lavés 3 fois au tampon RIPA puis analysés après électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

V. Technique de Western

Les cellules sont lavées deux fois dans le tampon PBS et la lyse est effectuée en remettant en suspension les cellules dans le tampon de dénaturation (Tris-HCl 50 mM [pH 6,8]; SDS 2%; glycérol 10%; β-mercaptoethanol 5%).. Les extraits cellulaires sont bouillis ensuite pendant 5 mn puis récupérés dans le surnageant, après une centrifugation de 30 mn à 13000 g. Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Immobilon P membrane, Millipore) en utilisant un appareil d'électrotransfert semi-sec (MilliBlot-Graphite Electroblotter Systems) selon les instructions du fabricant

(Millipore). L'efficacité du transfert est vérifiée par celle des marqueurs de taille pré-colorés, et éventuellement par une coloration transitoire des protéines en immergeant la membrane dans une solution contenant 0,2% de rouge ponceau et 3% d'acide trichloroacétique. La membrane est ensuite rincée dans du tampon TBS (Tris 10 mM; NaCl 150 mM; pH 7,6) pendant 5 mn, puis incubée pendant 1 h dans la solution TBST-lait (Tween-20 0,1%; lait écrémé 5%; dans le TBS) pour la saturation des sites de fixation non spécifiques. Après 2 lavages de 10 mn dans la solution TBST (TBS; Tween-20 0,1%), la membrane est incubée pendant 1 h avec l'anticorps spécifique (10 µg/ml dilués dans le TBST-lait). Trois lavages de 10 mn sont effectués ensuite, avant d'incuber la membrane avec le deuxième anticorps couplé à la peroxydase à 0,2 µg/ml dans le TBST-lait (dirigé contre les IgG de l'espèce chez laquelle l'anticorps spécifique a été produit) pendant 1 h. La membrane est lavée trois fois 15 mn dans le TBST, et les protéines sont alors révélées en utilisant le système ECL selon les recommandations du fabricant (DuPont). Cette révélation est basée sur l'émission de lumière: le luminol est oxydé, dans des conditions alcalines, par la peroxydase (couplée au second anticorps), il se trouve ainsi dans un état excité qui va émettre de la lumière, cette lumière est détectée par une courte exposition (30 secondes à 5 mn) sur un film d'autoradiographie. note: toutes les étapes d'incubation et de lavages sont réalisées à température ambiante.

E. Etude des interactions protéines-ADN: technique de retard en gel

Cette technique permet la détection des interactions de protéines purifiées ou présentes dans un extrait cellulaire avec une séquence spécifique d'ADN, sur la base de la mobilité en gel de polyacrylamide non dénaturant. Les complexes ayant une mobilité plus faible que celle de l'ADN libre, présentent un retard de migration en gel. Cette technique permet en plus l'étude de la spécificité des interactions (expérience de compétition), de même que l'identification des protéines impliquées dans la formation des complexes (utilisation d'anticorps).

I. Extraits nucléaires

Les cellules en suspension sont lavées dans le tampon PBS, reprises dans 1 volume de tampon A (HEPES 10 mM [pH 7,9]; MgCl₂1,5 mM; KCl 10 mM; DTT 0,5 mM), incubées 15 mn dans la glace puis passées 5 fois au travers d'une aiguille de calibre 25, permettant ainsi la lyse des cellules en gardant les noyaux intacts. Ces derniers se retrouvent dans le culot, obtenu après une centrifugation de 20 secondes à 12 000 g et à 4°C. Les noyaux sont alors lysés pendant 30 mn dans la glace, dans 2/3 de volume du tampon C (HEPES 20 mM [pH 7,9]; glycérol 25%; NaCl 420 mM; MgCl₂1,5 mM; EDTA 0,2 mM; PMSF 0,5 mM; DTT 0,5 mM). Après centrifugation à 12 000 g pendant 5 mn à 4°C, le surnageant contenant les extraits nucléaires est dialysé, à 4°C contre le tampon D (HEPES 20 mM [pH 7,9]; glycérol 20%; KCl 0,1 M; EDTA 0,2 mM; PMSF 0,5 mM; DTT 0,5 mM), afin d'éliminer les sels. Les protéines sont aliquotées par la suite et conservées à -70°C, après avoir évalué leur concentration par la technique colorimétrique de Bradford (1976).

II. Préparation des sondes

La taille idéale des fragments d'ADN utilisés en retard sur gel devrait être comprise entre 25 et 100 pb. Il est déconseillé d'utiliser des fragments dont la taille dépasse 200 pb afin d'éviter l'augmentation des possibilités de fixation des protéines.

Les fragments d'ADN possédant au moins une extrémité 5' protubérante sont marqués en utilisant l'ADN polymérase fragment de klenow de *E. coli* (Boehringer). Pour le marquage, un des nucléotides à incorporer est marqué en α au ³²P.

Les fragments d'ADN dont les deux extrémités sont franches, sont marqués en utilisant la polynucléotide kinase du bactériophage T4. Cette enzyme, en présence de $[\gamma^{-32}P]ATP$, permet la phosphorylation des extrémités 5', en l'occurrence un groupement phosphate radioactif.

II. 1. Marquage de l'oligonucléotide kB par l'ADN polymérase

Quatre cents ng de l'oligonucléotide (paragraphe F, p.151) sont marqués par 2,5 unités de l'ADN polymérase fragment Klenow, en présence de 40 μ Ci de [α -³²P]dCTP et de 100 μ M de chacun des 3 autres nucléotides, ceci dans un tampon approprié (concentration finale en MgCl₂ de 5 mM), à 37°C pendant 20 mn.

II. 2. Marquage de l'oligonucléotide oct-1 par la polynucléotide kinase

Dans un volume réactionnel de 20 μ l, 25 ng de l'oligonucléotide (paragraphe F, p.151) sont marqués par 10 unités de la polynucléotide kinase T4 (Boehringer), en présence de 30 μ Ci de [γ -³²P]ATP (3 000 Ci/mmol), dans un tampon approprié (Tris-HCl 50 mM [pH 7,9]; MgCl₂ 10 mM; DTT 5mM; Spermidine 0,1 mM; EDTA 0,1 mM), pendant 30 mn à 37°C.

