

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R DE BIOLOGIE

N° d'ordre 2264

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

Florence BERNARDIN



**ETUDE DE LA REGION PREFERENTIELLEMENT REARRANGEE
DU GENE *LAZ3/BCL6* DANS LES LYMPHOMES NON-
HODGKINIENS : MISE EN EVIDENCE DE SEQUENCES
CONSERVEES DELETEES CHEZ DEUX PATIENTS**

Soutenue le 4 juin 1998 devant la Commission d'examen :

| | |
|----------------------|---------------------------------|
| Président : | Pr. P. DELANNOY |
| Rapporteurs : | Dr. R. RIMOKH Dr. C. BASTARD |
| Examineur : | Dr. F. FONTAINE |
| Directeur de Thèse : | Dr. J.P. KERCKAERT |

A ma famille,

A mes amis,

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à Jean-Pierre KERCKAERT qui a pris la direction de cette étude et m'a accordé sa confiance tout au long de sa réalisation. J'ai été très heureuse d'avoir travaillé dans son laboratoire.

J'adresse mes vifs remerciements au Professeur Philippe DELANNOY qui a accepté la présidence de ce jury de thèse.

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude au Docteur Ruth RIMOKH et au Docteur Christian BASTARD qui ont accepté de lire ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je remercie très sincèrement Monsieur François FONTAINE qui a eu la gentillesse d'accepter de faire partie du jury.

Je tiens à remercier particulièrement Olivier Albagli pour ses nombreuses discussions qui m'ont permis d'avancer. Merci aussi à Philippe Dhordain pour ses conseils.

Mes remerciements s'adressent également à Dominique LEPRINCE pour son aide lors de la rédaction de mon article.

Je remercie chaleureusement Sabine QUIEF qui m'a fait profiter de ses compétences et de son dynamisme.

J'ai également bénéficié de la grande expérience de la culture cellulaire et des ARN de Danièle LANTOINE que je remercie très sincèrement.

Un grand merci à Nathalie et Aline pour leurs précieux conseils lors de la rédaction.

Je remercie Marie-Claire DUVIEUXBOURG pour sa gentillesse et la qualité de ses travaux photographiques.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'U124 INSERM et de l'IRCL pour leur accueil chaleureux et l'ambiance sympathique qui règne au sein du laboratoire.

Enfin, la dernière mais pas la moindre, je remercie ma soeur pour ses encouragements ainsi que pour la réalisation de certaines figures et d'une partie de la bibliographie.

Cette étude a été réalisée à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, dans le laboratoire d'« oncohématologie moléculaire » de l'unité 124 INSERM, dirigé successivement par le Dr. M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE et le Dr. J.P. KERCKAERT. Ce travail a été financé par l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, la région Nord-Pas-de-Calais et l'Association pour la Recherche sur le Cancer.

**ETUDE DE LA REGION PREFERENTIELLEMENT REARRANGEE
DU GENE *LAZ3/BCL6* DANS LES LYMPHOMES-NON-HODGKINIENS:
MISE EN EVIDENCE DE SEQUENCES CONSERVEES
DELETEES CHEZ DEUX PATIENTS**

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| GENERALITES | 10 |
| I - ANOMALIES GENETIQUES ET CANCER | 10 |
| I.1 Les différents types d'anomalies génétiques | 10 |
| I.2 Origine des anomalies dans les cancers | 11 |
| I.3 Les translocations chromosomiques dans les leucémies et les lymphomes | 14 |
| II - RECOMBINAISON V(D)J ET AUTRES MECANISMES IMPLIQUES DANS LES TRANSLOCATIONS CHROMOSOMIQUES | 15 |
| II.1 La recombinaison des gènes des récepteurs T et B | 15 |
| II.1.1 Mécanisme de la recombinaison V(D)J | 15 |
| II.1.2 Régulation du système de recombinaison V(D)J | 18 |
| II.1.3 Recombinaison des gènes d'Ig lors de la commutation de classe | 20 |
| II.2 Autres mécanismes impliqués dans les translocations | 20 |
| II.2.1 Les séquences <i>Chi</i> | 20 |
| II.2.2 La Transline | 21 |
| II.2.3 Les séquences répétées | 22 |
| II.2.4 Les sites de coupure des topoisomérases II | 23 |
| II.3 Mécanismes généraux de réparation des cassures double brin | 23 |
| III - LES LYMPHOMES-NON-HODGKINIENS | 24 |
| III.1 Classification | 24 |
| III.2 Les lymphomes dérivés des centres germinatifs chez l'Homme | 28 |
| III.3 Les gènes impliqués dans les lymphomes B | 29 |
| III.2.1 Le gène <i>MYC</i> | 29 |
| III.2.2 Le gène <i>BCL2</i> | 30 |
| III.2.3 Le gène <i>CCND1</i> | 31 |
| IV - LE GENE <i>LAZ3/BCL6</i> | 32 |
| IV.1 Clonage du point de cassure de la région 3q27 et découverte d'un nouveau gène | 32 |
| IV.2 Les réarrangements du gène <i>LAZ3/BCL6</i> | 33 |
| IV.2.1 Implications dans les Lymphomes-non-Hodgkinien | 33 |
| IV.2.2 Translocation du gène <i>LAZ3/BCL6</i> avec les gènes d'immunoglobulines | 35 |
| IV.2.3 Translocation du gène <i>LAZ3/BCL6</i> avec d'autres gènes | 36 |
| IV.2.4 Autres types de réarrangements du gène <i>LAZ3/BCL6</i> | 38 |
| IV.3 Structure du gène <i>LAZ3/BCL6</i> et de sa protéine | 38 |
| IV.4 La protéine <i>LAZ3/BCL6</i> est un répresseur transcriptionnel | 41 |
| IV.5 Expression du gène <i>LAZ3/BCL6</i> | 43 |
| IV.6 <i>LAZ3/BCL6</i> intervient dans la formation des centres germinatifs | 46 |
| V - LES CENTRES GERMINATIFS | 49 |
| V.1 Structure et contenu cellulaire des centres germinatifs | 49 |

| | |
|--|-----------|
| V.1.1 Structure des centres germinatifs | 49 |
| V.1.2 Les cellules des centres germinatifs | 50 |
| V.2 Développement des centres germinatifs | 51 |
| V.3 Fonction des centres germinatifs | 52 |
| V.3.1 Centres germinatifs et réponse aux antigènes | 52 |
| V.3.2 Rôle des centres germinatifs dans la création et l'expansion de cellules B mémoire | 52 |
| V.3.3 Rôle des centres germinatifs dans la diversité du répertoire B: Hypermutation somatique des gènes des régions variables des Ig | 54 |
| V.3.4 Rôle des centres germinatifs dans la sélection positive et négative des cellules B mémoires | 55 |
| V.5 Certains gènes intervenant dans le développement des centres germinatifs sont impliqués dans les leucémies et les lymphomes | 56 |
| OBJECTIFS DE L'ETUDE | 60 |
| RESULTATS | 63 |
| I - DEUX CAS DE REARRANGEMENTS BIALLÉLIQUES DANS LE MTC | 63 |
| I.1 Mise en évidence des réarrangements du gène <i>LAZ3/BCL6</i> dans la lignée (VAL) | 63 |
| I.2 Un autre réarrangement biallélique au niveau du MTC du gène <i>LAZ3/BCL6</i> chez un patient | 63 |
| II - EXISTE-T-IL DES ELEMENTS REGULATEURS DE TRANSCRIPTION DANS LE MTC? | 66 |
| II.1 Transfections dans la lignée cellulaire HeLa | 67 |
| II.2 Transfections dans la lignée murine NIH3T3 | 73 |
| III - COMPARAISON DE SEQUENCES DES REGIONS 5' NON TRADUITES DU GENE <i>LAZ3/BCL6</i> HUMAIN ET MURIN | 75 |
| III.1 Clonage de l'équivalent chez la souris du MTC et du promoteur du gène <i>LAZ3/BCL6</i> | 75 |
| III.2 Conservation de séquence du promoteur | 76 |
| III.3 Conservation de séquence du MTC | 76 |
| IV - DES PROTEINES D'EXTRAITS NUCLEAIRES DE CELLULES B ET DE CELLULES HeLa RECONNAISSENT LES SEQUENCES DELETEDES CHEZ LE PATIENT (GUI) LES MIEUX CONSERVEES | 80 |
| V - ESSAI DE CARACTERISATION DES PROTEINES FIXANT LES SEQUENCES G22 ET G25. | 82 |
| V.1 Principe du simple-hybride | 82 |
| V.2 Criblage par simple-hybride à l'aide du vecteur rapporteur pHis | 82 |
| V.3 Criblage d'une banque d'expression avec l'oligonucléotide G22 | 84 |
| VI - LES ALTERATIONS DU MTC INFLUENCENT-ELLES L'EXPRESSION DES DEUX ALLELES DU GENE <i>LAZ3/BCL6</i>? | 85 |
| DISCUSSION | 95 |
| I - Existence et conséquences des réarrangements bialléliques dans le MTC du gène <i>LAZ3/BCL6</i> | 95 |
| II - Le MTC a-t-il un rôle sur la transcription ? | 97 |

| | |
|---|------------|
| III - Conservation des séquences du promoteur et du MTC du gène <i>LAZ3/BCL6</i> | 99 |
| IV - Existence d'un deuxième promoteur et d'un autre exon non-codant | 102 |
| V - Echec de la technique du simple-hybride | 104 |
| CONCLUSION-PERSPECTIVES | 106 |
| MATERIEL ET METHODES | 109 |
| I - Extraction et purification des acides nucléiques | 109 |
| I.1 Extraction d'ARN | 109 |
| I.2 Extraction d'ADN | 109 |
| I.3 Analyse par Southern blot | 109 |
| II - Marquage des sondes | 110 |
| II.1 Marquage de sonde d'ADN double brin | 110 |
| II.2 Marquage de sonde oligonucléotidique | 110 |
| II.3 Marquage de sonde ARN | 111 |
| III - Criblage des banques génomiques et caractérisation des clones | 112 |
| III.1 Titrage des banques | 112 |
| III.2 Criblage des banques | 113 |
| III.3 Cartographie des phages et sous-clonage des fragments d'intérêt dans un plasmide | 113 |
| IV - Séquençage | 115 |
| V - Criblage d'une banque d'expression | 115 |
| VI - Electrophorèses | 116 |
| VI.1 Electrophorèse en gel d'agarose | 116 |
| VI.2 Electrophorèse en gel d'acrylamide | 116 |
| VII - Culture des lignées cellulaires | 117 |
| VIII - Transfection cellulaire et CAT essai | 117 |
| VIII.1 Transfection par DOTAP | 117 |
| VIII.2 Transfection par lipofectamine | 118 |
| VIII.3 Préparation des lysats cellulaires | 118 |
| VIII.4 Dosage de l'activité CAT | 119 |
| IX - Retard en gel | 119 |
| X - Protection aux ribonucléases | 120 |
| XI - Criblage d'une banque d'expression par la technique de simple-hybride | 121 |
| XI.1 Préparation des vecteurs rapporteurs | 121 |
| XI.2 Intégration des vecteurs rapporteurs dans le génome de la levure | 121 |
| XI.3 Criblage de la banque d'expression | 124 |
| BIBLIOGRAPHIE | 130 |
| ANNEXE | 143 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

GENERALITES

- Figure 1 , page 13: Représentation schématique du point de restriction en phase G1 régulé par P53 en réponse aux irradiations.
- Figure 2, page 16: Représentation schématique du processus de recombinaison V(D)J du locus des Ig.
- Tableau 1, page 26: Résumé des principales classifications des LNH de la lignée B.
- Figure 3, page 37: Schéma du point de cassure de la translocation t(3 ;4) et du transcrit de fusion *TTF/LAZ3*.
- Figure 4, page 40: Cartographie du gène *LAZ3/BCL6* et représentation schématique des transcrits alternatifs.
- Figure 5, page 43: Séquence cible de la protéine *LAZ3/BCL6*.
- Figure 6, page 50: Schéma représentant un centre germinatif.
- Figure 7, page 53: Modèle de voie de sélection des cellules B dans les centres germinatifs.
- Tableau 2, page 58: Les centres germinatifs chez divers souris modifiées génétiquement.

RESULTATS

- Figure 8, page 65: Cartographie des séquences des gènes *LAZ3/BCL6* humain et murin analysées.
- Figure 9, page 66: Schéma des différentes constructions utilisées en transfection transitoire.
- Figure 10, pages 68-71. Effets des séquences du MTC en transfection transitoire dans les cellules HeLa (A-B) et NIH3T3 (C-D).
- Figure 11, page 72: CAT essai représentatif des transfections cellulaires dans les lignées HeLa et NIH3T3.
- Figure 12, pages 78-79: Alignement des séquences humaine et murine du promoteur et du MTC du gène *LAZ3/BCL6*
- Figure 13, page 81: Retard en gel effectué avec les séquences G22 et G25 et des extraits nucléaires de cellules HeLa, Rec et Raji.
- Figure 14, page 83: Schéma du protocole de simple-hybride.
- Figure 15, page 86: Schéma du point de cassure de la translocation t(3 ;11) et du transcrit de fusion *BOB1/LAZ3*
- Figure 16, page 87: schéma des différentes sondes utilisées en protection aux ribonucléases.
- Figures 17 et 18, pages 90-91: Protection aux ribonucléases avec les sondes P526b et P583b.
- Figure 19, page 92: Protection aux ribonucléases avec les sondes P528 et CK2.
- Figure 20, page 93: Protection aux ribonucléases avec les sondes P516 et P479.

MATERIEL ET METHODES

- Figure 21, page 122: Schéma des différents vecteurs utilisés en simple-hybride.
- Composition des tampons page 127.