II. 3. Purification des sondes

A la fin du marquage, une électrophorèse en gel de polyacrylamide est effectuée pour séparer la sonde des nucléotides libres. Après migration, le gel est enveloppé dans un film plastique puis exposé pendant 30 secondes à un film d'autoradiographie. Après développement, le film est aligné sur le gel afin de découper la bande d'intérêt. Après élution directe et précipitation à l'éthanol, la sonde est reprise dans 100 μ l du tampon TE puis conservée à -20°C. Un μ l de cette solution est compté par effet Cerenkov dans un compteur à scintillation pour déterminer le nombre de cpm/ μ l et donc évaluer l'activité spécifique de la sonde (un marquage efficace se traduit par une activité de l'ordre de 3.10⁵ cpm/ng).

III. Incubation sonde-protéines

Dix μ g d'extraits nucléaires sont mélangés à 10 000 cpm de la sonde ADN, en présence de 2 μ g de poly(dI-dC) poly(dI-dC), 300 μ g/ml de BSA et 10% de glycérol. Un volume final de 20 μ l est obtenu en complétant avec un volume approprié de tampon D (voir préparation des extraits nucléaires). La formation des complexes est réalisée par incubation du mélange à 30°C pendant 20 mn.

Note: lors de l'utilisation d'extraits de protéines cellulaires, un polymère d'ADN synthétique, en l'occurrence le poly(dI-dc) poly(dI-dc), doit être présent lors de l'incubation pour empêcher les fixations non spécifiques des protéines à la séquence d'ADN étudiée.

Sa concentration est déterminante pour la réaction de fixation: pour une quantité d'extrait fixe, il faut utiliser la quantité de polymère adéquate de manière à fixer les protéines non spécifiques de l'extrait, sans néanmoins inhiber toute fixation spécifique à la sonde

Pour les expériences de compétition, la réaction d'incubation est réalisée de la même manière, à la différence qu'un excès molaire d'oligonucléotide non marqué, identique ou non à la sonde (respectivement compétiteur spécifique et compétiteur non spécifique), est ajouté avant l'addition de l'extrait protéique. Une interaction spécifique entre la sonde et la protéine se reflète par sa suppression en présence d'un excès du compétiteur spécifique mais pas en présence du compétiteur non spécifique.

L'utilisation d'anticorps spécifiques permet l'identification des protéines présentes dans le complexe formé. Ce dernier reste inchangé si la protéine reconnue par l'anticorps n'est pas présente; par contre si la protéine est présente, elle est reconnue par l'anticorps qui va, selon sa nature, soit empêcher la fixation de la protéine à l'ADN se traduisant par la disparition du complexe, soit former un complexe tertiaire qui va présenter une mobilité de migration encore plus faible.

Dans nos expériences 2 μ g de l'anticorps d'intérêt (conditionné à 1 μ g/ μ l) sont ajouté dans le mélange de la réaction de fixation standard, avec une incubation de 1 h à 4°C préalable à celle effectuée à 30°C; la sonde est ajoutée soit en même temps que l'anticorps, soit juste avant l'incubation standard à 30°C.

IV. Migration électrophorétique

La séparation des complexes se fait par électrophorèse en gel de polyacrylamide non dénaturant 4% (rapport acrylamide:bisacrylamide de 29:1), dans un tampon de faible force ionique (Tris-HCl 6,7 mM [pH 7,9]; EDTA 1 mM; acétate de Sodium 3,3 mM). La faible force ionique de ce tampon assure la stabilité des complexes formés en augmentant l'affinité

de fixation mais entraîne des phénomènes de polarisation, ce problème est contourné en faisant recirculariser, au cours de l'électrophorèse, le tampon entre les deux réservoirs à l'aide d'une pompe péristaltique.

Une pré-migration du gel est réalisée pendant 1 h sous une tension de 100 V, afin de stabiliser l'ampérage. Par la suite les produits d'incubation sont déposés dans les puits du gel, un petit volume de solution BB¢ est déposé séparément pour servir de témoin de migration; l'électrophorèse est effectuée sous un courant constant de 35 mA jusqu'à ce que la migration du bleu de bromophénol arrive au niveau désiré (ce colorant a une mobilité approximative à celle d'un fragment d'ADN de 70 pb). Le gel est ensuite séché puis analysé par PhosphorImager.

F. Les oligonucléotides utilisés

(Eurogentec)

Mutagénèse dirrigée :

mutation K1171R	5 ′	ACGGTGGCCGTG <u>CGC</u> ACCTTGAAGGAG	3′
mutation Y177F	5′	GAGAAGCCCTTC <u>TTC</u> GTTAACGTCGAG	3′

Retard en gel et clonage

Ідк кВ	5' 3'	GATCGAGGGGGACTTTCCCTA CTCCCCTGAAAGGGATCTA	٩G	3 ' 5 '
OCT-1	5' 3'	GATCGAATGCAAATCACTAGCT CTAGCTTACGTTTAGTGATCGA	3' 5'	

PCR

les amorces p65 :

- (1) 5' CTGCCGAGCTCAAGATCTGCCGAGTAAAC 3'
- (2) 5' GGAGGAGTCCGGAACACAATGGCCACTTGCC 3'

Les amorces GAPDH (Narayanan et al., 1992):

- (1) 5' CCATGGAGAAGGCTGGGG 3'
- (2) 5' CAAAGTTGTTGTCATGGATGACC 3'

Les oligonucléotides p65 modifiés, à liaisons phosphorothioate :

Sens 5' ACCATGGACGATCTGTTTCCC 3'

Antisens 5' GGGAAACAGATCGTCCATGGT 3'

BIBLIOGRAPHIE

Adams, J. M., H. Houston, J. Allen, T. Lints, and R. Harvey. 1992. The hematopoietically expressed *vav* proto-oncogene shares homology with the *dbl* GDP-GTP exchange factor, the *bcr* gene and a yeast gene (CDC24) involved in cytoskeletal organisation. Oncogene 7:611-618.

Afar, D. E. H., A. Goga, J. McLaughlin, O. N. Witte, and C. L. Sawyers. 1994. Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc. Science 264:424-426.

Angel, P., M. Imagawa, R. Chiu, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, and M. Karin. 1987. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by TPA-modulated trans-acting factor. Cell **49**:729-739.

Baskaran, R., G. G. Chiang and J. Y. J. Wang. 1996. Identification of a binding site in c-Abl tyrosine kinase for the C-terminal repeated domain of RNA polymerase II. Mol. Cell. Biol. 16:3361-3369.

Baskaran, R., M. E. Dahmus, and J. Y. J. Wang. 1993. Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:11167-11171.

Bazzoni, G., N. Carlesso, J. D. Griffin and M. E. Hemler.1996. Bcr/Abl expression stimulates integrin function in hematopoietic cell lines. J. Clin. Invest. 98:521-528.