ABREVIATIONS

| | |
|------------|---|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc | ADN complémentaire |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNm | ARN messenger |
| ATM | <i>Ataxia Telangectasia Mutated</i> |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| BCLn | <i>B-Cell Leukemia/Lymphoma (1-8)</i> |
| bcr | <i>breakpoint cluster region</i> |
| BSA | Sérum albumine bovine |
| CAT | Chloramphénicol acétyle transférase |
| CCND1 | gène de la cycline D1 |
| CDK | Kinase dépendante des cyclines |
| CFD | Cellule Folliculaire Dendritique |
| CG | Centre Germinatif |
| CGH | <i>Comparative Genomic Hybridization</i> |
| <i>Chi</i> | <i>Cross over hot spot instigator</i> |
| cpm | coups par minute |
| DLCL | <i>diffuse large cell lymphoma</i> |
| DNA-PK | Protéine Kinase dépendante de l'ADN |
| del | délétion |
| dNTP | désoxynucléotides triphosphate |
| DTT | Dithiothréitol |
| dup | duplication |
| EBV | virus d'Epstein Barr |
| EDTA | Acide éthylènediamine tétra acétique |
| FISH | <i>Fluorescent in situ hybridization</i> |
| FL | lymphome folliculaire |
| GADD45 | <i>growth arrest and DNA damage-inducible</i> |
| Ig | Immunoglobuline |
| kb | kilo paire de bases |
| kDa | kilodalton |
| LAL | leucémie aiguë lymphoblastique |
| LAM | leucémie aiguë myéloïde |
| LAP | leucémie aiguë promyélocytaire |
| LB | lymphocyte B |
| LPS | lipopolysaccharide |
| LT | lymphocyte T |
| LMC | Leucémie myéloïde chronique |
| LNH | Lymphome-non-Hodgkinien |
| Mbr | <i>major breakpoint region</i> |
| mer | <i>minor cluster region</i> |
| MTC | <i>Major Translocation Cluster</i> |
| nt | nucléotide |
| pb | paire de bases |
| PCNA | <i>proliferating cell nuclear antigen</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PMA | phorbol 12-myristate 13-acétate |

| | |
|-------|--|
| PHA | phytohémaglutinine |
| RAG | <i>recombinase activating gene</i> |
| RNase | Ribonucléase |
| SAC | <i>Staphylococcus aureus cowan</i> |
| SDS | Sodium Dodécyl Sulfate |
| SIDA | Syndrome d'immunodéficience humaine |
| TEMED | N, N, N', N'- tétraméthyl éthylène diamine |
| TCR | Récepteur des cellules T |
| tk | thymidine kinase |
| TRIS | Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane |
| V(D)J | Variable Diversité Jonction |
| VIH | virus de l'immunodéficience humaine |
| XP | xeroderma pigmentosum |

GENERALITES

GENERALITES

Le développement de tumeurs malignes résulte de la transformation progressive d'une cellule normale en une cellule cancéreuse qui échappe alors aux mécanismes de régulation maintenant l'homéostasie tissulaire. Cette transformation par étapes est associée à l'acquisition d'un certain nombre d'anomalies chromosomiques par les cellules tumorales. L'étude de ces anomalies est particulièrement intéressante, en effet elles peuvent être utilisées comme marqueurs biologiques nécessaires pour classer les tumeurs, établir un diagnostic précis du type de cancer rencontré, orienter vers une thérapie précise et éventuellement donner une indication pronostique. L'étude de ces anomalies a également permis le clonage de nombreux gènes impliqués dans la genèse ou la progression tumorale. Dans le cas des lymphomes non Hodgkiniens (L.N.H.), l'étude des réarrangements chromosomiques associés, tels que la translocation t(8;14) pour le lymphome de Burkitt et la translocation t(14;18) principalement pour le lymphome folliculaire, a abouti respectivement à l'implication du gène *C-MYC* et l'identification du gène *BCL-2*, puis à l'analyse de leur fonction et en partie à la compréhension de leur implication dans le développement et la progression tumorale (Kluin *et al.*, 1997).

I - ANOMALIES GENETIQUES ET CANCER

Les tumeurs présentant des anomalies chromosomiques comprennent les leucémies et les lymphomes mais aussi les tumeurs solides (carcinomes, sarcomes). Ces anomalies perturbent le fonctionnement de deux types de gènes: les proto-oncogènes, gènes cellulaires qui peuvent être activés par des mutations dominantes, et les gènes supresseurs de tumeur dont le potentiel oncogène provient d'une perte de fonction par mutations ou délétions (Solomon *et al.*, 1991).

I.1 Les différents types d'anomalies génétiques

Les réarrangements mis en évidence par la cytogénétique sont très divers, il peut s'agir:

- d'anomalies de nombres: gain ou perte de chromosomes entiers,
- d'anomalies de structure équilibrées telles que les translocations réciproques, les inversions, les insertions, ou déséquilibrées telles que les dérivées de translocation, les délétions, les duplications (Solomon *et al.*, 1991).

Parmi les divers mécanismes qui peuvent altérer un proto-oncogène ou un gène suppresseur de tumeur, on distingue:

- des mutations ponctuelles dans les régions codantes altérant alors la fonction normale de la protéine qu'il code (*RAS*, *P53*...), des mutations dans les régions non codantes pouvant modifier les mécanismes de transcription, d'épissage et de traduction. Citons pour exemple les mutations décrites dans l'exon 1 du gène *MYC* qui modifient la stabilité des transcrits (Zajac-Kaye *et al.*, 1988), ou les mutations décrites dans les sites d'épissage du gène *BRCA1* (Xu *et al.*, 1997)

- des insertions de séquences régulatrices, souvent de séquences virales comme l'insertion du provirus MuLV (*murine leukemia virus*) qui active l'oncogène *Bmi 1* dans les thymomes (van Lohuizen *et al.*, 1991),

- des inversions telle que l'inversion du chromosome 16 décrite dans la leucémie aiguë myéloïde (LAM) qui provoque la fusion des gènes *CBFβ* et *SMMHC/MYH11* (Liu *et al.*, 1993),

- des délétions qui ont pour cible aussi bien un chromosome entier qu'un fragment de gène : délétion des gènes suppresseurs de tumeur *P53* et *RB* (Weinberg, 1991), délétion dans la région 5' du gène *TALI/SCL* dans les leucémies T de l'enfant sans translocation t(1;14) (Brown *et al.*, 1990).

- des duplications : duplication en tandem d'une portion du gène *MLL* dans les leucémies aiguës (LA) (Schiman *et al.*, 1994).

- des translocations (détaillées plus loin).

I.2 Origine des anomalies dans les cancers

Les pertes ou gains de chromosome entier peuvent s'expliquer par des défaillances des voies de contrôle du cycle cellulaire comme par exemple : une dérégulation de la réplication en phase S (Stillman *et al.*, 1996), une dérégulation au niveau des différentes phases de la mitose, notamment au niveau du fuseau mitotique qui est impliqué dans la ségrégation chromosomique. En effet, un point de contrôle empêche l'anaphase de se poursuivre si les chromosomes ne sont pas attachés au fuseau (Elledge *et al.*, 1996). Les mécanismes responsables de la séparation correcte des chromosomes pendant la division cellulaire sont défectueux dans certaines lignées de cancers colorectaux (Orr-Weaver et Weinberg, 1998). La protéine P53, mutée dans près de 50% des cancers, est impliquée notamment dans un processus qui régule le nombre de

centrosomes dans une cellule (Fukusawa *et al.*, 1996). Beaucoup de régulateurs du cycle cellulaire sont impliqués dans les cancers par mutation (par exemple P53) ou surexpression (par exemple la cycline D), ou par leur perte de fonction (p16 et p21, inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines) (Hunter et Pines, 1994).

Les anomalies de structure plus complexes pourraient provenir d'une suite d'échecs successifs des voies de protection de l'intégrité du génome, en particulier les systèmes de reconnaissance et de réparation des cassures chromosomiques qui dépendent du cycle cellulaire. Les arrêts du cycle cellulaire et la réparation des dommages à l'ADN nécessitent la coordination d'un ensemble de protéines (Hall et Peters, 1996 ; Morgan et Kastan, 1997). Là encore, P53 joue un rôle prépondérant : elle est responsable de l'arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire, permettant ainsi la réparation de l'ADN avant la réplication. P53 est aussi impliquée dans la transition G2/M, autre point de contrôle du cycle cellulaire (Levine, 1997). L'expression de P53 est stimulée en réponse aux agents endommageants l'ADN (irradiations γ et UV, agents chimiques...) et si l'ADN comporte trop de lésions, P53 active le processus d'apoptose (Levine, 1997). On ne sait pas comment P53 est activée mais un gène candidat, ATM (gène de l'Ataxie Téléangectasie), détecterait les altérations de l'ADN et transduirait un signal à P53 (Barlow *et al.*, 1996). L'altération du gène ATM produit la perte spontanée de chromosome et une instabilité génétique contribuant ainsi à la progression tumorale. Les cellules dépourvues du gène ATM ont une réponse retardée et atténuée de P53 aux radiations ionisantes (Xu et Baltimore, 1996), ATM n'est donc pas le seul gène intervenant dans l'activation de la voie P53 (Morgan et Kastan, 1997) (Figure 1, p 13).

P53 interviendrait également dans la réplication et la réparation de l'ADN notamment par l'intermédiaire des produits de deux de ses gènes cibles p21/*WAF1/CIP1* et *GADD45* (El-Deiry *et al.*, 1994 ; Kastan *et al.*, 1992). P21 est un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (Cdk) dont l'activation bloque l'entrée des cellules en phase S. P21 inhibe aussi l'action du PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), facteur impliqué dans la réplication et la réparation de l'ADN par excision-resynthèse (Ko et Prives, 1996; Levine *et al.*, 1997). *GADD45* se lie au PCNA et provoque un arrêt du cycle cellulaire. P53 pourrait aussi intervenir directement dans les processus de réparation et de réplication de l'ADN. En effet, elle se fixe *in vitro* à deux sous-unités hélicases du facteur de transcription basal et de réparation TFIIH (XP-B/ERCC3 et XP-D/ERCC2), P53 reconnaît et se fixe sur les extrémités d'ADN ou les mésappariements (Ko et Prives, 1996; Levine *et al.*, 1997).

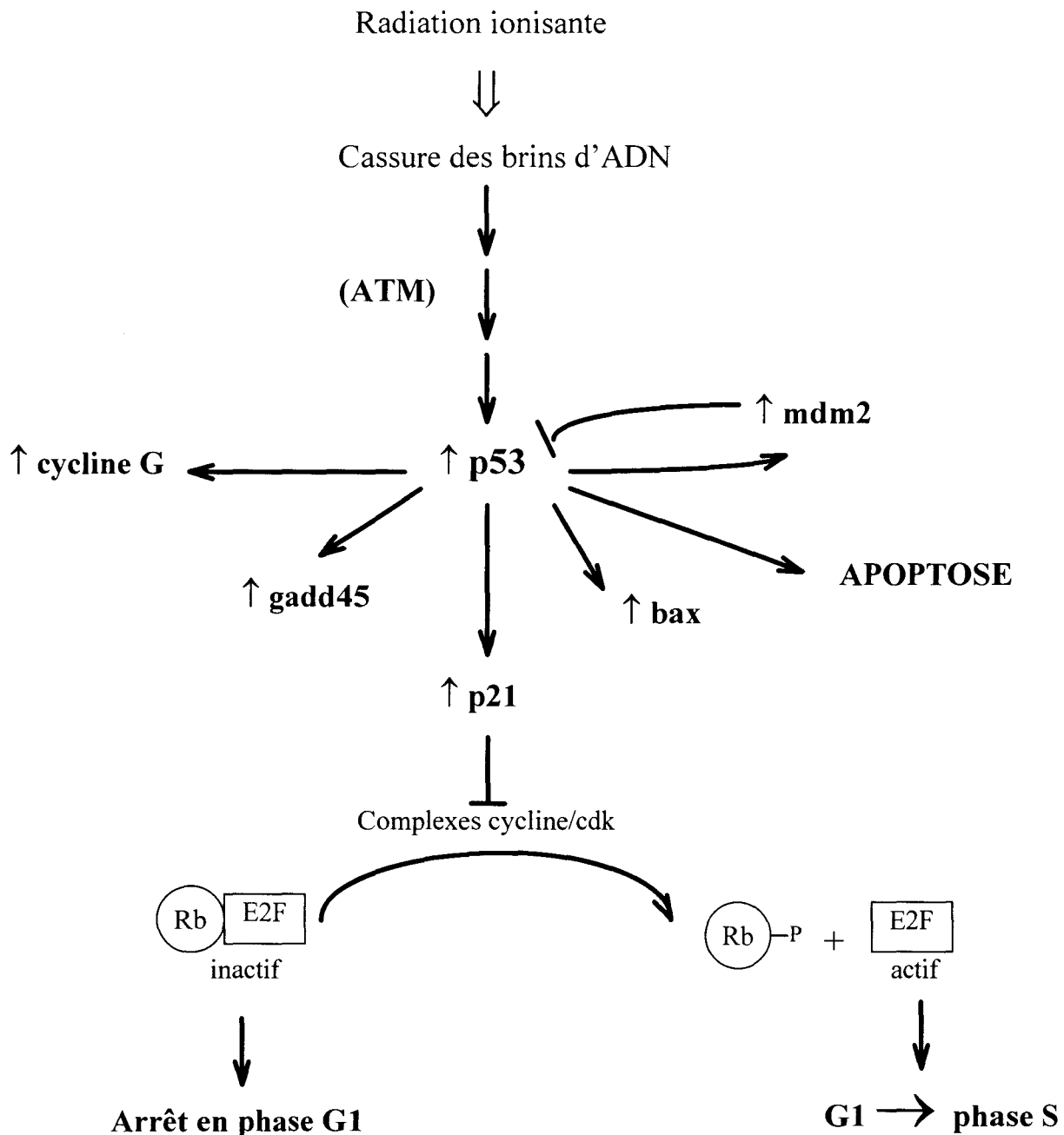


Figure 1 : Représentation schématique du point de restriction en phase G1 régulé par P53 en réponse aux irradiations (d'après Morgan et Kastan; 1997).

Les radiations ionisantes provoquent des cassures de l'ADN qui induisent une augmentation du taux de protéine P53 (probablement par l'intermédiaire d'ATM). P53 active la transcription de ces gènes cibles (*gadd45*, *mdm2*, *p21*, *Bax* et la cycline G). L'augmentation du taux de p21 contribue à l'arrêt des cellules en phase G1 par inhibition des complexes cycline/cdk et donc la phosphorylation de leurs protéines cibles comme Rb. Rb se fixant à la famille de facteurs de transcription E2F empêche l'activation de la transcription de leurs gènes cibles, requise pour la progression en phase S : les cellules restent en phase G1. Le rôle de la cycline G et de Gadd45 dans ce processus ne sont pas encore connus. L'augmentation de l'expression de Bax pourrait intervenir dans l'induction de l'apoptose dans certaines cellules.

En ce qui concerne les anomalies du système lymphoïde une défaillance du système de recombinaison V(D)J est en cause, avec en plus d'autres mécanismes plus généraux (voir chapitre II).

I.3 Les translocations chromosomiques dans les leucémies et les lymphomes

Les anomalies chromosomiques les mieux étudiées proviennent en grande majorité des hémopathies malignes. Il existe deux catégories d'anomalies (Johansson *et al.*, 1995):

- les anomalies primaires, qui sont présentes dès le diagnostic et tout au long de la maladie. Ces réarrangements sont d'une grande valeur diagnostique car spécifiques d'une pathologie donnée et parce qu'ils sont très certainement à l'origine du développement tumoral, au moins aux stades précoces de son évolution. Dans les lymphomes-non-Hodgkinien, les anomalies primaires les plus fréquentes intéressent les gènes d'immunoglobulines (Ig).

- les anomalies secondaires, qui peuvent apparaître au cours de la progression tumorale et s'ajoutent à une anomalie primaire. Elles sont responsables du phénomène d'évolution clonale de la tumeur en constituant des sous-clones. Porteurs de la même anomalie primaire mais différents par leurs anomalies secondaires, ceux-ci sont susceptibles d'apporter un avantage soit prolifératif, soit de résistance, soit de survie à la tumeur. Les anomalies secondaires présentent donc un intérêt pronostique majeur.

Parmi les anomalies primaires, les translocations ont été les mieux caractérisées au niveau chromosomique d'une part, par la cytogénétique, mais surtout au niveau de l'ADN, par les études de génétique moléculaire. Le clonage des translocations a été d'un apport majeur pour la compréhension des mécanismes oncogènes résultants de ce type d'anomalie.

Les translocations ont deux principales conséquences : soit la juxtaposition du gène d'un récepteur T (TCR) ou d'un gène d'Ig à proximité d'un proto-oncogène qui se trouve alors activé, soit la formation d'un gène de fusion codant une protéine hybride (*BCR/ABL* dans la leucémie myéloïde chronique (LMC), *PML-RAR α* dans la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP)). Ce type de translocation existe aussi dans certains cas de tumeurs solides (par exemple : la translocation t(2;13) dans le rhabdomyosarcome qui fusionne *PAX3* et *FKHR*) (Rabbitts, 1994; Look, 1995). Les gènes impliqués dans les translocations sont des gènes contrôlant les processus de régulation de la cellule. La dérégulation de l'expression génique peut se situer à tous les niveaux de la transduction des signaux reçus par la cellule, depuis les récepteurs membranaires

jusqu'à la transcription. Les gènes cibles des translocations dans les leucémies et les lymphomes sont très souvent des facteurs de transcription soulignant l'importance de leur fonction dans le développement, la prolifération et la différenciation des cellules (Rabbitts, 1994; Look, 1995&1997).

Dans les lymphomes, on observe le plus souvent l'activation d'un oncogène suite à une translocation intéressant le locus des gènes d'Ig. Le gène cible de la translocation est alors placé sous contrôle d'une séquence activatrice forte (*enhancer* des Ig) et éloigné de ses régions régulatrices propres.

II - Recombinaison V(D)J et autres mécanismes impliqués dans les translocations chromosomiques

II.1 La recombinaison des gènes des récepteurs T et B

II.1.1 Mécanisme de la recombinaison V(D)J

Les gènes codant les Ig et les TCR sont assemblés pendant le développement des lymphocytes B et T par une suite d'événements de recombinaison site-spécifique au niveau des segments V (variable), J (jonction) et parfois D (diversité) des gènes des chaînes d'Ig, afin de constituer un gène fonctionnel (figure 2A, p 16). Ce processus appelé recombinaison V(D)J permet la production d'anticorps ou de TCR d'une très grande diversité (diversité combinatoire), accrue par des délétions ou additions aléatoires de nucléotides au cours de la réunion des segments V-J (diversité jonctionnelle) (Smider et Chu, 1997).

La recombinaison V(D)J s'effectue par la reconnaissance de séquences signal de recombinaison (RSS) flanquant les différents segments V, D et J des gènes d'Ig. Les RSS sont constituées des séquences conservées (heptamères: CACAGTG et nonamères: ACAAAAACC) séparées par une région non conservée de 12 ou 23 nucléotides appelé espaceur (*spacer*). La recombinaison ne peut avoir lieu qu'entre des segments flanqués par des séquences signal qui diffèrent par la longueur de l'espaceur (van Gent *et al.*, 1996). La recombinaison V(D)J fait appel aux protéines RAG-1 et RAG-2 (*recombinase activating gene*) dont l'expression est corrélée à l'activité recombinase dans les cellules.

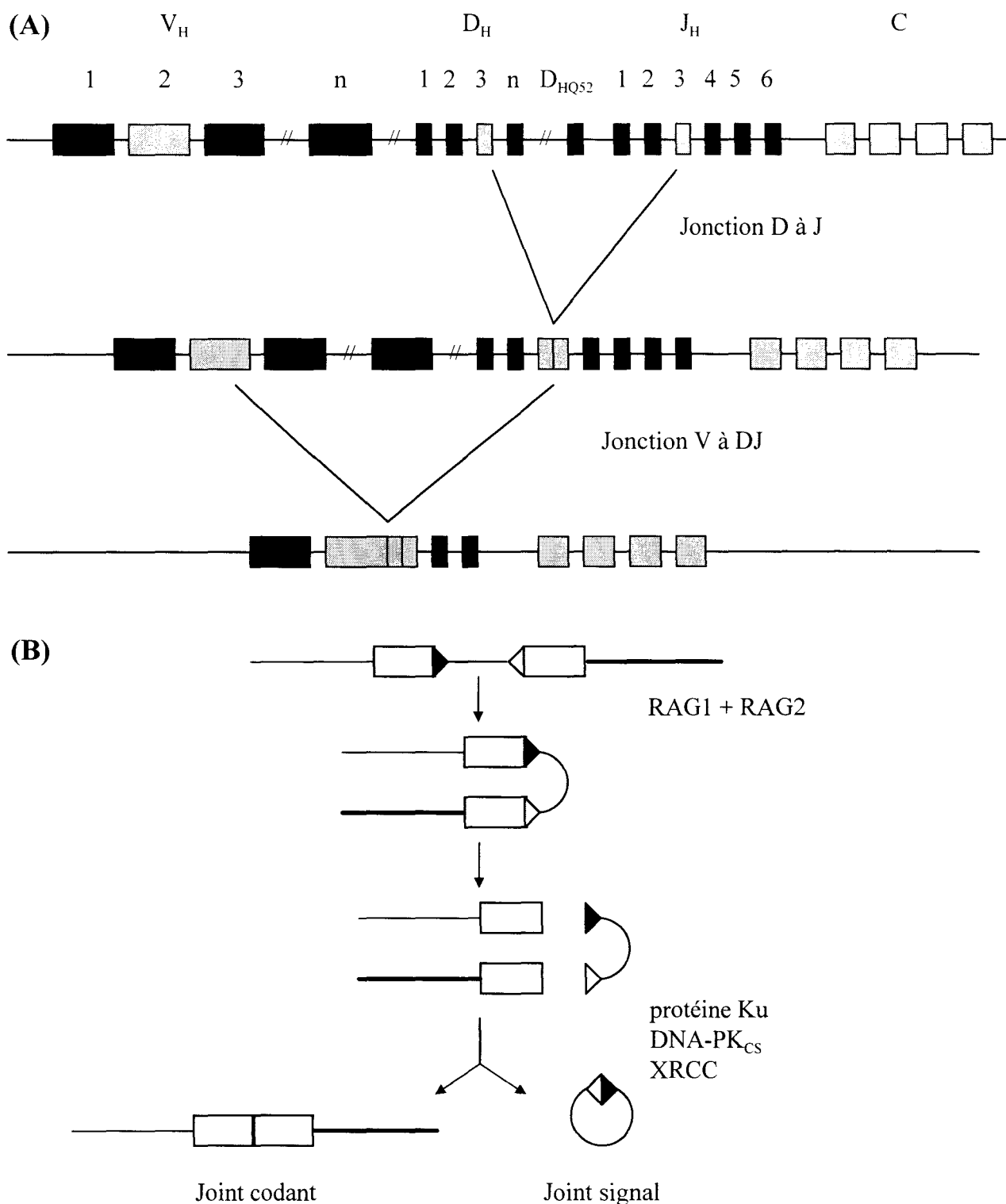


Figure 2: (A) Représentation schématique du processus de recombinaison du locus humain des IgH. La jonction D à J est suivie de la recombinaison V à DJ. Chaque rectangle représente un segment V, D, ou J. (B) Les différentes étapes de la recombinaison V(D)J. Les triangles représentent les séquences signal de recombinaison (RSS) et les rectangles, les séquences codantes. Les protéines RAG1 et RAG2 effectuent un clivage de l'ADN à la limite des séquences signal et codante. Les séquences codantes forment une épingle à cheveux qui est clivée, les extrémités des séquences codantes et des séquences signal sont liguées par les protéines impliquées dans la réparation des cassures double brin de l'ADN.

Les souris dont les gènes *RAG-1* et *RAG-2* sont inactivés ne possèdent pas de lymphocytes B ou T matures, conséquence de l'absence de recombinaison V(D)J (Mombaerts *et al.*, 1992 ; Shinkai *et al.*, 1992). De plus, l'activité de ces deux seules protéines est nécessaire et suffisante à la recombinaison V(D)J *in vitro* (Ramsden *et al.*, 1997).

La recombinaison V(D)J est initiée par une cassure double brin de l'ADN à la jonction des segments codants et des séquences heptamères. Les extrémités des segments codants d'une part et les extrémités des séquences signal d'autre part sont liguées pour former respectivement une jonction codante et une jonction signal (ou jonction des signaux) (figure 2B, p 16). La jonction des séquences codantes s'accompagne de modification de nucléotides : délétion par une exonucléase, addition de nucléotides provenant de l'activité de l'enzyme TdT (*terminal deoxynucleotide transferase*) ou insertion d'élément palindromique P. La jonction des heptamères est au contraire très précise et fidèle (Desiderio *et al.*, 1996; Smider et Chu, 1997).

La cassure double brin de l'ADN s'effectue en deux étapes après que les protéines RAG aient reconnu les séquences signal :

- RAG 1 et RAG 2 hydrolysent la liaison phosphodiester en 5' de l'heptamère d'un des brins d'ADN,
- RAG 1 et RAG 2 couplent l'extrémité 3'OH formée coté segment codant, au pont phosphodiester du RSS de l'autre brin par transestérification. Cette réaction s'accompagne de la formation de structures en épingle à cheveux aux extrémités des séquences codantes tandis que les extrémités des séquences signal sont franches et phosphorylées en 5' (Desiderio *et al.*, 1996; Smider et Chu, 1997).

Les extrémités en épingle à cheveux des séquences codantes sont ouvertes et couplées pour former la jonction codante; les séquences signal quant à elles, sont liguées bout à bout en jonction signal. La jonction des différents segments fait intervenir les protéines XRCC4, 5, 6 et 7 impliquées dans les mécanismes de réparation des cassures d'ADN double brin (Desiderio *et al.*, 1996; Ramsden *et al.*, 1997; Smider et Chu, 1997). La mutation des gènes *XRCC4*, *5*, *6* et *7* est associée à une hypersensibilité aux radiations ionisantes et à l'incapacité d'effectuer une recombinaison V(D)J. *XRCC7* correspond au locus *scid* chez la souris, les souris mutées dans ce locus n'ont pas de lymphocytes T et B fonctionnels suite à l'incapacité d'effectuer une recombinaison V(D)J et elles présentent un défaut de réparation des cassures double brins ainsi qu'une hypersensibilité aux rayons γ (Biedermann *et al.*, 1991; Hendrickson *et al.*, 1991). *XRCC*

7 code une sous-unité catalytique d'une protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK_{CS}) (Blunt *et al.*, 1995). XRCC5 et 6 constituent respectivement les deux sous-unités p86 et p70 de l'antigène Ku qui fixe les extrémités d'ADN issues de cassure et s'associe à DNA-PK dont il est la composante catalytique et régulatrice (Smider et Chu, 1997). XRCC4 est aussi impliquée dans la réparation des cassures double brin et la recombinaison V(D)J (Li *et al.*, 1995). XRCC4 et 5 sont nécessaires à la formation des jonctions signal et codantes, DNA-PK participe également à la résolution des épingles à cheveux. Un modèle a été proposé selon lequel la réaction de jonction des extrémités des segments serait effectué par un mécanisme semblable à celui de la réparation des cassures double brin de l'ADN (Smider et Chu, 1997). Les protéines HMG 1 et 2 pourraient avoir un rôle important dans la recombinaison V(D)J car elles stimulent le clivage et la fixation des protéines RAG sur l'espaceur et sont capables, associées à la chromatine, de tordre l'ADN (van Gent *et al.*, 1997).

II.1.2 Régulation du système de recombinaison V(D)J

Une régulation stricte de la recombinaison V(D)J est nécessaire pour assurer la production de récepteurs B et T fonctionnels et pour protéger l'intégrité du génome. La recombinaison V(D)J peut être régulée à différents niveaux : au niveau du tissu lymphoïde, au niveau de la lignée cellulaire B ou T (le locus TCR reste non réarrangé dans les cellules B, il en est de même pour le locus Ig dans les cellules T), au niveau du stade de différenciation du lymphocyte (progéniteur ou cellule mature) et au niveau chronologique: dans les cellules B la chaîne lourde est réarrangée en premier, les réarrangements des segments D_H-J_H ont lieu avant les réarrangements V_H-(D)_H puis la chaîne légère est réarrangée, la chaîne kappa avant la chaîne lambda (Schlissel et Stanhope-Baker, 1997).

L'expression des gènes *RAG 1* et *2* est limitée aux lymphocytes immatures et corrélée à l'activité de la recombinaison V(D)J. La régulation de l'expression des gènes *RAG1* et *2* est donc responsable de la spécificité du tissu et du stade de différenciation. Mais le contrôle précis de la transcription de ces deux gènes n'est pas connu (Gellert, 1997). L'expression de *RAG2* est régulée au cours du cycle cellulaire, la protéine *RAG-2* s'accumule en G0-G1 puis disparaît brutalement avant l'entrée en phase S et reste indétectable jusqu'en phase M. La dégradation rapide de la protéine *RAG-2* proviendrait de sa phosphorylation en Thr-490 par une kinase cycline dépendante. Contrairement à *RAG2*, le taux de protéine *RAG1* est stable pendant le cycle

cellulaire. La recombinaison V(D)J pourrait donc être restreinte à la phase G1 du cycle cellulaire (Desiderio *et al.*, 1996).

D'autres mécanismes doivent intervenir pour contrôler le ciblage de la recombinaison V(D)J et pour expliquer la recombinaison préférentielle de certains segments ou l'exclusion allélique. Plusieurs hypothèses ont été évoquées : la transcription des gènes d'Ig et TCR, la conformation chromatinienne, la méthylation des îlots CpG des loci Ig/TCR, l'activité des *enhancers* de ces mêmes loci et les interactions protéines/protéines (Stewart et Swartz, 1994; Schlissel et Stanhope-Baker, 1997). L'activité de la recombinase est en partie régulée par la structure de l'ADN. Plusieurs des mécanismes annoncés agiraient de concert : une corrélation entre transcription et réarrangement des gènes d'Ig a été établie, les *enhancers* requis pour l'activation de la transcription des gènes d'Ig et TCR sont impliqués dans la régulation de l'accessibilité des loci mais les facteurs fixant l'ADN qui médient ces effets sont à identifier (Schlissel et Stanhope-Baker, 1997).

La recombinaison V(D)J faisant intervenir des protéines impliquées dans la réparation des cassures double brin, il est également très probable que ces deux processus soient co-régulés. Le clonage du gène codant la DNA-PK a montré son appartenance à la famille des PI3K (phosphatidyl-inositol 3 kinases) qui comprend notamment ATM et d'autres protéines comme TEL1 chez la levure, contrôlant les dommages à l'ADN (Gellert, 1997; Danska et Guidos, 1997). P53 n'intervient pas directement dans la recombinaison V(D)J mais elle est responsable de l'apoptose des thymocytes des souris *scid* en raison de la présence anormale d'intermédiaires de recombinaison avec cassures double brin (Guidos *et al.*, 1996). Les souris *scid* dépourvues du gène P53 développent rapidement des lymphomes ou leucémies à cellules pré-T ou pro-B, donc la persistance d'intermédiaires de recombinaison V(D)J pourrait augmenter le risque d'une instabilité génomique et donc d'une transformation des progéniteurs des lymphocytes (Guidos *et al.*, 1996).

La recombinaison V(D)J est le seul réarrangement d'ADN site spécifique programmé connu chez les vertébrés mais il n'est pas infaillible : environ 40% des réarrangements sont improductifs car ils n'ont pas de cadre de lecture ouvert (Kirsch et Lista, 1997). Des trans-réarrangements ou réarrangements inter-locus existent tel que celui d'une inversion du chromosome 14 qui juxtapose un segment variable du locus des IgH à un segment de jonction du locus TCR α (Kirsch et Lista, 1997). Les gènes d'Ig ou du TCR ne sont pas les seules cibles possibles de ces erreurs. En effet, certaines translocations comme la t(14;18) peuvent se produire occasionnellement dans les cellules lymphoïdes d'individus sains (Limpens *et al.*, 1996).

L'analyse des séquences de nombreux points de translocation a permis de retrouver des séquences identiques ou proches des séquences heptamère/nonamère ou des additions/délétions de nucléotides (séquences N ou P) à proximité des points de cassure suggérant que ces anomalies pouvaient provenir d'erreur de recombinaison ou d'une recombinaison illégitime (Lewis *et al.*, 1997). Cette hypothèse a été évoquée pour les translocations t(8;14), t(11;14) et t(14;18) impliquant les gènes *MYC*, *BCL-1* et *BCL-2* (Morse *et al.*, 1989; Tsujimoto *et al.*, 1985).