Bedi, A., B. A. Zehnbauer, J. P. Barber, S. J. Sharkis, and R. J. Jones. 1994. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. Blood 83:2038-2044.

Beg, A. A., S. M. Ruben, R. I. Scheinman, S. Haskill, C. A. Rosen, and A. S. Baldwin. 1992. I κ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF- κ B: a mechanism for cytoplasmique retention. Genes Dev. 6:1899-1913.

Ben-Neriah, Y., A. Bernards, M. Paskind, G. Q. Daley, and D. Baltimore. 1986. Alternative 5' exons in c-*abl* mRNA. Cell 44:577-586. Bernards, A., C. M. Rubin, C. A. Westbrook, M. Paskind, and D. Baltimore. 1987. The first intron in human c-*abl* gene is at least 200 kilobases long and is a target for translocations in chronic myelogenous leukemia. Mol. Cell. Biol. 7:3231-3236.

Bhatia, R., E. A. Wayner, P. B. McGlave, and C. M. Verfaillie. 1994. interferon- α restores normal adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors to bone marrow stroma by correcting impaired β 1 integrin receptor function. J. Clin. Invest. 94:384.

Bhatia, R., P. B. McGlave, and C. M. Verfaillie. 1995. Treatment of marrow stroma with interferon- α restores normal β 1 integrin-dependent adhesion of chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. J. Clin. Invest. 96:931-939.

Bolen, J. B. 1993. Nonreceptor tyrosine protein kinases. Oncogene 8:2025-2031.

Bours, V., G. Franzoso, V. Azarenko, S. Park, T. Kanno, K. Brown, and U. Siebenlist. 1993. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through κB motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. Cell **72**:729-739.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilising the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. **72**:248-254.

Braselmann, S., and F. McCormick. 1995. BCR and RAF form a complexe *in vivo* via 14-3-3 proteins. EMBO J 14:4839-4848.

Brown, K., S. Park, T. Kanno, G. Franzoso, and U. Siebenlist. 1993. Mutual regulation of the transcriptional activator NF- κ B and its inhibitor, I κ B- α . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2532-2536.

Brown, A. M., M. W. Linhoff, B. Stein, K. L. Wright, A. S. Baldwin, Jr., P. V. Basta, and J. P.-Y. Ting. 1994. Function of NF-κB/Rel binding sites in the major histocompatibility

complex class II invariant chain promoter is dependent on cell-specific binding of different NF- κ B/Rel subunits. Mol. Cell. Biol. 14:2926-2935.

Burridge, K., C. E. Turner and L. H. Romer. 1992. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125^{FAK} accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. J. Cell. Biol. **119:8**93-903.

Caamano, J. H., P. Perez, S. A. Lira, and R. Bravo. 1996. Constitutive expression of Bcl-3 in thymocytes increases the DNA binding of NF-κB1(p50) homodimers in vivo. Mol. Cell. Biol. **16:**1342-1348.

Caracciolo, D., M. Valtieri, D. Venturelli, C. Peschle, A. M. Gewirtz, and B. Calabretta. 1989. Lineage-specific requirement of c-*abl* function in normal hematopoiesis. Science 245:1107-1110.

Carillo, S., M. Pariat, I. Jariel-Encontre, A-M. Steff, and M. Piechaczyk. 1995a. Le catabolisme protéique intracellulaire : une fonction biologique majeure. Les mécanismes de dégradation. M/S 11:723-734.

Carillo, S., M. Pariat, I. Jariel-Encontre, A-M. Steff, T. Lorca, and M. Piechaczyk. 1995b. Le catabolisme protéique intracellulaire : une fonction biologique majeure. Exemples de dégradation conditonnelle et genèse des peptides antigéniques. M/S 11:845-852.

Carlesso, N., J. D. Griffin, and B. J. Druker. 1994. Use of a temperature-sensitive mutant to define the biological effects of the $p210^{BCR-ABL}$ tyrosine kinase on proliferation of a factor-dependent murine myeloid cell line. Oncogene **9**:149-156.

Chardin, P. 1994. Protéines Ras et transmission des signaux mitogènes. M/S 10:657-664.

Chung, S-W., and M. C. Wong. 1995. The biology of Abl during hematopoietic stem cell differenciation and development. Oncogene 10:1261-1268.

Cicchetti, P., B. J. Mayer, G. Thiel, and D. Baltimore. 1992. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. Science 257:803-806.

Cicchetti, P., A. J. Ridley, Y. Zheng, R. A. Cerione, and D. Baltimore. 1995. 3BP-1, an SH3 domain dinding protein, has GAP activity for Rac and inhibits growth factor induced membrane ruffling in fibroblasts. EMBO J. 14:3127-3135.

Cleveland, J. L., M. Dean, N. Rosenberg, J. Y. J. Wang, and U. R. Rapp. 1989. Tyrosine kinase oncogenes abrogate interleukin-3 dependence of murine myeloid cells through signaling pathways involving c-myc: conditional regulation of c-myc transcription by temperature-sensitive v-abl. Mol. Cell. Biol. 9:5687-5695.

Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu. 1973. Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R. factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69:2110-2114.

Cohn, S. L., H. Salwen, M. W. Quasney, N. Ikegaki, J. M. Cowan, C. V. Herst, R. H. Kennett, S. T. Rosen, J. A. DiGiuseppe, and G. M. Brodeur. 1990. Prolonged N-myc protein half-life in a neuroblastoma cell line lacking N-myc amplification. Oncogene 5:1821-1827.

Collins, S., H. Coleman, and M. Groudine. 1987. Expression of *bcr-abl* fusion transcripts in normal and leukemic cells. Mol. Cell. Biol. 7:2870-2876.

Cook, W. D. 1982. Rapid thymoma induced by Abelson murine leukemia virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:2917-2921.

Costello, R., P. Lecine, B. Kahn-Perlès, M. Algarté, C. Lipcey, D. Olive, et J. Imbert. 1995. Activation du système de facteurs de transcription Rel/NF-κB. M/S 11:957-965. Dai, Z. and A. M. Pendergast. 1995. Abi-2, a novel SH-3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. Genes Dev. 9:2569-2582.

Daley, G. Q., J. McLaughlin, O. N. Witte, and D. Baltimore. 1987. The CML-specific p210 *bcr/abl* protein, unlike v-*abl* does not transform NIH/3T3 fibroblasts. Science **237**:532-535.

Daley, G. Q., and D. Baltimore. 1988. Transformation of an interleukin-3-dependant hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia- specific P210 bcr/abl protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**:9312-9316.