II.1.3 Recombinaison des gènes d'Ig lors de la commutation de classe

Un autre type d'erreur peut se produire lors de la commutation isotypique au niveau du locus des gènes d'IgH. Ce processus a lieu dans les lymphocytes matures des centres germinatifs des follicules lymphoïdes, exprimant des Ig de surface de type IgM ou IgD, après contact avec un antigène. La commutation de classe implique une recombinaison intrachromosomique qui amène les gènes V_H à proximité d'un nouveau gène C_H après délétion des autres gènes (C_μ , C_δ ...) (Coffman, 1993). La conséquence de ce réarrangement est de produire un anticorps de même antigénicité mais capable d'interagir avec d'autres effecteurs (molécules du complément, récepteurs du fragment FC) (Coffman, 1993). La commutation de classe nécessite des signaux de recombinaison spécifiques : les séquences de commutation ou *switch*, situées en 5' de chaque segment constant de la chaîne lourde d'Ig (sauf C_δ) (Coffman, 1993; Harriman *et al.*, 1993). Une recombinaison illégitime peut se produire entre les régions *switch* et d'autres régions non homologue sur d'autres chromosomes. Ces séquences ont été aussi mises en évidence à proximité de points de cassure de certaines translocations ce qui a permis de dater la genèse de la translocation après la recombinaison V(D)J, pendant la commutation de classe. Citons le cas de la translocation t(8;14) impliquant le gène *MYC* et la région *switch* μ ou α des IgH dans le lymphome de Burkitt (Neri *et al.*, 1988). Des mécanismes d'épissage en trans ont lieu dans la lignée B *BCL1* et aboutissent à la production de deux isotypes d'Ig à la fois (IgM et IgD) (Harriman *et al.*, 1993).

II.2 Autres mécanismes impliqués dans les translocations

II.2.1 Les séquences *Chi*

Les séquences *Chi* (*c**ross-over hot spot instigator*) sont des points chauds de recombinaison chez *E. Coli*. Il s'agit d'une séquence conservée 5' GCTGGTGG 3' reconnue par

la recombinaison/hélicase RecBCD (Ponticelli *et al.*, 1985). Celle-ci crée par son activité nucléase une extrémité d'ADN simple brin libre reconnue par la protéine RecA responsable de la recombinaison homologue (Bianco et Kowalczykowski, 1997; Anderson et Kowalczykowski, 1997). Des séquences de type *Chi* ou *Chi-like* ont été retrouvées dans les points de cassure Mbr (*Major breakpoint region*) et mcr (*minor cluster region*) impliquant le gène *BCL-2* (Jaeger *et al.*, 1993), mais également au voisinage des segments D_H et J_H, et à la jonction de nombreux points de translocation dont la t(3;11)(q27;q23) impliquant les gènes *LAZ3/BCL6* et *BOB1/OBF1/OCA-B* (Galiègue-Zouitina *et al.*, 1996). Une protéine nucléaire, bp45, se liant spécifiquement à une séquence homologue de la séquence *Chi* a été identifiée (Jaeger *et al.*, 1993). Cette protéine est capable de fixer la séquence *Chi* du Mbr de *BCL-2* situé en 18q21 (Jaeger *et al.*, 1993). La protéine bp45 se lierait à deux sites *Chi* situés sur deux chromosomes différents et pourrait induire une recombinaison entre ces deux chromosomes. Le même groupe a également rapporté l'existence dans la lignée ReH de deux facteurs C1 et C2 capable de fixer une séquence simple brin de la partie 5' riche en A et G du mbr du gène *BCL-2* (Knapp *et al.*, 1994). C1 se lie spécifiquement à la séquence GGGAGG mais aussi GG(X)_nGG (n compris entre 2 et 46). L'hypothèse proposée est celle d'une protéine reconnaissant les extrémités GG de cette séquence, la formation d'une boucle d'ADN par la séquence entre les sites GG qui pourrait être éliminée par clivage (Knapp *et al.*, 1994). La séquence GGGAGG est présente au voisinage de nombreux points de cassure sur un seul ou les deux partenaires comme au niveau des deux chromosomes impliqués dans la t(15;17), ou encore pour la t(4;11) dans la région du point de cassure du gène *MLL* (Knapp *et al.*, 1994). On ne sait pas si C1 et bp45 sont la même protéine ou coopèrent.

II.2.2 La Transline

Un autre groupe à la recherche de protéines de liaison spécifique à la région Mbr de *BCL-2* a identifié une protéine de 25 kDa appelée BCLF-1 (Aoki *et al.*, 1994). Cette même protéine, également nommée ReHF-1, se lie spécifiquement à des séquences situées à proximité des points de cassure comme en 8q24 pour la translocation t(8;14) dans le lymphome de Burkitt ou en 1p32 pour la translocation t(1;14) dans les leucémies T aiguës. Depuis, la séquence consensus reconnue par cette protéine, maintenant appelée Transline, a été identifiée (Aoki *et al.*, 1995). Ce motif est composé de la séquence ATGCAG séparée d'une courte distance de la séquence GCCC(A/T)(G/C)(G/C)(A/T) ou encore de cette séquence dupliquée en tandem. Ces séquences sont trouvées à proximité de points de cassure de plusieurs translocations, dont la translocation t(3;14) impliquant le gène *LAZ3/BCL6* (Aoki *et al.*, 1995). Récemment, le même groupe a

montré que la Transline se fixe spécifiquement aux extrémités d'ADN simple brin et qu'elle forme une structure en anneau, permettant ainsi sa fixation à l'ADN (Kasai *et al.*, 1997). Le rôle précis de la Transline dans la formation des translocations n'est pas encore connu mais, il implique qu'une cassure chromosomique soit effectuée par une nucléase au niveau de la séquence consensus avant que la Transline ne se fixe sur l'extrémité simple brin créée (Kasai *et al.*, 1997). La Transline pourrait également être impliquée dans la formation de translocations dans les tumeurs solides. En effet, elle fixe une séquence à proximité des points de cassure de la t(2;13)(q35;q14) associée au rhabdomyosarcome alvéolaire (Chalk *et al.*, 1997).

II.2.3 Les séquences répétées

D'autres séquences ont été mises en cause dans la formation des translocations chromosomiques:

Des séquences répétées purine/pyrimidine à proximité de points de cassure feraient adopter une conformation Z à l'ADN qui favoriserait les réarrangements en rendant la chromatine accessible (Bouffler *et al.*, 1993).

Des séquences Alu proches des points de translocations pourraient former des structures en épingle à cheveux inter ou intrachromosomique par recombinaison homologue et favoriser une translocation (Chen *et al.*, 1989). Dans deux cas de LAL (leucémie aiguë lymphoblastique) induite par le traitement, porteurs d'une translocation t(4;11), les points de cassure dans la région bcr du gène *MLL* se situe dans une séquence Alu (Megonigal *et al.*, 1997). La présence d'autres séquences Alu à proximité des points de cassure sur les chromosomes partenaires de translocation fait penser que ces séquences sont responsables de ces réarrangements (Megonigal *et al.*, 1997).

Dans le sarcome de Ewing à t(11;22) l'élément LINE-I inséré au niveau de la translocation (Liu *et al.*, 1997) ou des séquences répétées de type *mer11* dans une translocation t(11;14) variante (Rimokh *et al.*, 1994) pourraient favoriser les réarrangements chromosomiques. De même, des séquences rétrovirales endogènes de la famille des THE (*transposable-like human element*) pourraient être à l'origine d'une translocation t(7;14) associée à la leucémie lymphocytaire B chronique (Wahbi *et al.*, 1997)

Enfin la méthylation de certaines régions des chromosomes pourrait être impliquée dans le processus de translocation. En effet, une région hypométhylée de 600 pb a été identifiée dans le M-bcr du gène *BCR* dans les cellules hématopoïétiques. Cette région est anormalement méthylée chez 40% de patients atteints de LMC (Litz *et al.*, 1996).

II.2.4 Les sites de coupure des topoisomérases II

Il est reconnu que des agents endommageant l'ADN comme les inhibiteurs de la topoisomérase II (Topo II), utilisés en chimiothérapie, peuvent induire des translocations. En effet, certains points chauds ont été mis en évidence au niveau de la bande 11q23 chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloïde induite (t-AML) par un traitement aux inhibiteurs de Topo II. Le plus souvent, le gène *MLL* est interrompu par des points de cassure localisés dans une région de 8,3 kb (bcr), ceux-ci seraient provoqués par les inhibiteurs de Topo II en conjonction avec des erreurs des mécanismes de réparation de l'ADN (Felix *et al.*, 1995; Aplan *et al.*, 1996). Ces points de cassure pourraient aussi être liés à un stade initial de l'apoptose où se produisent des fragmentations d'ADN (Stanulla *et al.*, 1997).

II.3 Mécanismes généraux de réparation des cassures double brin

La recombinaison V(D)J fait appel à plusieurs facteurs intervenant dans le processus de réparation de l'ADN comme la DNA-PK. La recombinaison V(D)J peut donc être considérée comme un processus physiologique qui génère des altérations de l'ADN et qui pourrait déclencher les voies de réparation des cassures de l'ADN (*DNA damage checkpoints*) (Danska et Guidos, 1997).

La cellule possède des mécanismes de contrôle qui détectent quand l'ADN est endommagé et induisent sa réparation, et, notamment en cas de cassure double brin, qu'elle soit d'origine endogène ou exogène (induite par le rayonnement). Généralement le processus de réparation passe par un ralentissement ou un arrêt de la progression du cycle cellulaire au niveau des transitions G1-S ou G2-M qui constituent des points de contrôle, puis la réparation ou l'apoptose. Les mutations qui affectent ces points de contrôle sont associées à une sensibilité aux radiations ionisantes et à une instabilité génétique (par exemple le gène *ATM* muté dans l'Ataxie Téléangiectasie ou les gènes *XRCC*). *ATM* pourrait jouer le rôle de «détecteur» d'anomalies et transmettrait un signal à P53, «gardienne du génome», qui intervient en tant qu'effecteur en arrêtant la progression du cycle cellulaire induisant ainsi la réparation ou l'apoptose (Weaver, 1995; Morgan et Kastan, 1997).

Chez l'Homme, on sait assez peu de chose des mécanismes de réparation mais les homologues humains des gènes de la famille *RAD52*, impliqués dans la réparation des cassures d'ADN double brin chez la levure, pourraient intervenir (Friedberg, 1995). L'un de ces gènes,

RAD51 est l'homologue de *RecA* d'*E. Coli* impliqué dans la recombinaison homologue et la réparation au cours des réponses de type SOS (Friedberg, 1995). Il apparaît que P53 se lie *in vitro* à *RecA* et à *RAD51* (chez la levure) (Stürzbecher *et al.*, 1996). Les protéines *BRCA 1* et *2* auraient un rôle dans la réponse aux endommagements de l'ADN. En effet, *RAD51* se lie aux protéines *BRCA 1* et *2* et les souris *RAD51*^{-/-} et *BRCA2*^{-/-} présentent des phénotypes très semblables d'hypersensibilité aux irradiations et une forte mortalité embryonnaire (Zhang *et al.*, 1998). Les protéines *BRCA1* et *RAD51* co-localisent au niveau des complexes synaptonémaux, jonctions entre les chromosomes méiotiques nécessaires à la recombinaison homologue (Kinzler et Vogelstein, 1997). Les souris porteuses d'un gène *BRCA2* tronqué présentent un retard de croissance et une durée de vie plus courte; celles qui atteignent l'âge adulte développent des lymphomes au niveau du thymus (Zhang *et al.*, 1998). De plus, les cellules de ces souris présentent spontanément de nombreuses anomalies chromosomiques comprenant des cassures de chromatides, reflet d'un défaut d'échange de chromatide pendant la recombinaison mitotique (Zhang *et al.*, 1998). La prolifération lente de ces cellules pourraient provenir de l'augmentation des taux de P53 et P21 observée (Zhang *et al.*, 1998). L'ensemble de ces données suggèrent que *BRCA2*, comme *RAD51*, est impliquée dans la réponse aux altérations de l'ADN, plus particulièrement dans le contrôle de la ségrégation chromosomique et/ou dans la réparation de l'ADN.

L'expression nucléaire de *RAD51* est induite dans les lymphocytes B au cours de la commutation isotypique de classe (Li *et al.*, 1996). *RAD51* pourrait donc intervenir à la fois dans la réparation des cassures d'ADN double brin et dans les recombinaisons lors de la commutation d'isotypes des gènes d'Ig.

III- LES LYMPHOMES-NON-HODGKINIENS

III.1 Classification

Les cellules tumorales dérivent de cellules normales qui ont subi une série d'altérations génétiques irréversibles. Le résultat final de ces processus est celui d'une cellule capable de proliférer indéfiniment et d'échapper aux mécanismes de contrôle physiologique. En général, les cellules cancéreuses gardent quelques caractéristiques morphologiques et/ou phénotypiques des cellules normales dont elles dérivent.

Les lymphomes-non-Hodgkiniens (LNH) constituent un ensemble hétérogène de tumeurs du tissu lymphoïde. Cette diversité provient des multiples fonctions des cellules lymphoïdes et

des processus complexes de leur différenciation. Cette hétérogénéité tant au plan clinique, que cytologique ou immunologique explique l'existence de plusieurs classifications différentes :

(i) la première classification établie est celle de Rappaport, plutôt descriptive, basée sur les caractéristiques histologiques et cytologiques des cellules tumorales,

(ii) la classification de Kiel-Lennert, qui relie les différents groupes de lymphomes à leur équivalent normal dans le système lymphoïde dont ils émergent,

(iii) la *Working Formulation* qui repose sur des critères morphologiques et cliniques, elle regroupe les lymphomes selon leur historique, leur réponse à la thérapie et leur survie globale,

(iv) la REAL classification (*Revised European American Lymphoma*) qui a été récemment élaborée en tenant compte à la fois des critères morphologiques, immunologiques et génétiques (Harris *et al.*, 1994).

La REAL classification distingue 3 grandes classes de lymphomes : les lymphomes de la lignée B, ceux de la lignée T et la maladie de Hodgkin. (pour les lymphomes B, voir tableau 1, p 23 d'après Hiddeman *et al.*, 1996).

Selon des études effectuées aux USA, l'incidence des LNH est en augmentation constante d'environ 3 à 4 % par an depuis les années 70, plus rapidement que les autres cancers à l'exception des mélanomes et du cancer du poumon chez les femmes (Devesa et Fears, 1992). Cette augmentation touche principalement les sujets âgés et les habitants des zones rurales ainsi que les sujets de 25-44 ans chez qui elle est liée aux LNH associés au SIDA. Cette augmentation provient en partie d'un meilleur diagnostic, de la survie plus longue des sujets et de facteurs environnementaux (Devesa et Fears, 1992).

| Kiel Classification <i>Low-Grade Lymphomas</i> | Working Formulation <i>Low-Grade Lymphomas</i> | REAL Classification |
|--|---|---|
| B-cell chronic lymphocytic leukemia | Small lymphocytic L. consistent with CLL | B-cell chronic lymphocytic leukemia |
| B-cell prolymphocytic leukemia | | |
| Lymphoplasmacytoid Immunocytoma | Lymphoplasmacytoid L./immunocytoma | Small lymphocytic L. |
| | | B-cell prolymphocytic leukemia |
| Lymphoplasmacytoid Immunocytoma | Small lymphocytic, plasmacytoid L. | Lymphoplasmacytoid L. |
| | Small lymphocytic L. | |
| Monocytoid L., including marginal zone | Small lymphocytic L. | Extranodal marginal zone B-cell L. Nodal marginal zone B-cell L. |
| | Small lymphocytic L. | Splenic marginal zone B-cell L. |
| Hairy cell leukemia | | Hairy cell leukemia |
| Plasmacytic L. | Plasmacytoma | Plasmacytoma/Myeloma |
| Centrobastic/centrocytic L., follicular | Follicular L. predominantly small cleaved cell | Follicle center L., follicular, grade I |
| Centrobastic/centrocytic L., follicular | Follicular L. mixed small and large cell | Follicle center L., follicular, grade II |
| | <i>Intermediate-Grade Lymphomas</i> ----- | |
| Centrobastic L. , follicular | Follicular L. predominantly large cell | Follicle center L., follicular, grade III |
| Centrobastic/centrocytic L., diffuse | Diffuse L. small cleaved cell Diffuse, mixed small and large cell L. | Follicle center L., diffuse, small cell |
| Centrocytic L. | Diffuse L. small cleaved cell | Mantle cell L. |
| | <i>High-Grade Lymphomas</i> ----- | |
| Centroblastic L. | Diffuse, large cell L. | Diffuse, large B cell L. |
| | <i>High-Grade Lymphomas</i> ----- | |
| B-immunoblastic L. | Diffuse large cell immunoblastic L. | Diffuse large B cell L. |
| B-large cell anaplastic L.(Ki-1 ⁺) | Diffuse large cell immunoblastic L. | Diffuse large B cell L. |
| Burkitt's L. | Small non-clived, Burkitt's L. | Burkitt's L. |
| | Small non-clived, non-Burkitt's L. | High grade B-cell L., Burkitt-like |
| Lymphoblastic L. | Lymphoblastic L. | B-precursor lymphoblastic L. |

Tableau 1 : Résumé des principales classifications des LNH de la lignée B. D'après Hiddemann *et al.*, 1996.

La plupart des LNH sont caractérisés par des anomalies chromosomiques multiples et plus complexes que celles observées dans les leucémies, avec souvent des anomalies de nombre et de structure. Une étude américaine sur 434 cas de LNH, sur une période de 5 ans, a permis de corréler un certain nombre d'anomalies chromosomiques récurrentes avec le type histologique, le grade et la transformation des LNH (Offit *et al.*, 1991). Les translocations récurrentes les plus fréquentes sont les suivantes : t(14;18)(q32;q21) (29%), t(8;14)(q24;q32) (14,7%), t(11;14)(q13;q32) (3%), suivies des translocations t(3;22)(q27;q11) (2,8%) et t(2;5)(q23;q35) (1%) et enfin la t(1;6)(q21;q25) (0,7%) (Offit *et al.*, 1991). Elles impliquent le plus souvent les gènes d'Ig (IGH en 14q32, IGL en 22q11) et les oncogènes *BCL2* en 18q21, *MYC* en 8q24, *CCND1* en 11q13, *LAZ3/BCL6* en 3q27, *NPM* (nucléophosmine) en 5q35 et *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*) en 2p23. D'autres aberrations chromosomiques récurrentes, distinctes des translocations, ont été également observées. Il s'agit d'anomalies structurales et numériques telles que les anomalies en 1q21-23 (17%), les cassures en 6q21-25 (14%), 1p32-36 (13%) et les trisomies 7 et 12 dans plus de 10% des cas (Offit *et al.*, 1991). Il existe une corrélation entre certaines anomalies : par exemple la trisomie 18 est associée à la trisomie 3. Il n'existe pas de différence significative entre les 5 anomalies chromosomiques citées plus haut et le degré de malignité des tumeurs. En revanche, certaines translocations réciproques sont associées avec le grade de la tumeur : la translocation t(14;18) est présente dans 17,7% des lymphomes de grade intermédiaire et de haut grade contre 54,6% dans ceux de bas grade (Offit *et al.*, 1991).

Selon une étude plus récente, la probabilité d'acquérir de nouvelles anomalies chromosomiques est identique quelque soit la malignité du lymphome et l'acquisition d'anomalies progresse avec l'agressivité de la maladie. Chez les patients porteurs d'une t(14;18), les anomalies les plus courantes acquises entre la phase précoce et tardive de la maladie sont la trisomie 7 et der(18) (Whang-Peng *et al.*, 1995). Chez les patients sans t(14;18), une délétion en 6q présente en phase précoce ou tardive est associée à une survie plus courte. Les anomalies secondaires observées sur l'ensemble de ces patients sont associées à une faible survie mais sont plus fréquentes chez les patients avec t(14;18) (19/22 contre 11/21). Les anomalies du chromosome 1 sont détectées dans près de 50% des cas, avec une prédominance de cassures en 1q21-22 et 1p36 (Whang-Peng *et al.*, 1995).

Une autre étude s'est plus particulièrement intéressée aux types d'anomalies secondaires et leur fréquence afin d'établir leur corrélation avec les anomalies primaires, le sous-type morphologique et le degré de malignité des LNH (Johansson *et al.*, 1995). Les anomalies secondaires qui surviennent (addition ou perte de chromosomes, duplication et délétion) sont le

plus souvent +X, -Y, dup(1q), del(6q), +7 et +12. L'incidence de ces anomalies varie entre les lymphomes B et T (78% contre 55%) mais également au sein de sous-groupes porteurs d'une même anomalie primaire ou de sous-groupes histologiques (Johansson *et al.*, 1995). Il apparaît que le type d'anomalies secondaires est semblable au sein d'un sous-groupe de LNH porteur d'une même anomalie primaire suggérant que celle-ci déterminerait les événements secondaires. Leur étude est donc d'un intérêt clinique évident car elles sont associées à la progression de la malignité (Johansson *et al.*, 1995).

III.2 Les lymphomes dérivés des centres germinatifs chez l'Homme.

Parmi les lymphomes à cellules B, les lymphomes dérivés des centres germinatifs nous intéressent plus particulièrement.

Les cellules B néoplasiques expriment divers marqueurs de surface B spécifiques ce qui permet de les classer et d'identifier leurs cellules précurseurs. Ceci est particulièrement vérifié pour les lymphomes dérivés des centres germinatifs dont les cellules ressemblent aux cellules lymphoïdes normales dont elles dérivent. Ces lymphomes dérivent de cellules B qui ont subi le réarrangement des gènes des chaînes lourdes et légères d'Ig. L'analyse de l'expression des Ig de surface des lymphomes folliculaires montre que plus de 50% expriment des IgM et peu d'IgD. La fréquence observée de la commutation de classe des gènes des chaînes lourdes d'Ig tend à prouver que l'origine de ces cellules est bien le centre germinatif (Tsiagbe *et al.*, 1996). Comme son nom l'indique, le lymphome centrofolliculaire (FCL : *follicular center cells lymphoma*) est composé de cellules du centre du follicule, mélange de centrocytes et centroblastes (voir chapitre IV). On distingue les lymphomes à petites cellules (avec moins de 25% de centroblastes), les lymphomes mixtes (mélange de cellules) et les lymphomes à grandes cellules (avec plus de 50% de centroblastes). Le FCL atteint préférentiellement les adultes et constitue près de 40% des LNH aux USA) (Harris *et al.*, 1994; Tsiagbe *et al.*, 1996).

L'analyse de la séquence des régions variables des gènes d'Ig des cellules de lymphome diffus à grande cellules a montré la présence de mutations somatiques dans tous les gènes VH et Vλ (Küppers *et al.*, 1997). Ces mutations sont caractéristiques du processus d'hypermutation somatique qui a lieu dans les centres germinatifs (CG) et identifie les cellules des CG et leurs descendants comme les précurseurs des clones B malins (Küppers *et al.*, 1997; voir chapitre IV).

D'autres critères de distinction interviennent également pour classer les lymphomes puisque la plupart sont associés à la présence de translocations chromosomiques caractéristiques.

70 à 95% des cellules des lymphomes centrofolliculaires présentent une translocation t(14;18) (q32;q21) impliquant le gène *BCL-2* et le locus des chaînes lourdes d'Ig. Cette translocation a lieu à un stade précoce du développement des cellules B, pendant le réarrangement des Ig (Harris *et al.*, 1994). Cette anomalie aboutit à la dérégulation du gène *BCL-2* conduisant à une surexpression de sa protéine. *BCL-2* est impliquée dans les processus de survie de la cellule; sa propriété anti-apoptotique pourrait permettre la survie des cellules néoplasiques ainsi que le développement du lymphome folliculaire. En effet, l'expression de *BCL-2* est régulée négativement dans les cellules normales des centres germinatifs contrairement aux cellules B et T quiescentes, aux cellules du lymphome folliculaire à petites cellules clivées et à la grande majorité des cellules du lymphome diffus à grandes cellules qui surexpriment *BCL-2* (Tsiagbe *et al.*, 1996). Etant donné que *BCL-2* n'a pas de propriété transformante proprement dite, la transformation de ces cellules nécessite d'autres altérations génétiques. Notamment, le passage des lymphomes de bas grade à haut grade est associé à la perte de fonction du gène *P53* (Kluin *et al.*, 1997). La transformation peut aussi se produire après acquisition d'une translocation supplémentaire comme la t(8;14) qui juxtapose le gène *MYC* avec les régions régulatrices des gènes des chaînes lourdes d'Ig. D'autres translocations, impliquant le gène *LAZ3/BCL6* en 3q27, sont observées dans environ 40% des lymphomes diffus et dans 5 à 10% des lymphomes folliculaires. La protéine *LAZ3/BCL6* est notamment fortement exprimée dans les centres germinatifs et apparaît comme primordiale pour leur formation. Ceci laisse supposer un rôle important de ce gène dans le processus de transformation des lymphomes dérivant des centres germinatifs (Tsiagbe *et al.*, 1996; Kluin *et al.*, 1997).

III.3 Les gènes impliqués dans les lymphomes B

Comme les autres hémopathies malignes, les LNH sont porteurs d'anomalies génétiques acquises. La majorité d'entre elles concernent les gènes d'Ig et les oncogènes *MYC* en 8q24, *BCL2* en 18q21 ou *CCND1* en 11q23, les plus fréquemment touchés.

III.2.1 Le gène *MYC*

Le lymphome de Burkitt est caractérisé par la présence de la translocation t(8;14)(q24;q32), la plus fréquente ou de deux translocations variantes : t(2;8)(p12;q24) et t(8;22)(q24;q11). Parallèlement à la caractérisation de ces translocations, les gènes d'Ig ont été localisés en 14q32 pour les gènes des chaînes lourdes, en 2p12 pour les gènes des chaînes légères

κ et en 22q11 pour les gènes des chaînes légères λ . L'hypothèse que ces trois translocations impliquaient le même gène en 8q24 a été confirmée par leur clonage qui a démontré que ce gène était *MYC* (homologue de l'oncogène viral *v-myc*) (Croce, 1991). Après translocation, le gène *MYC* se trouve sous le contrôle des séquences *enhancers* des Ig. Il s'agit du premier exemple de facteur de transcription activé par translocation chromosomique. La protéine MYC est un facteur de transcription à motifs bHLH (*basic/helix-loop-helix*) et *leucine zipper* (LZ), capable de se fixer spécifiquement sur les séquences d'ADN de type CAC(A/G)TG. MYC forme des hétérodimères avec MAX, une autre protéine à bHLH/LZ qui elle-même se fixe à l'ADN et aux protéines MAD, Mnt ou Mxi-1. Seuls les hétérodimères MYC-MAX sont transcriptionnellement actifs (pour revue, Henricksson et Lüscher, 1996). La protéine MYC est impliquée dans des processus cellulaires aussi variés que la prolifération, l'apoptose et la différenciation. Elle favorise la progression du cycle cellulaire après une stimulation mitogène ou conduit les cellules vers l'apoptose si le milieu s'appauvrit par exemple en sérum. L'activation de *MYC* par translocation chromosomique provoque une surproduction de sa protéine. Cette surabondance perturbe l'équilibre entre les différents hétérodimères pouvant se former et modifie l'expression de ses gènes cibles, favorisant ainsi la transformation maligne des cellules (Henricksson et Lüscher, 1996). Il est intéressant de noter à ce sujet que plusieurs des gènes cibles de *MYC* sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ou de la synthèse protéique. MYC active le gène *ODC* (ornithine décarboxylase) et les gènes de la prothymosine α , du facteur eIF-4E, et *cdc25A* par la reconnaissance de sa séquence cible. MYC réprime le gène de la cycline D1 et les gènes *C/EBP α* , *GADD45* mais les mécanismes mis en jeu sont peu connus (Henricksson et Lüscher, 1996). Le clonage récent d'un autre partenaire de MYC appelé MIZ-1 (*MYC interacting Zinc finger protein 1*) pourrait apporter de nouveaux éléments (Peukert *et al.*, 1997). MYZ-1 est un facteur de transcription à doigt de zinc de la famille BTB/POZ qui active la transcription du gène de la cycline D1 et du promoteur majeur tardif de l'adénovirus. Il serait impliqué dans l'arrêt de la croissance des cellules. MYC en interagissant avec MIZ-1 bloque l'activité de ce dernier (Peukert *et al.*, 1997).

III.2.2 Le gène *BCL2*

Le clonage de la translocation t(14;18)(q32;q21) associée au lymphome folliculaire a permis d'identifier en 1984, le gène impliqué sur le chromosome 18 qui a été nommé *BCL-2*

pour *B cell leukemia/lymphoma 2*, par analogie avec le locus BCL-1 impliqué dans la t(11;14) mais dont le gène n'avait pas encore été cloné (Tsujimoto *et al.*, 1984).

La protéine BCL-2 n'est pas un facteur de transcription mais le chef de file d'une famille de protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose (Korsmeyer *et al.*, 1992). BCL-2 protège les cellules de la mort cellulaire programmée, processus qui intervient notamment dans la sélection des lymphocytes T dans le thymus et des lymphocytes B dans les centres germinatifs. La translocation t(14;18) qui juxtapose la région de jonction des IgH au gène *BCL-2* induit l'expression constitutive de celui-ci. Les cellules B normales du follicule non sélectionnées ont une diminution d'expression de *BCL-2* et meurent par apoptose. Les centrocytes porteurs de la t(14;18) continuent d'exprimer *BCL-2* et sont donc protégés. Il semble qu'ensuite un deuxième événement soit nécessaire à la transformation maligne des cellules. En effet, les souris transgéniques BCL-2 (donc surexprimant le gène *BCL-2*) ne développent un lymphome qu'après une longue période de latence (McDonnell *et al.*, 1989). Les altérations supplémentaires requises à la transformation peuvent consister en l'acquisition d'une translocation t(8;14), la mutation de P53 ou l'altération du gène *LAZ3/BCL6* (Korsmeyer *et al.*, 1992; Kluin *et al.*, 1997).

La protéine BCL-2 est localisée principalement sur la membrane externe de la mitochondrie, mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire. Sa localisation dans la mitochondrie supposait un rôle dans les processus de phosphorylation oxydative, le transport d'électrons de protéines ou d'ions. La fonction précise de BCL-2 n'a été élucidée que récemment grâce à l'étude de la structure tridimensionnelle de BCL-X_L, un membre de la famille BCL-2. Il apparaît que BCL-X_L présente des homologies structurales avec des toxines bactériennes (toxine diphtérique) qui forment des canaux pour les ions et /ou les protéines. BCL-2 est capable *in vitro* de former ce type de canaux et pourrait effectivement participer à des processus impliqués dans l'apoptose tels que la régulation de la perméabilité de la membrane mitochondriale et le passage vers le cytoplasme de facteurs apoptotiques (Reed *et al.*, 1997; Schendel *et al.*, 1997).