Daley, G. Q., R. A. Van Etten, and D. Baltimore. 1990. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210BCR/ABL gene of the Philadelphia chromosome. Science 247:824-830.

Daley, G. Q., and Y. Ben-Neriah. 1991. Implicating the bcr/abl gene in the pathogenesis of Philadelphia chromosome-positive human leukemia. Origins of human cancer, Cold Spring Harbor Loboratory press. 151-183.

Daley, G. Q., R. A. Van Etten, P. K. Jackson, A. Bernards, and D. Baltimore. 1992.
Nonmyristoyled Abl proteins transform a factor-dependent hematopoietic cell line. Mol. Cell.
Biol. 12:1864-1871.

Danhausser-Rield, S., M. Warmuth, B. J. Druker, B. Emmerich, and M. Hallek. 1996.
Activation of Src kinases p53/56^{lyn} and p59^{hck} by p210^{bcr-abl} in myeloid cells. Cancer Res.
56:3589-3596.

Dhut, S., T. Chaplin, and B. D. Young. 1990. BCR-ABL and BCR proteins : biochemical characterization and localization. Leukemia 4:745-750.

Diekmann, D., S. Brill, M. D. Garret, N. Totty, J. Hsuan, C. Monfries, C. Hall, L. Lim, and A. Hall. 1991. *Bcr* encodes a GTPase-activating protein for p21^{rac}. Nature 351:400-402.

Dikstein, R., D. Heffetz, Y. Ben-Neriah, and Y. Shaul. 1992. C-abl has a sequence-specific enhancer binding activity. Cell 69:751-757.

Dobrzanski, P., R-P. Ryseck, and R. Bravo. 1994. Differential interactions of Rel-NF- κ B complexes with I κ B α determine pools of constitutive and inducible NF- κ B activity. EMBO J **13**:4608-4616.

Druker, B., K. Okuda, U. Matulonis, R. Salgia, T. Roberts, and J. D. Griffin. 1992. Tyrosine phosphorylation of rasGAP and associated proteins in chronic myelogenous leukemia cell lines. Blood **79:**2215-2220.

Duyster, J., R. Baskaran, and J. Y. J. Wang. 1995. Src homology 2 domain as a specificity determinant in the c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeated domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**:1555-1559.

Elkins, T., K. Zinn, L. McAllister, F. M. Hoffmann, and C. S. Goodman. 1990. Genetic analysis of a Drosophila neural cell adhesion molecule: interaction of fasciclin I and Abelson tyrosine kinase mutations. Cell 60:565-575.

Feller, S. M., B. Knudsen and L. Hanafusa. 1994. C-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk. EMBO J. 13:2341-2351.

Fisher, D. E. 1994. Apoptosis in cancer therapy : crossing the threshold. Cell 78:539-542.

Fracchiolla, N. S., L. Lombardi, M. Salina, A. Migliazza, L. Baldini, E. Berti, L. Cro, E. Polli, A. T. Maiolo, and A. Neri. 1993. Structural alterations of the NF-κB transcription factor *lyt*-10 in lymphoid malignancies. Oncogene 8:2839-2845.

Franzoso G., V. Bours, V. Azarenko, S. Park, M. Tomita-Yamaguchi, T. Kanno, K. Brown, and U. Siebenlist. 1993. The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF- κ B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select κ B sites. EMBO J 12:3893-3901.

Fujita, T., G. P. Nolan, S. Ghosh, and D. Baltimore. 1992. Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-κB. Genes Dev. **6**:775-787.

Gertler, F. B., R. L. Bennett, M. J. Clark, and F. M. Hoffmann. 1989. Drosophila *abl* tyrosine kinase in embryonic CNS axons: a role in axonogenesis is revealed through dosage-sensitive interactions with *disabled*. Cell **58**:103-113.

Gilmore, T. D. 1991. Malignant transformation by mutant Rel proteins. TIG 7:318-322.

Gishizky, M. L., and O. N. Witte. 1992. Initiation of deregulated growth of multipotent progenitor cells by *bcr-abl* in vitro. Science 256:836-839.

Gishizky, M. L., D. Cortez, and A. M. Pendergast. 1995. Mutant forms of factor-binding protein-2 reverse BCR-ABL-induced transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:10889-10893.

Goff, S. P., C. J. Tabin, J. Y-J. Wang, R. Weinberg, and D. Baltimore. 1982. Transfection of fibroblasts by cloned abelson murine leukemia virus DNA and recovery of transmissible virus by recombination with helper virus. J. Virol. **41**:271-285.

Goga, A., J. McLaughlin, D. E. H. Afar, D. C. Saffran, and O. N. Witte. 1995. Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the *BCR-ABL* oncogene. Cell 82:981-988.

Gordon, M. Y., C. R. Dowding, G. P. Riley, J. M. Goldman, and M. F. Greaves. 1987. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. Nature (London) **328**:342-344. Groffen, J., J. R. Stephenson, N. Heisterkamp, A. De Klein, C. R. Bartram, and G. Grosveld. 1984. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. Cell 36:93-99.

Gumbiner, B. M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissu architecture and morphogenesis. Cell 84:345-357.

Hannink, M., and H. M. Temin. 1990. Structure and autoregulation of the c-rel promoter. Oncogene 5:1843-1850.

Hariharan, I. K., and J. M. Adams. 1987. cDNA sequence for human *bcr*, the gene that translocates to the *abl* oncogene in chronic myelogenous leukaemia. EMBO J. 6:115-119.

Heisterkamp, N., K. Stam, and J. Groffen. 1985. Structural organisation of bcr gene and its role in the Ph' translocation. Nature (London) **315:**758-761.

Heisterkamp, N., G. Jenster, J. Ten Hoeve, D. Zovich, P. K. Pattengale, and J. Groffen. 1990. Acute leukaemia in *bcr/abl* transgenic mice. Nature (London) **344:**251-253.

Hermann, R.S., B. G. Kraupp, and W. Bursch. 1994. Tumor development and apoptosis. Int. Arch. Allergy. Immunol. 105 :363-367.

Higgins, K. A., J. R. Perez, T. A. Coleman, K. Dorshkind, W. A. McComas, U. M. Sarmiento, C. A. Rosen, and R. Narayanan. 1993. Antisense inhibition of the p65 subunit of NF-κB blocks tumorigenicity and causes tumor regression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:9901-9905.