III.2.3 Le gène *CCND1*

La grande majorité des lymphomes des cellules du manteau est caractérisée par la translocation t(11;14)(q13;q32). Plusieurs points de cassure ont été clonés en 1984 et ont été localisés en 11q13, région qui a été appelée BCL-1 (*B cell leukemia/lymphoma 1*) (Tsujimoto *et al.*, 1984). Le point de cassure sur le chromosome 14 est situé dans la région de jonction des IgH,

structure qui rappelle les translocations t(14;18) et t(8;14) mais la dispersion des points de cassure en 11q13 n'a pas permis d'identifier le gène à proximité. Un gène a été cloné à partir d'une inversion du chromosome 11, inv(11)(p15;q13), dans les tumeurs de la parathyroïde d'où son nom : *PRAD1* (*parathyroid adenomatosis 1*) (Arnold *et al.*, 1989; pour revue Raffeld et Jaffe, 1991). Le gène *PRAD1/BCL-1/CCND1* est en fait le gène de la cycline D1 (Motokura *et al.*, 1991; Komatsu *et al.*, 1994). Les cyclines D1, D2 et D3 jouent un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire, en particulier au niveau de la transition des phases G1-S. La cycline D1 forme un complexe avec CDK 4 ou 6, stimule la phosphorylation de RB qui est nécessaire à la transition G1-S. Cette phosphorylation est régulée négativement par des inhibiteurs de cycline kinase (p16, p21). Rb non phosphorylée se lie aux facteurs de transcription E2F et bloque la transcription de leurs gènes cibles (notamment des gènes de la réplication de l'ADN) (Sherr *et al.*, 1994; Hunter *et al.*, 1994).

Généralement, les cellules lymphoïdes normales expriment les cyclines D2 et D3 mais pas ou peu la cycline D1. L'expression constitutive de *CCND1* suite à la translocation t(11;14)(q13;q32) dans les lymphocytes B, au stade de maturation (cellules du manteau), pourrait leur donner un avantage prolifératif par rapport aux cellules normales et ce en favorisant la progression du cycle cellulaire. La translocation t(11;14) est aussi associée à une forme atypique de leucémie lymphocytaire chronique et au myélome multiple. La cycline D1 est aussi surexprimée dans certains carcinomes par amplification génique (Hall et Peters, 1996). Dans le lymphome à cellules du manteau, des anomalies additionnelles peuvent survenir comme les mutations de P53 et les délétions de p16 (Kluin *et al.*, 1997).

IV - LE GÈNE *LAZ3/BCL6*

IV.1 Clonage du point de cassure de la région 3q27 et découverte d'un nouveau gène

L'existence d'une nouvelle translocation, la t(3;22), associée aux LNH diffus décrite par Offit *et al.* en 1989 a incité l'équipe de C. Bastard à rechercher une éventuelle translocation entre la région 3q27 et les gènes d'Ig. L'analyse rétrospective d'une série de 319 patients a permis d'identifier chez 15 patients : une translocation principale télomérique, entre les chromosomes 3 et 14 impliquant la région 3q27 et les gènes des chaînes lourdes d'Ig, ainsi que deux translocations variantes t(3;22) et t(2;3), impliquant les gènes des chaînes légères dans respectivement 3 et 2 cas (Bastard *et al.*, 1992). Dans 23 autres cas, des réarrangements

chromosomiques ont aussi été mis en évidence entre la région 3q27 et divers chromosomes (Bastard *et al.*, 1992). Les translocations impliquant la région 3q27 rappelaient celles de la région 8q24 impliquant le gène *MYC* dans le lymphome de Burkitt et laissaient suspecter l'existence d'un nouvel oncogène en 3q27. L'analyse par la technique de Southern d'une tumeur montrait une bande réarrangée avec une sonde J_H (région de jonction du locus des chaînes lourdes d'Ig). Le criblage d'une banque génomique réalisée à partir de ce même ADN a permis le clonage du point de cassure de la translocation t(3;14), de la région correspondante du chromosome 3 normal et d'étudier l'ADN de 15 autres patients porteurs de réarrangements en 3q27 (Deweindt *et al.*, 1993). Il s'est avéré que ces translocations sont préférentiellement localisées (dans 13 cas sur 15) dans une région de 10 kb (initialement) qui a été appelée M.T.C. pour *Major Translocation Cluster* (Deweindt *et al.*, 1993). Simultanément, deux groupes américains obtenaient des résultats similaires à partir de la translocation t(3;14)(q27;q32) (Baron *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 1993a). Dans les trois cas, les points de cassure sont localisés dans la région « *switch* » du locus des Ig en 14q32 et dans une région de quelques kb en 3q27. Les deux équipes américaines baptisent le locus en 3q27 *bcl-6* pour « *B cell lymphoma 6* » et rapportent également l'existence de transcrits issus de ce locus de 11 kb d'une part (Baron *et al.*, 1993) et de 2,4 et 4,4 kb d'autre part (Ye *et al.*, 1993a).

L'ensemble de ces résultats a amené au clonage du nouveau gène localisé en 3q27 par l'équipe de J.P. Kerckaert et baptisé *LAZ3* pour « *lymphoma-associated zinc-finger gene on chromosome 3* » (Kerckaert *et al.*, 1993). Peu après, les travaux d'un groupe américain confirmaient ces résultats et rapportaient le clonage d'un nouveau gène en 3q27 appelé *BCL-6* pour « *B cell lymphoma gene 6* », identique à *LAZ3* (Ye *et al.*, 1993b). Cette étude montre également une troncature du gène dans 33% des lymphomes diffus à grandes cellules (DLCL). Ce pourcentage place ce gène et ses anomalies au premier rang dans ce type de pathologie devant celles des gènes *MYC* et *BCL-2* (Ye *et al.*, 1993b). Quelques mois plus tard, une équipe japonaise rapportait le clonage du point de cassure des translocations en 3q27 à partir d'une t(3;22) et le clonage du gène *BCL-5* qui s'est avéré identique à *LAZ3/BCL6* (Miki *et al.*, 1994 a & b). (le gène sera nommé *LAZ3* dans le texte pour faciliter la lecture).

IV.2 Les réarrangements du gène *LAZ3/BCL6*

IV.2.1 Implications dans les Lymphomes-non-Hodgkinien

Les réarrangements du gène *LAZ3* ont été recherchés par l'équipe de Dalla Favera par la technique de Southern dans de plus larges panels de patients (Lo Coco *et al.*, 1994). Ils sont détectés dans 35,5% des cas de lymphome diffus à composante de grandes cellules (DLCL pour *diffuse lymphoma with a large cell component*), dans 45% des cas de lymphome diffus à grandes cellules (DLCL pour *diffuse large B cell lymphoma*), dans 10% des cas de lymphome mixte à petites et grandes cellules ainsi que dans 6,4% des cas de lymphome folliculaire (Lo Coco *et al.*, 1994). Les réarrangements du gène *LAZ3* sont également détectés dans les LNH associés au SIDA, plus spécifiquement dans 20% des DLCL, ce qui constitue la première lésion génétique caractéristique de cette pathologie (Gaidano *et al.*, 1994). Une étude sur 102 cas de DLCL présente les réarrangements du gène *LAZ3* comme facteur pronostique favorable de survie (Offit *et al.*, 1994). Toutefois, ces résultats ne sont pas corroborés pour le moment par d'autres équipes. Au contraire, l'étude de C. Bastard, réalisée sur 217 patients, montre qu'il n'existe pas de corrélation significative entre les réarrangements du gène *LAZ3* et l'évolution clinique des pathologies concernées (lymphomes folliculaires ou lymphomes agressifs) (Bastard *et al.*, 1994). La survie globale des patients atteint d'un lymphome agressif et présentant un réarrangement du gène *LAZ3* apparaît meilleure que celle des patients sans réarrangement de ce gène. Cette différence n'est toutefois pas significative (Bastard *et al.*, 1994). En revanche, les résultats statistiques de cette étude ne sont que légèrement différents de celle de Lo Coco *et al.*, puisqu'ils montrent que *LAZ3* est impliqué dans près de 20% de tous les types de lymphomes à l'exception des lymphomes lymphocytiques, lymphoblastiques et de Burkitt, avec une fréquence de 37% dans les lymphomes B agressifs (DLCL) et 13% dans les lymphomes folliculaires (FL) (Bastard *et al.*, 1994) contre 45% des DLCL et 6,4% des FL (Lo Coco *et al.*, 1994).

L'étude de C. Bastard a également montré que les anomalies en 3q27 ne sont pas systématiquement associées au réarrangement du gène *LAZ3*. En effet, sur 32 patients présentant des anomalies en 3q27, 11 n'ont pas de réarrangement dans le MTC, ce qui suppose que ces réarrangements ont lieu soit, au niveau d'un gène inconnu très proche soit, plus probablement, en dehors de la région MTC du gène *LAZ3* (Bastard *et al.*, 1994). Un nouveau point de cassure situé environ 150 Kb en 5' du gène *LAZ3* vient d'être identifié à partir d'une t(3;14)(q27;q32) (Butler *et al.*, 1997). Inversement, sur 39 patients porteurs d'un réarrangement du gène *LAZ3*, 18 n'ont pas d'anomalie cytogénétique visible en 3q27 (Bastard *et al.*, 1994). Ceci laisse supposer que la fréquence de ces réarrangements est sous-estimée par l'analyse cytogénétique conventionnelle. Sur 32 cas de patients avec anomalie cytogénétique visible en 3q27, 14 patients étaient porteurs d'un réarrangement de la région 3q27 impliquant d'autres régions que celles codant les gènes d'Ig (Bastard *et al.*, 1994). Les techniques récentes de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*)

et de CGH (*Comparative Genomic in situ Hybridization*) vont permettre de mieux évaluer la fréquence des réarrangements du gène *LAZ3* dans les LNH (Roumier *et al.*, 1997).

Une autre étude sur 170 patients rapporte des réarrangements du gène *LAZ3* dans 28,6% des lymphomes diffus agressifs (résultat inférieur à C. Bastard et Lo Coco), dans 17,3% des lymphomes folliculaires transformés et dans 14,3% des lymphomes folliculaires (Otzuki *et al.*, 1995). En revanche, aucun réarrangement n'est observé dans les lymphomes à cellules du manteau ou dans les lymphomes à petites cellules non clivées (Otzuki *et al.*, 1995). En plus d'une étude des réarrangements du gène *LAZ3* par la technique de Southern, une analyse de l'expression du gène par Northern blot n'a pas permis d'établir de corrélation entre l'expression et le réarrangement du gène *LAZ3* puisque les niveaux d'expression et la taille des transcrits sont équivalents dans les cas avec ou sans réarrangement du gène (Otzuki *et al.*, 1995).

IV.2.2 Translocation du gène *LAZ3/BCL6* avec les gènes d'immunoglobulines

Quand les partenaires de translocation du gène *LAZ3* sont les gènes d'Ig, Ye *et al.*, 1995 ont montré qu'il est privé de ses séquences régulatrices et est placé sous contrôle de promoteurs ou enhancers d'Ig. En effet, dans une lignée cellulaire et dans deux cas de DLCL porteurs d'une translocation t(3;14)(q27;q32), impliquant les gènes des chaînes lourdes d'Ig, les points de cassure ont été localisés entre la région « *switch* » (commutation) des IgH et le premier intron du gène *LAZ3*. Le résultat de cette translocation est la juxtaposition d'une partie du locus des IgH en amont de la séquence codante du gène *LAZ3*, et ce dans la même orientation transcriptionnelle. Cette configuration permet la transcription de transcrits chimériques *Ig-LAZ3* à partir des séquences promotrices des gènes d'Ig (I μ et I γ 3). La séquence codante du gène *LAZ3* étant préservée, la protéine produite est donc normale (Ye *et al.*, 1995). Dans la lignée tumorale étudiée, seul l'allèle porteur de la translocation t(3;14) est transcrit, l'allèle normal restant silencieux. Ce résultat semble indiquer que la conséquence de cette translocation est de faire exprimer le gène *LAZ3* normalement éteint (Ye *et al.*, 1995). La confirmation de ce résultat pour les autres translocations et sur d'autres lignées et patients reste cependant indispensable.

L'existence de transcrits de fusion entre le gène *LAZ3* et les gènes d'Ig ont permis de rechercher d'autres transcrits par les techniques de RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) ou RACE (*Rapid Amplification of C-DNA Ends*) et d'identifier d'autres gènes partenaires du gène *LAZ3* dans les translocations.

IV.2.3 Translocation du gène *LAZ3/BCL6* avec d'autres gènes

Les réarrangements du gène *LAZ3* impliquent aussi d'autres régions que celles codant les gènes d'Ig. Leur clonage a permis d'identifier d'autres partenaires du gène *LAZ3* tels que le gène *RHO H/TTF* en 4p13 codant une petite protéine G dont l'expression est spécifique des cellules hématologiques (Dallery *et al.*, 1995 & 1997) et le gène *TTE/BOB/OBF1* en 11q23 codant un coactivateur des facteurs de transcription OCT1 et OCT2, spécifique des cellules B (Gstaiger *et al.*, 1995; Strubin *et al.*, 1995; Galiègue-Zouitina *et al.*, 1996). Plus récemment, un nouveau gène des Histones H4 a été identifié en 6p21 à partir de la translocation t(3;6)(q27;p21) (Akasaka *et al.*, 1997). L'ensemble de ces réarrangements chromosomiques place le gène *LAZ3* sous le contrôle d'autres promoteurs et aboutit à la formation de transcrits de fusion. Ainsi, la translocation t(3;4)(q27;p13) place le gène *LAZ3* sous le contrôle des séquences régulatrices du gène *RHO H*, ce qui permet la transcription en un ARN qui comprend le premier exon de *RHO H/TTF* suivi des exons 2, 3 et suivants de *LAZ3* (figure 3, p 37) (Dallery *et al.*, 1995). De même, la translocation t(3;11)(q27;q23) produit un transcrit de fusion contenant le premier exon du gène *BOB1* épissé avec les exons 2, 3 et suivants du gène *LAZ3* (Galiègue-Zouitina *et al.*, 1996). Le même processus aboutit à la fusion de l'unique exon du nouveau gène de l'histone H4 aux exons 2 et suivants du gène *LAZ3* (Akasaka *et al.*, 1997). Dans les deux premiers cas, la protéine produite est la protéine *LAZ3* normale puisque le site d'initiation de la traduction utilisé est situé dans l'exon 3 du gène *LAZ3* et qu'il existe en 5' des codons stop empêchant une fusion de cadre de lecture.