Hoffman, B., and D. A. Liebermann. 1994. Molecular controls of apoptosis: differenciation/growth arrest primary response genes, proto-oncogenes, and tumor suppressor genes as positive and negative modulators. Oncogene **9:**1807-1812.

Holt, J. T., R. L. Redner, and A. W. Nienhuis. 1988. An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. Mol. Cell. Biol. 8:963-973.

Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yan of protein phosphorylation and signaling. Cell 80:225-236.

Hynes, R. O.1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 69:11-25.

Ihle, J. N. 1985. Biochemical and biological properties of interleukin-3: a lymphokine mediating differentiation of a lineage of cells that includes prothymocytes and mast-like cells. Contemp. Top. Mol. Immunol. **10**:93-119.

Jackson, P. K., M. Paskind, and D. Baltimore. 1993. Mutation of a phenylalanine conserved in SH-3-containing tyrosine kinases activates the transforming ability of c-Abl. Oncogene 8:1943-1956.

Janssen, J. W. G., A. C. M. Steenvoorden, J. Lyons, B. Anger, J. U. Böhlke, J. L. Bos, H. Seliger, and C. R. Bartram. 1987. RAS gene mutations in acute and chronic myelocytic leukemias, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:9228-9232.

Jiang, X., J. M. Trujillo, and J. C. Liang. 1990. Chromosomal breakpoints within the first intron of the ABL gene are nonrandom in patients with chronic myelogenous leukemia. Blood 76:597-601.

Juliano, R. L., and S. Haskill. 1993. Signal transduction from the extracellular matrix. J. Cell. Biol. 120:577-585.

Kabarowski, J. H. S., P. B. Allen, and L. M. Wiedemann. 1994. A temperature sensitive p210 BCR-ABL mutant defines the primary consequences of BCR-ABL tyrosine kinase expression in growth factor dependent cells. EMBO J. 13:5887-5895.

Kanno, T., K. Brown, G. Franzoso, and U. Siebenlist. 1994. Kinetic analysis of human Tcell leukemia virus type I Tax-mediated avtivation of NF-κB. Mol. Cell. Biol. 14:6443-6451.

Kelliher, M. A., J. McLaughlin, O. N. Witte, and N. Rosenberg. 1990. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:6649-6653.

King, K. L., and J. A. Cidlowski. 1995. Cell cycle and apoptosis : common pathways to life and death. J. Cell. Biochem. 58 :175-180.

Kipreos, E. T., and J. Y. J. Wang. 1990. Differential phosphorylation of c-Abl in cell cycle determined by *cdc*2 kinase and phosphatase activity. Science **248**:217-220.

Kipreos, E. T., and J. Y. J. Wang. 1992. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. Science 256:382-385.

Kitajima, I., T. Shinohara, J. Bilakovics, D. A. Brown, X. Xu, and M. Nerenberg. 1992. Ablation of transplanted HTLV-I tax-transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF-κB. Science **258**:1792-1795.

Kloetzer, W., R. Kurzrock, L. Smith, M. Talpaz, M. Spiller, J. Gutterman, and R. Arlinghaus. 1985. The human cellular *abl* gene product in the chronic myelogenous leukemia cell line K562 has an associated tyrosine protein kinase activity. Virology **140**:230-238.

Klug, C. A., S. J. Gerety, P. C. Shah, Y-Y. Chen, N. R. Rice, N. Rosenberg, and H. Singh. 1994. The v-abl tyrosine kinase negatively regulates NF- κ B/Rel factors and blocks κ gene transcription in pre-B lymphocytes. Genes Dev. 8:678-687.

Konopka, J. B., S. M. Watanabe, and O. N. Witte. 1984. An alteration of the human c-abl protein in K562 unmasks associated tyrosine kinase activity. Cell **37**:1035-1042.

Konopka, J. B., and O. N. Witte. 1985. Detection of c-*abl* tyrosine kinase activity *in vitro* permits direct comparison of normal and altered *abl* gene products. Mol. Cell. Biol. 5:3116-3123.

Kruh, G. D., R. Perego, T. Miki, and S. A. Aaronson. 1990. The complete coding sequence of Arg defines the abelson subfamily of cytoplasmic tyrosine kinases. Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 87:5802-5806.

Kunsch, C., S. M. Ruben, and C. A. Rosen. 1992. Selection of optimal κ B/REL DNAbinding motifs: interaction of both subunits of NF- κ B with DNA is required for transcriptional activation. Mol. Cell. Biol. 12:4412-4421.

Kurzrock, R., J. H. Gutterman, and M. Tapaz. 1988. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. The New England. J. Med. 315:990-998.

Laneuville, P., G. Sun, M. Timm, and M. Vekemans. 1992. Clonal evolution in a myeloïd cell line transformed to interleukine-3 indépendant growth by retroviral transduction and expression of p210bcr/abl. Blood 80:1788-1797.

Leemhuis, T., D. Leibowitz, G. Cox, R. Silver, E. F. Srour, G. Tricot, and R. Hoffman. 1993. Identification of BCR/ABL-negative primitive hematopoietic progenitor cells within chronic myeloid leukemia marrow. Blood 81:801-807.

Lenardo, M. J., and D. Baltimore. 1989. NF- κ B : a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. Cell 58:227-229.

Lernbecher, T., U. Müller, and T. Wirth. 1993. Distinct NF-κB/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. Nature (London) 365:767-769.

Li, W., W. S. Kloetzer, and R. B. Arlinghaus. 1988. A novel 53 kDa protein complexed with p210^{bcr-abl} in human chronic myelogenous leukemia cells. Oncogene 2:113-117.

Lifshitz, B., E. Fainstein, C. Marcelle, E. Shtivelman, R. Amson, R. P. Gale, and E. Canaani. 1988. bcr genes and transcripts. Oncogene 2:113-117.

Liou, H-C., and D. Baltimore. 1993. Regulation of the NF-κB/rel transcription factor and IκB inhibitor system. Current Opinion in Cell Biology **5**:477-487.

Liu, J., M. Campbell, J. Q. Guo, D. Lu, Y. M. Xian, B. S. Andersson, and R. B. Arlinghaus. 1993. BCR-ABL tyrosine kinase is autophosphorylated or transphosphorylates p160 BCR on tyrosine predominantly within the first BCR exon. Oncogene 8:101-109.

Liu, J., Y. Wu, G. Z. Ma, D. Lu, L. Haataja, N. Heisterkamp, J. Groffen, and R. B. Arlinghaus. 1996. Inhibition of Bcr serine kinase by tyrosine phosphorylation. Mol. Cell. Biol. 16:998-1005.

Lozzio, C. B., and B. B. Lozzio. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell line with positive Philadelphia chromosome. Blood **45**:321-334.

Luckow, B., and G. Shultz. 1987. CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. Nucleic Acids Res. 15:5490.

Lugo, T. G., and O. N. Witte. 1989. The BCR-ABL oncogene transforms Rat-1 cells and cooperates with v-myc. Mol. Cell. Biol. 9:1263-1270.

Lugo, T. G., A-M. Pendergast, A. J. Muller, and O. N. Witte. 1990. Tyrosine kinase activity and transformation potency of *bcr-abl* oncogene products. Science 247:1079-1082.

Mandanas, R. A., H.S. Boswell, L. Lu, and D. Leibowitz. 1992. *BCR/ABL* confers growth factor independence upon a murine myeloid cell line. Leukemia 6:796-800.

Mandanas, R. A., D. S. Leibowitz, K. Gharehbaghi, T. Tauchi, G. S. Burgess, K. Miyazawa, H. N. Jayaram, and H. S. Boswell. 1993. Role of p21 RAS in p210 *bcr-abl* transformation of murine myeloid cells. Blood **82**:1838-1847.

Maru, Y., and O. N. Witte. 1991. The *BCR* gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. Cell 67:459-468.

Maru, Y., K. L. Peters, D. E. H. Afar, M. Shibuya, O. N. Witte, and T. E. Smithgall. 1995. Tyrosine phosphorylation of BCR by FPS/FES protein-tyrosine kinases induces association of BCR with GRB-2/SOS. Mol. Cell. Biol. 15:835-842.

Matsuguchi, T., R. C. Inhorn, N. Carlesso, G. Xu, B. Druker, and J. D. Griffin. 1995. Tyrosine phosphorylation of p95^{Vav} in myeloid cells is regulated by GM-CSF, IL-3 and Steel factor and is constitutively increased by p210^{BCR/ABL}. EMBO J. **14:**257-265.

Mayer, B. J., and D. Baltimore. 1994. Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase. Mol. Cell. Biol. 14:2883-2894.

Mayer, B. J., H. Hirai, and R. Sakai. 1995. Evidence that SH2 domains promote processive phosphorylation by protein-tyrosine kinases. Current Biology **5**:296-305.

McDonnel, T. J., N. Deane, F. M. Platt, G. Nunez, U. Jaeger, J. P. McKearn, and S. J. Korsmeyer. 1989. Bcl-2/immunoglobulin transgeneic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lympho-proliferation. Cell 57:79-88.

McLaughlin, J., E. Chianese, and O. N. Witte. 1987. *In vitro* transformation of immature hematopoietic cells by the p210 *BCR/ABL* oncogene product of the Philadelphia chromosome. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:6558-6562.

McWhirter, J. R., and O. N. Witte. 1991. Activation of tyrosine kinase and microfilamentbinding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins. Mol. Cell. Biol. 11:1553-1565.

McWhirter, J. R., and J. Y. J. Wang. 1993. An actin-binding function contributes to transformation by Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. EMBO J. 12:1533-1546.

McWhirter, J. R., D. L. Galasso, and J. Y. J. Wang. 1993. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of BCR-ABL oncoproteins. Mol. Cell. Biol. 13:7587-7595.

Melo, J. V., D. E. Gordon, N. C. P. Cross, and J. M. Goldman. 1993. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia. Blood 81:158-165.

Meredith, Jr, J. E., B. Fazeli, and M. A. Schwartz. 1993. The extracellular matrix as a cell survival factor. Mol. Biol. Cell. 4:953-961.

Minden, A., A. Lin, F-X. Claret, A. Abo, and M. Karin. 1995. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases RAC and cdc42Hs. Cell 81:1147-1157.

Miyamoto, S., and I. M. Verma. 1995. REL/ NF-κB/IκB story. Adv. Cancer. Res. 66:255-293.

Miyamoto, S., S. K. Akiyama, and K. M. Yamada. 1995. Synergic roles for receptor occupancy and aggrregation in integrin transmembrane function. Science 267:883-885.

Muller, A. J., J. C. Young, A-M. Pendergast, M. Pondel, N. R. Landau, D. R. Littman, and O. N. Witte. 1991. *BCR* first exon sequences specifically activates the *BCR/ABL* tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. Mol. Cell. Biol. 11:1785-1792. Narayanan, R., J. F. Klement, S. M. Ruben, K. A. Higgins, and C. A. Rosen. 1992a Identification of a naturally occurring transforming variant of the p65 subunit of NF-κB. Science 256:367-370.

Narayanan, R., K. G. Lawlor, R. Q. J. Schaapveld, K. R. Cho, B. Vogelstein, P. B-V. Tran, M. P. Osborne, and N. T. Telang. 1992b. Antisens RNA to the putative tumor-suppressor gene DCC transforms Rat-1 fibroblasts. Oncogene 7:553-561.

Naumann, M., and C. Scheidereit. 1994. Activation of NF-κB *in vivo* is regulated by multiple phosphorylations. EMBO J. 13:4597-4607.

Neri, A., C-C. Chang, L. Lombardi, M. Salina, P. Corradini, A. T. Maiolo, R. S. K. Chaganti, and R. Dalla-Favera. 1991. B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt*-10, homologous to NF-κB p50. Cell 67:1075-1087.

Neumann, M., K. Tsapos, J. A. Scheppler, J. Ross, and B. R. Franza, Jr. 1992. Identification of complex formation between two intracellular tyrosine kinase substrates: Human c-Rel and the p105 NF-κB. Oncogene 7:2095-2104.

Neumann, M., A. Wilisch, B-C. Ma, B. J. Druker, E. Serfling, and B. R. Franza, Jr. 1996. BCR/ABL modulates the cytokine and retinoic acid response of c-Rel in human myeloid cells. Anticancer Res. 16:1075-1084.

Nowell, P.C., and D. A. Hungerford. 1960. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukaemia. Science 132: 1497-1499.

Otsu, M., I. Hiles, I. Gout, M. J. Fry, F. Ruiz-Larrea, G. Panayotou, A. Thompson, R. Dhand, J. Hsuan, N. Totty, A. D. Smith, S. J. Morgan, S. A. Courtneidge, P. J. Parker, and M. D. Waterfield. 1991. Characterisation of two 85 Kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60^{c-src} complexes, and PI3-kinase. Cell 65:91-104.