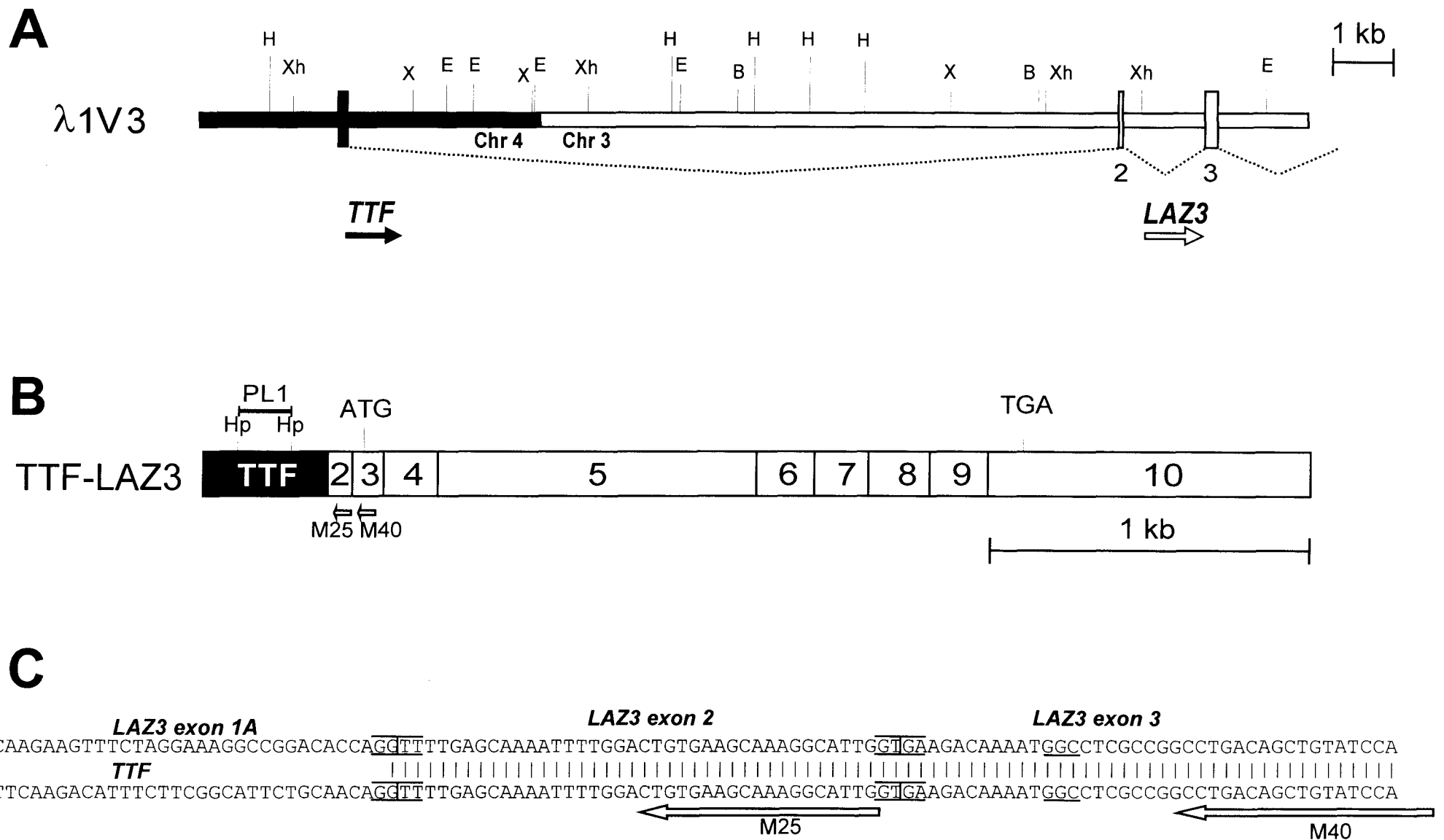


Figure 3: (A) Carte de restriction de la région du point de cassure de la t(3;4). (B) Représentation schématique du transcrit de fusion TTF/LAZ3. TTF est aussi appelé RHO H. (C) Alignement de la séquence des trois premiers exons de LAZ3 et la séquence du transcrit de fusion TTF/LAZ3 montrant la jonction d'épissage entre l'exon 1 de TTF et l'exon 2 de LAZ3. Les sites d'épissage sont représentés par des crochets.

IV.2.4 Autres types de réarrangements du gène *LAZ3/BCL6*

Hormis les translocations chromosomiques, l'existence d'autres altérations du gène *LAZ3* par des mutations ponctuelles et /ou de petites délétions ont été mises en évidence (Migliazza *et al.*, 1995). Ces mutations, souvent bialléliques, sont retrouvées dans 73% des DLCL et 47% des cas de lymphome folliculaire. Elles sont principalement concentrées dans une région du MTC proche du premier exon non codant appelée « *major cluster* ». Ces mutations sont d'origine somatique et leur présence est indépendante de celle de translocations chromosomiques impliquant le gène *LAZ3* (Migliazza *et al.*, 1995). Une étude japonaise rapporte également dans 7 cas de LNH sur 35, des réarrangements bialléliques incluant des délétions dans le MTC (Nakamura *et al.*, 1995). De plus, cette étude semble indiquer que les doubles réarrangements du gène *LAZ3* sont de mauvais pronostic. L'existence d'une délétion de 1,5 kb dans cette même région sur l'allèle non réarrangé d'un patient avec une translocation t(3;22) a été publiée (Nakamura *et al.*, 1996). Plus récemment, des mutations ont aussi été identifiées dans 58% des LNH liés au SIDA avec une prédominance pour les lymphomes de Burkitt et les DLCL (Gaidano *et al.*, 1997). Elles touchent la même région 5' non codante du gène *LAZ3* et constitue l'altération génétique la plus fréquente des LNH liés au SIDA. Ces mutations interviennent indépendamment des mutations des gènes *MYC* et *P53* observées fréquemment dans ces pathologies (Gaidano *et al.*, 1997). L'incidence de ces mutations et délétions sur l'expression du gène *LAZ3* reste à établir. Cependant la fréquence et la localisation de ces altérations dans la région promotrice même du gène ou à proximité de celle-ci laisse supposer qu'elles modifient des séquences ayant un rôle dans la régulation de l'expression du gène *LAZ3* (Migliazza *et al.*, 1995; Gaidano *et al.*, 1997).

IV.3 Structure du gène *LAZ3* et de sa protéine:

Le gène *LAZ3* s'étend sur environ 26 Kpb et comprend 9 à 11 exons selon les auteurs (Kawamata *et al.*, 1994; Ye *et al.*, 1993b&1995, Kerckaert et coll., non publiés). Le codon d'initiation de la traduction se situe dans l'exon trois (figure 4, page 40). Son cadre ouvert de lecture comporte 2118 nucléotides qui code une protéine de masse attendue de 79 Kd, elle comporte six doigts de Zinc C₂H₂ de type *Krüppel* à son extrémité C-terminale (Kerckaert *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 1993b; Miki *et al.*, 1994) et une région conservée d'environ 120 acides aminés à son extrémité N-terminale. Cette région présente des homologies importantes avec plusieurs facteurs de transcription identifiés chez l'Homme comme KUP (Chardin *et al.*, 1991), chez la

Drosophile comme *tramtrack* (ttk) et *Broad Complex* (Br-c) (Harrison *et al.*, 1990; Di Bello *et al.*, 1991), mais aussi avec certaines protéines virales du groupe des Poxvirus (Koonin *et al.*, 1992). Cette région N-terminale constitue un domaine d'interaction entre protéines baptisé depuis **BTB/POZ** pour **B**road **C**omplex, *t***r**a**m**t**r**a**c**k, *b*r*i*c à *b*r*a*c/ **p**oxvirus and **z**inc finger et permet de regrouper dans une même famille plus de 50 protéines différentes telles que PLZF (*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*), codée par un oncogène impliqué dans les formes variantes de leucémies aiguës promyélocyaires (LAP) à t(11;17) chez l'Homme ou la protéine *kelch* de liaison à l'actine chez la Drosophile (Bardwell *et al.*, 1994; Zollman *et al.*, 1994; Albagli *et al.*, 1995). Le domaine BTB/POZ confère à la protéine LAZ3 une localisation nucléaire ponctuée et lui permet également d'homodimériser *in vivo* (Dhordain *et al.*, 1996; Seyfert *et al.*, 1996). Ce type de localisation est également partagée par d'autres protéines oncogènes telles que PLZF et PML qui co-localisent *in vivo* sous forme de corps nucléaires (Nbs: *Nuclear Bodies* ou PODs: *PML Oncogenic Domains*) et sont capables d'interagir *in vitro* et *in vivo* (Licht *et al.*, 1996; Koken *et al.*, 1997). Les protéines PML et PLZF-RAR α co-localisent aussi, contrairement à PML-RAR α (produit de la translocation t(15;17) dans la LAP) dont l'expression perturbe la formation des structures nucléaires microponctuées (Reid *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 1996). PLZF-RAR α et PML-RAR α se fixent sur les éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RAREs) sous la forme d'homo ou d'hétérodimères avec RXR. Dans le cas de PLZF-RAR α , cette capacité à dimériser provient du domaine BTB/POZ qui lui permet aussi de former des hétérodimères avec PLZF et sans doute d'autres protéines à BTB/POZ (Dong *et al.*, 1996).

L'ADNc murin homologue du gène *LAZ3* a été cloné et séquencé. Sa séquence déduite en acides aminés montre que la protéine présente 95% à 98% d'homologie avec son équivalent humain. Les doigts de zinc sont totalement identiques et le domaine BTB/POZ est presque entièrement conservé (Fukuda *et al.*, 1995; Allman *et al.*, 1996).

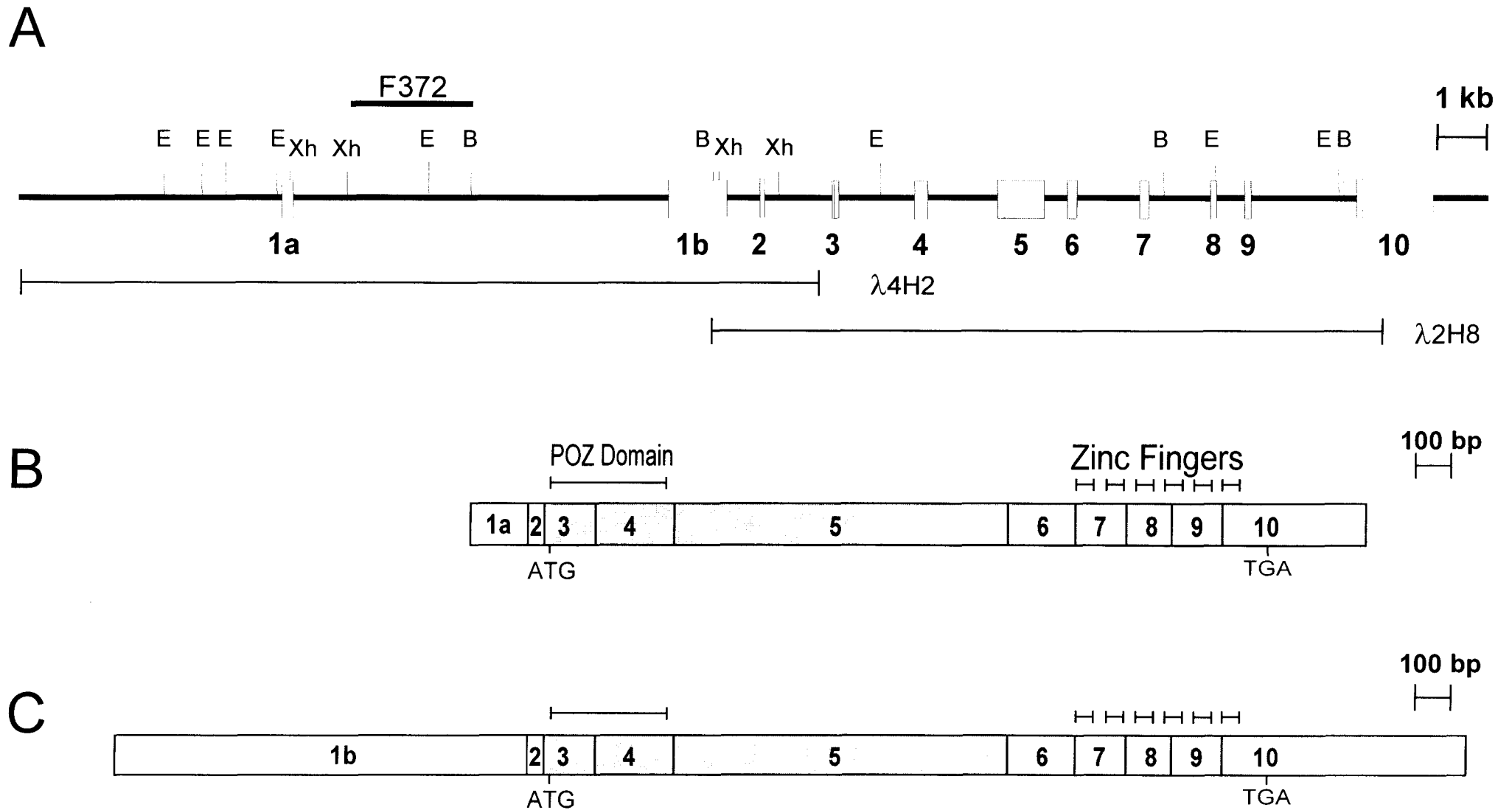


Figure 4: (A) Cartographie du gène LAZ3/BCL6. Les exons sont représentés par des rectangles. La séquence codante est en grisé.
 (B) Représentation schématique du transcrit LAZ3/BCL6 comportant l'exon 1A. Le domaine POZ d'interaction protéine/protéine et le domaine de fixation à l'ADN en doigts de zinc sont indiqués par des segments. ATG: codon d'initiation de la traduction. TGA: codon stop.
 (C) Représentation schématique du transcrit LAZ3/BCL6 comportant l'exon 1B.

IV.4 La protéine LAZ3/BCL6 est un répresseur transcriptionnel

La séquence d'ADN cible reconnue par la protéine LAZ3 a été définie *in vitro* par la technique de *CASTing* en utilisant une protéine de fusion contenant uniquement le domaine à doigts de zinc (Kawamata *et al.*, 1994; Baron *et al.*, 1995; Seyfert *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1996). La capacité de la protéine entière à reconnaître cette séquence *in vitro* et *in vivo* a été vérifiée (Albagli *et al.*, 1995; Seyfert *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1996). Les consensus obtenus par les différentes équipes sont assez similaires sans être tout à fait superposables (figure 5, page 43). Ils ont permis d'identifier d'éventuels gènes cibles de la protéine LAZ3 tels que les gènes de la glucokinase, de la dystrophine, de la « *secretory leukocyte protease inhibitor* » (Kawamata *et al.*, 1994), certains gènes et *enhancers* viraux dont celui du virus VIH (Baron *et al.*, 1995) et le gène *LAZ3* lui-même (Ohashi *et al.*, 1995; Migliazza *et al.*, 97). Les études *in vivo* par transfection transitoire ont permis la mise en évidence de la fonction de la protéine LAZ3 en tant que répresseur transcriptionnel sur sa séquence cible (Albagli *et al.*, 1995; Seyfert *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1996). Les degrés de répression obtenus sont variables selon le type de lignées et de constructions utilisées : la protéine entière réprime de 2 à 3 fois la transcription dans les lignées C2, COS-1, NIH3T3 (Albagli *et al.*, 1995), HeLa et CV-1 (Seyfert *et al.*, 1996), jusqu'à environ 10 fois et 23 fois dans les lignées 393T et Raji respectivement (Seyfert *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1996). La propriété de répresseur transcriptionnel de la protéine LAZ3 est indépendante de la position (5' ou 3'), de l'orientation et de la distance de sa séquence cible, quelque soit le type de promoteurs utilisés (Albagli *et al.*, 1995&1996; Seyfert *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1996). Cette propriété est principalement, mais pas uniquement, dépendante du domaine BTB/POZ qui apparaît comme un domaine répresseur autonome et transférable (Albagli *et al.*, 1995; Seyfert *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1996). Un deuxième domaine répresseur a été localisé dans la partie centrale de la protéine (AA 267-395) (Chang *et al.*, 1996; Albagli *et al.*, 1996). La propriété de répresseur transcriptionnel de la protéine n'est cependant pas conservée chez la levure (Seyfert *et al.*, 1996; Dhordain P. Com. Pers.). La protéine LAZ3 réprime la région U3 promotrice/enhancer du virus VIH-I par l'intermédiaire d'une séquence proche de celle déterminée précédemment par la même équipe (Baron *et al.*, 1997). Il reste à établir quels sont les autres gènes cibles de la protéine.