Pendergast, A. M., A. J. Muller, M. H. Havlik, R. Clark, F. McCormick, and O. N. Witte. 1991a. Evidence for regulation of the human ABL tyrosine kinase by a cellular inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:5927-5931.

Pendergast, A. M., A. J. Muller, M. H. Havlik, Y. Maru, and O. N. Witte. 1991b. BCR sequences essential for transformation by the *BCR/ABL* oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. Cell **66**:161-171.

Pendergast, A. M., L. A. Quilliam, L. D. Cripe, C. H. Bassing, Z. Dai, N. Li, A. Batzer,
K. M. Rabun, C. J. Der, J. Schlessinger, and M. L. Gishizky. 1993. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. Cell 75:175-185.

Perkins, N. D., R. M. Schmid, C. S. Duckett, K. Leung, N. R. Rice, and G. J. Nabel. 1992. Distinct combinations of NF-κB subunits determine the specificity of transcriptional activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89:**1529-1533.

Prochownik, E. V., and J. F. Kukowska. 1986. Deregulated expression of c-*myc* by murine erythroleukemia cells prevents differentiation. Nature (London) **322:**848-850.

Prochownik, E. V., J. F. Kukowska-Latallo, and C. Rodgers. 1988. C-*myc* antisense transcripts accelerate differentiation and inhibit G_1 progression in murine erythroleukemia cells. Mol. Cell. Biol. 8:3683-3695.

Puil, L., J. Liu, G. Gish, G. Mbamalu, D. Bowtell, P. G. Pelicci, R. Arlinghaus, and T. Pawson. 1994. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. EMBO J. 13:764-773.

Raitano, A. B., J. R. Halpern, T. M. Hambuch, and C. L. Sawyers. 1995. The *Bcr-Abl* leukemia oncogene activates Jun kinase and requieres Jun for transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:11746-11750.

Ren, R., Z-S. Ye, and D. Baltimore. 1994. Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. Genes Dev. 8:783-795.

Renshaw, M. W., J. R. McWhirter, and J. Y. J. Wang. 1995. The human leukemia oncogene bcr-abl abrogates the anchorage requirement but not the growth factor requirement for proliferation. Mol. Cell. Biol. 15:1286-1293.

Reuther, G. W., H. Fu, L. D. Cripe, R. J. Collier, and A. M. Pendergast. 1994. Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. Science 266:129-133.

Rice, N. R., and K. Ernst. 1993. In vivo control of NF-κB activation by IκBα. EMBO J. 12:4685-4695.

Rosenbaum, H., A. W. Harris, M. L. Bath, J. McNeall, E. Webb, J. M. Adams, and S. Cory. 1990. An Eµ-v-*abl* transgene elicits plasmacytomas in concert with an activated *myc* gene. EMBO J. 9:897-905.

Rosti, V., G. Bergamaschi, L. Ponchio, and M. Cazzola. 1992. C-abl function in normal and chronic myelogenous leukemia hematopoiesis: in vitro studies with antisense oligomers. Leukemia 6:1-7.

Rosti, V., G. Bergamaschi, C. Leuotti, M. Danova, C. Carlo-Stella, F. Locatelli, L. Towon, G. Mazini and M. Cazzola. 1995. Oligodeoxynucleotides antisense to c-*abl* specifically inhibit entry into S-phase of CD34⁺ hematopoietic cells and their differenciation to granulocytes-macrophage progenitors. Blood **86**:3387-3393.

Ruben, S. M., R. Narayanan, J. F. Klement, C-H. Chen, and C. A. Rosen. 1992. Functional characterization of the NF-κB p65 transcriptional activator and an alternatively spliced derivative. Mol. Cell. Biol. **12:**444-454.

Ruoslahti, E., and J. C. Reed. 1994. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. Cell 77:477-478.

Salgia, R., B. Brunkhorst, E. Pisick, J-L. Li, S. H. Lo, L. B. Chen, and J. D. Griffin. 1995a. Increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins in myeloid cell lines expressing p210^{BCR/ABL}. Oncogene 11:1149-1155.

Salgia, R., J-L. Li, S. H. Lo, B. Brunkhorst, G. S. Kansas, E. S. Sobhany, Y. Sun, E.
Pisick, M. Hallek, T. Ernst, R. Tantravahi, L. B. Chen, and J. D. Griffin. 1995b.
Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by p210^{BCR/ABL}.
J. Biol. Chem. 270:5039-5047.

Salgia, R., N. Uemera, K. Ukuda, J-L. Li, E. Pisick, M. Sattler, R. De Jong, B. Druker, N. Heisterkamp, L. B. Chen, J. Groffen, and J. D. Griffin. 1995c. CRKL links p210^{BCR-ABL} with a paxillin in chronic myelogenous leukemia cells. J. Biol. Chem. **270**:29145-29150.

Sattler, M., R. Salgia, K. Okuda, N. Uemura, M. A. Durstin, E. Pisick, G. Xu, J-L. Li, K. V. Prasad, and J. D. Griffin. 1996. The proto-oncogene product p120^{CBL} and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190^{BCR/ABL} and p210^{BCR/ABL} to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. Oncogene 12:839-846.

Sawyers, C. L., W. Callahan, and O. N. Witte. 1992. Dominant negative MYC blocks transformation by *ABL* oncogenes. Cell 70:901-910.

Sawyers, C. L., J. McLaughlin, A. Goga, M. Havlik, O. Witte. 1994. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. Cell 77:121-131.

Sawyers, C. L., J. McLaughlin, and O. N. Witte. 1995. Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the *Bcr-Abl* oncogene. J. Exp. Med. 181:307-313.

Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, and P. M. Howley. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell 63:1129-1136.

Schwartz, M. A. 1993. Signaling by integrins: implications for tumorigenesis. Cancer Res. 53:1503-1506.

Schwartzberg, P. L., A. M. Stall, J. D. Hardin, K. S. Bowdish, T. Humaran, S. Boast, M. L. Harbison, E. J. Robertson, and S. P. Goff. 1991. Mice homozygous for the *abl*^{m1} mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. Cell 65:1165-1175.

Scott, M. L., R. A. Van Etten, G. Q. Daley, and D. Baltimore. 1991. V-abl causes hematopoietic disease distinct from that caused by *bcr-abl*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6506-6510.

Scott, M. L., T. Fujita, H-C. Liou, G. P. Nolan, and D. Baltimore. 1993. The p65 subunit of NF-κB regulates IκB by two distinct mechanisms. Genes Dev. **7**:1266-1276.

Shah, N. P., O.N. Witte, and C. T. Denny. 1991. Characterization of the BCR promoter in Philadelphia chromosome-positive and -negative cell lines. Mol. Cell. Biol. 11:1854-1860.

Shtivelman, E., B. Lifshitz, R. P. Gale, and E. Canaani. 1985. Fused transcript of *abl* and *bcr* genes in chronic myelogenous leukaemia. Nature **315**:550-554.

Shtivelman, E., B. Lifshitz, R. P. Gale, B. A. Roe, and E. Canaani. 1986. Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *abl* gene and from the *bcr-abl* fused gene. Cell 47:277-284.

Shu, H. B., A. B. Agranoff, E. G. Nabel, K. Leung, C. S. Duckett, A. S. Neish, T. Collins, and G. J. Nabel. 1993. Differential regulation of vascular cell adhesion molecule 1 gene expression by specific NF- κ B subunits in endothelial and epithelial cells. Mol. Cell. Biol. 13:6283-6289.

Shuai, K., J. Hapern, J. ten Hoeve, X. Rao, and C. L. Sawyers. 1996. Constitutive activation of STAT5 by BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. Oncogene 13:247-254.

Siebenlist, U., G. Franzoso, and K. Brown. 1994. Structure, regulation and function of NF**kB**. Annu. Rev. Cell. Biol. **10**:405-455.

Sklar, M. D., E. Thompson, M. J. Welsh, M. Lierbert, J. Harney, H. B. Grossman, M. Smith, and E. V. Prochownik. 1991. Depletion of c-myc with specific antisense sequences reverses the transformed phenotype in *ras* oncogene-transformed NIH 3T3 cells. Mol. Cell. Biol. 11:3699-3710.

Skorski, T., P. Kanakaraj, D. H. Ku, M. Nieborowska-Skorska, E. Cannani, G. Zon, B. Perussia, and B. Calabretta. 1994. Negative regulation of p120GAP GTPase promoting activity by p210^{bcr/abl}. Implication for RAS-dependent philadelphia chromosome positive cell growth. J. Exp. Med. **179:**1855-1865.

Sowerby, S. J., M. A. Kennedy, P. H. Fitzgerald, and C. M. Morris. 1993. DNA sequence analysis of the major breakpoint cluster region of the BCR gene rearranged in Philadelphia-positive human leukemias. Oncogene 8:1679-1683.

Stam, K., N. Heisterkamp, F. H. Reynolds, JR, and J. Groffen. 1987. Evidence that the *phl* gene encodes a 160,000-Dalton phosphoprotein with associated kinase activity. Mol. Cell. Biol. 7:1955-1960.

Sun, S-C., P. A. Ganchi, D. W. Ballard, and W. C. Greene. 1993. NF- κ B controls expression of inhibitor I κ B α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. Science 259:1912-1915.

Sun, S-C., J. Elwood, C. Béraud, and W. C. Green. 1994. Human T-cell Leukemia Virus type I Tax activation of NF- κ B/Rel involves phosphorylation and degradation of I κ B α and RelA (p65)-mediated induction of the c-*rel* gene. Mol. Cell. Biol. 14:7377-7284.

Tanzer, J. et F. Guilhot. 1992. Leucémie myéloïde chronique. L'hématologie de Bernard Dreyfus: 619-650. Edition Flammarion.

Thompson, C. B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267:1456-1462.

Thompson, J. E., R.J. Phillips, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and S. Ghosh. 1995. IκB-β regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-κB. Cell **80**:573-582.

Towler, D. A., S. R. Eubanks, D. S. Towery, S. P. Adams, and L. Glaser. 1987. Aminoterminal processing of proteins by N-meristoylation. J. Biol. Chem. 262:1030-1036.

Treier, M., L. M. Staszewski, and D. Bohmann. 1994. Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the δ domain. Cell **78**:787-798.

Tybulewicz, V. L. J., C. E. Crawford, P. K. Jackson, R. T. Bronson, and R. C. Mulligan. 1991. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-*abl* proto-oncogene. Cell **65**:1153-1163.

Urbano-Ispizua, A., R. Gill, ,E. Matutes, S. Levi, L. M. Wiedemann, D. Catovsky, and C. J. Marshall. 1992. Low frequency of Ras oncogene mutations in Philadelphia-positive acute leukemia and report of a novel mutation H61 Leu in a single case. Leukemia 6:342-346.

Van Etten, R. A., P. Jackson, and D. Baltimore. 1989. The mouse type IV c-*abl* gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. Cell 58:669-678.

Vaux, D. L., S. Cory, and J. M. Adams. 1988. Bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalise pre-B cells. Nature (London) 335:440-442.

Verfaillie, C. 1992. Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term *in vitro* hematopoiesis. Blood **79:**2821-2826.

Voncken, J. W., H. van Schaick, V. Kaartinen, K. Deemer, T. Coates, B. Landing, P. Pattengale, O. Dorseuil, G. M. Bokoch, J. Groffen, and N. Heisterkamp. 1995. Increased neutrophil respiratory burst in *bcr*-null mutants. Cell 80:719-728.

Wang, J. Y. J. 1993. Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. Current Opinion in Genetic and development 3:35-43.

Welch, P. J., and Y. J. Wang. 1993. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. Cell 75:779-790.

Welch, P. J., and J. Y. J. Wang. 1995a. Abrogation of retinoblastoma protein function by c-Abl through tyrosine kinase-dependent and -independent mechanisms. Mol. Cell. Biol. 15:5542-5551.

Welch, P. J., and J. Y. J. Wang. 1995b. Disruption of retinoblastoma protein function by coexpression of its C pocket fragment. Genes Dev. 9:31-46.

Wetzler, M., M. Talpaz, G. Yee, S. A. Stass, R. A. Van Etten, M. Andreeff, A. M. Goodacre, H-D. Kleine, R. K. Mahadevia, and R. Kurzock. 1995. Cell cycle-related shifts

in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92:**3488-3492.

Wilson-Rawls, J., S. Xie, J. Liu, P. Laneuville, and R. B. Arlinghaus. 1996. P210 Bcr-Abl interacts with the interleukin 3 receptor β_c subunit and constitutively induces its tyrosine phosphorylation. Cancer Res. 56:3426-3430.

Yokoyama, K., and F. Imamoto. 1987. Transcriptional control of the endogenous myc protooncogene by antisense RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:7363-7367.

Zabel, U., T. Henkel, M. D. S. Silvia, and P. A. Baeuerle. 1993. Nuclear uptake control of NF-κB by MAD-3, an IκB protein present in the nucleus. EMBO J. **12**:201-211.