Il a été récemment remarqué que la séquence cible de LAZ3 ressemble aux sites reconnus par les facteurs STAT (*signal transducers and activators of transcription*) intervenant dans la réponse aux cytokines (Dent *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 1997). Des expériences de retard en gel et de transfection transitoire ont montré que la protéine LAZ3 est capable de se fixer sur la séquence

reconnue par Stat6 et de réprimer ces sites dans le promoteur du gène CD23, empêchant ainsi l'activation de ce gène par Stat6 en réponse à l'IL4. LAZ3 pourrait donc bloquer la voie signalétique de l'IL4 (Dent *et al.*, 1997).

Plusieurs autres protéines à domaine BTB/POZ et à doigts de zinc sont des répresseurs transcriptionnels spécifiques de leur séquence cible : par exemple, la protéine tramtrack de *Drosophila* (Xiong et Montell, 1993), la protéine ZF5 chez la souris (Numoto *et al.*, 1993) et de façon très intéressante, l'oncoprotéine PLZF qui présente également deux domaines répresseurs (Chen *et al.*, 1993; Licht *et al.*, 1997). Le domaine BTB/POZ confère en partie à la protéine de fusion PLZF-RAR α des propriétés de dominant négatif sur l'activité transcriptionnelle de RAR α et RXR α qui sont très probablement impliquées dans son oncogénicité (Chen *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 1996).

Le clonage d'un partenaire de LAZ3 a été effectué dans notre équipe par P.Dhordain, par la technique de double-hybride. Il s'agit de la protéine SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid receptor*) connu comme son nom l'indique, en tant que corépresseur de l'acide rétinoïque libre et des récepteurs thyroïdiens (Dhordain *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1996). Les protéines LAZ3 et SMRT interagissent *in vitro* par le domaine BTB/POZ de LAZ3. SMRT se comporte comme un co-répresseur de LAZ3 puisque son expression augmente la capacité de la protéine LAZ3 à réprimer la transcription. Enfin, les deux protéines co-localisent *in vivo* sous forme de points dans le noyau de cellules transfectées (Dhordain *et al.*, 1997). Le même co-facteur a été simultanément identifié comme partenaire de la protéine PLZF par son interaction avec le domaine BTB/POZ de cette protéine (Lin *et al.*, 1998). SMRT pourrait donc jouer le rôle de cofacteur de répression d'autres facteurs de transcription à domaine BTB/POZ.

Récemment, l'interaction entre LAZ3 et une autre protéine de la famille BTB/POZ a été mise en évidence, cette protéine homologue de PLZF a été nommée LRF (*Leukemia/Lymphoma Related Factor*) (Davies *et al.*, 1997).

| | | |
|--|-------------------------------|-----|
| | (T/A)NCTTTCNAGG(A/G)AT | (1) |
| (T/C)(T/A)(T/A)NNN(G/A)NN(A/T)(T/A)NCTTT | | (2) |
| | TC(T/C)T(C/A)GAA(A/T)G | (3) |
| | GAAAATTCCTAGAAAGCATA | (4) |
| | TTCCNNGGAA | (5) |

Figure 5 : Les séquences cibles de la protéine LAZ3/BCL6. En gras sont représentés les nucléotides proches du site reconnu par les STATs.
(1) (Kawamata *et al.*, 1994) **(2)** (Baron *et al.*, 1995) **(3)** (Seyfert *et al.*, 1996)
(4) (Chang *et al.*, 1996) **(5)** site STATs (Ihle, 1996)

IV.5 Expression du gène *LAZ3/BCL6*

Les résultats des premières études de l'expression du gène *LAZ3* par Northern blot publiés en 1993 étaient contradictoires : un transcrite majeur de 3.8 kb et un transcrite mineur de 11 kb étaient détectés, ce dernier provenant très probablement d'un transcrite immature (Kerckaert *et al.*, 1993; Kawamata *et al.*, 1994) tandis qu'une autre équipe rapportait tout d'abord deux transcrits de 2,4 et 4,4 kb dans des lignées cellulaires B puis un transcrite de 3,8 kb (Ye *et al.*, 1993 a&b). Le transcrite de 11 kb exprimé dans une lignée T publié par Baron *et al.*, en 1993 ne provient pas du gène *LAZ3* mais probablement d'un gène voisin. Les résultats de Miki *et al.*, en 1994, identiques à ceux de Kerckaert *et al.*, 1993, montrent que le transcrite de 3,8 kb est exprimé de façon assez ubiquitaire avec une prédominance dans le muscle squelettique et également dans les lignées B. Chez la souris, l'expression du gène est assez semblable à celle chez l'Homme, un transcrite de 3,8 Kb est observé de façon assez ubiquitaire au niveau du coeur, cerveau, poumon, foie, rein, rate, thymus, ganglions lymphatiques, moelle osseuse (Fukuda *et al.*, 1994).

Une étude plus récente de l'expression du gène *LAZ3* révèle que celui-ci est exprimé dans la lignée préB Nalm6, de façon plus importante dans certaines lignées B matures (Raji, BJAB) mais pas dans toutes (MBB1, VDSO par exemple) et très faiblement dans les lignées T, myéloïde, érythroïde et HeLa (Allman *et al.*, 1996). L'expression du gène *LAZ3* a été également détectée dans la couche supérieure de l'épiderme chez la souris. Son expression interviendrait dans la différenciation des kératinocytes humains puisque la stimulation de ces cellules par le calcium induit l'augmentation progressive de l'expression du gène jusqu'à leur différenciation terminale (Yoshida *et al.*, 1996). En plus de son expression dans les cellules B et T, le gène *LAZ3* est aussi exprimé dans les granulocytes et monocytes circulants ainsi que dans les leucémies

aiguës non lymphocytaires à composante myéloïde et monocyttaire (Yamoshi *et al.*, 1997). Son expression est induite lors de la différenciation des lignées myéloïde HL-60 et monocyttaire U937 traitées au TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) et pourrait donc être associée à la différenciation de ces cellules (Yamoshi *et al.*, 1997).

L'étude d'une équipe japonaise présente le gène *LAZ3* murin comme un « *immediate early gene* » puisqu'elle montre une induction de l'expression du gène dans les lymphocytes du thymus et de la rate après 15 à 30 min de stimulation *in vitro* au PMA (Phorbol 12-myristate 13-acétate) + ionomycine et ceci jusqu'à 4 heures (Fukuda *et al.*, 1995). Ces résultats sont en opposition avec ceux rapportés par Allman *et al.*, 1996 qui montrent que l'expression du gène *LAZ3* est diminuée lors de la stimulation des lymphocytes B et T quiescents. Cette différence s'explique peut-être par la différence d'échelle de temps retenue qui s'étend sur 4 H maximum pour celle de Fukuda *et al.*, et sur 24H voire 48H pour celle d'Allman *et al.* La stimulation *in vitro* de cellules B de souris par divers agents mitogènes comme les anticorps anti-IgM ou IgD, le LPS (lipopolysaccharide), le PMA ou le CD40L (ligand du CD40), induit une diminution du niveau d'ARNm *LAZ3* de 5 à 35 fois et ce 8 à 16 heures après la stimulation (Allman *et al.*, 1996). Cette diminution se produit vers le milieu de la phase G1 du cycle cellulaire, avant l'entrée en phase S (phase de synthèse de l'ADN) des cellules. Des résultats similaires sont obtenus avec des lymphocytes B humains stimulés par SAC (*Staphylococcus aureus* Cowan) + IL2 ou par anti-IgM, et également avec des lymphocytes T sanguins stimulés au PHA (phytohémagglutinine). Pourtant, les cellules B stimulées *in vivo* par l'antigène dans les centres germinatifs ne présentent pas de diminution de l'expression de *LAZ3* contrairement aux études réalisées *in vitro* (Allman *et al.*, 1996). Les taux d'ARNm *LAZ3* sont semblables dans les lymphocytes quiescents et dans les cellules B activées des centres germinatifs, en revanche les taux de protéines *LAZ3* sont jusqu'à 34 fois supérieurs dans les cellules B des centres germinatifs à ceux des cellules quiescentes (Allman *et al.*, 1996). Ceci laisse supposer l'existence d'une régulation traductionnelle ou post-traductionnelle de l'expression de ce gène dans les centres germinatifs. Les séquences non traduites de l'ARNm et/ou la phosphorylation de la protéine *LAZ3* pourraient jouer un rôle dans ces mécanismes. Les centres germinatifs sont des structures dynamiques où les cellules B stimulées par l'antigène subissent une transformation complexe comprenant une expansion rapide de leur prolifération induite par l'antigène, une hypermutation des régions variables des gènes d'Ig et une commutation isotypique de classe d'Ig. Pendant ces processus, les cellules B sont sélectionnées pour suivre une des 3 voies les conduisant soit à l'apoptose, soit à la cellule B mémoire, soit à la différenciation en plasmocytes (Mc Lennan, 1994 et chapitre V).

Les mêmes auteurs notent que les lignées lymphoblastoïdes LCL (*lymphoblastoïde cell lines*) transformées par le virus de Epstein-Barr (EBV) n'expriment pas LAZ3 contrairement au Lymphome de Burkitt (Allman *et al.*, 1996). Dans la lignée Akata de lymphome de Burkitt, la stimulation des cellules par anticorps anti-Ig induit une diminution du taux d'ARN LAZ3. Cette stimulation active aussi le génome de l'EBV. Dans les LCL transformées par EBV, certains produits du génome viral sont connus pour activer certains gènes cellulaires telle que la protéine LMP1 qui induit l'expression de protéines membranaires normalement présentes quand la cellule B est activée. L'ensemble de ces données laisse supposer que les produits de l'EBV pourraient réguler l'expression du gène LAZ3, d'autant plus que parmi les LNH liés au SIDA, ceux positifs pour l'EBV qui expriment la protéine LMP-1, n'expriment pas la protéine LAZ3 (Carbone *et al.*, 1997&1998).

Le développement d'anticorps contre les régions N et C terminales de la protéine LAZ3 a permis la réalisation de plusieurs études immunohistochimiques :

Une analyse par PCR-SSCP (*single strand conformation polymorphism*) de la séquence codante n'a pas mis en évidence de mutations fréquentes dans la partie codante du gène LAZ3 de patients porteurs de réarrangement. Trois polymorphismes et deux cas de mutations dont une mutation silencieuse ont été observés chez ces mêmes patients (Otsuki *et al.*, 1995). Les mutations dans la séquence codante du gène ne semblent donc pas intervenir dans les propriétés oncogéniques de la protéine LAZ3.

L'expression de LAZ3 intervient dans la différenciation de la lignée B lymphoïde, plus précisément au niveau des centres germinatifs (Otsuki *et al.*, 1995; Onizuka *et al.*, 1995; Flenghi *et al.*, 1995). La localisation de la protéine est nucléaire, elle est détectée aussi bien dans les centroblastes que dans les centrocytes mais aussi dans certains lymphocytes T CD4+ inter ou intrafolliculaires. En revanche les cellules B de la zone du manteau, les plasmocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules pré-B de la moelle osseuse n'expriment pas la protéine LAZ3 (Cattoretti *et al.*, 1995; Onizuka *et al.*, 1995; Flenghi *et al.*, 1995; Falini *et al.*, 1997). La plupart des cellules exprimant la protéine LAZ3 n'expriment pas BCL-2 (Cattoretti *et al.*, 1995). Des études d'immunohistochimie n'ont pas montré d'expression aberrante de la protéine puisqu'elle est détectée indépendamment du réarrangement du gène et du type de tumeur (DLCL ou lymphomes folliculaires) (Cattoretti *et al.*, 1995; Flenghi *et al.*, 1995; Pittaluga *et al.*, 1996; Falini *et al.*, 1997) et que son expression n'est pas corrélée avec celle d'autres marqueurs ou la prolifération des cellules (Falini *et al.*, 1997). L'équipe d'Onizuka obtient un immunomarquage dans 17 cas de lymphomes sur 30 avec une prédominance dans les lymphomes folliculaires et les DLB mais parmi lesquels seuls 7 d'entre eux présentent un réarrangement du

gène *LAZ3* confirmant l'indépendance entre l'expression et le réarrangement du gène dans les LNH (Onizuka *et al.*, 1995).

L'ensemble de ces résultats indique d'une part, que la protéine LAZ3 n'est pas associée à la prolifération cellulaire B puisque des centroblastes et des centrocytes expriment la protéine qu'ils soient en prolifération ou en phase de quiescence, d'autre part, que l'expression de *LAZ3* est régulée pendant la différenciation des cellules B et qu'elle exerce une fonction dans le développement ou la formation des centres germinatifs.

L'ensemble de ces équipes ont remarqué également que les lymphomes du manteau ou de la zone marginale par exemple, n'expriment pas LAZ3 ainsi que les lymphocytes B normaux de ces mêmes régions dans le centre germinatif, et qu'au contraire les lymphomes folliculaires ou les DLCL montrent un marquage protéique intense comme les cellules B des centres germinatifs dont ils dérivent. Le parallélisme d'expression de *LAZ3* dans certains types de lymphomes et dans les différentes cellules des centres germinatifs renforce l'idée qu'ils ont pour origine les cellules des centres germinatifs. La protéine LAZ3 sert en quelque sorte de marqueur des cellules des centres germinatifs et la dérégulation de l'expression du gène *LAZ3* dans ces cellules pourrait donc participer au développement d'une partie des lymphomes en bloquant la différenciation terminale de ces cellules (Cattoretti *et al.*, 1995; Flenghi *et al.*, 1995; Onizuka *et al.*, 1995; Pittaluga *et al.*, 1996; Falini *et al.*, 1997).

Le rôle plus précis de LAZ3 dans la formation des centres germinatifs a été mis en évidence par les expériences d'inactivation du gène *in vivo* chez la souris.

IV.6 LAZ3/BCL6 intervient dans la formation des centres germinatifs:

La réalisation de souris dépourvues du gène *LAZ3* fonctionnel par différentes équipes a permis d'éclaircir le rôle de la protéine LAZ3. Plusieurs approches ont été utilisées :

- le remplacement d'une partie des doigts de zinc de la protéine par insertion d'une cassette contenant le gène de résistance à la néomycine sous contrôle du promoteur pGK, aboutissant à la production d'une protéine tronquée incapable de se fixer sur sa séquence cible (mutant LAZ Δ ZN) (Ye *et al.*, 1997). Curieusement, cette protéine n'est pas détectée par Dent *et al.*, 1997.

- la suppression de la région comprenant les exons 4 à 10 correspondant à 95% de la séquence codante du gène *LAZ3* par cette même cassette (Ye *et al.*, 1997).

- l'élaboration de souris dépourvues du gène *RAG1* (sans lymphocytes matures), dont la moelle a été reconstituée à partir de celle des souris *LAZ3* $-/-$ (Ye *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997)

Les résultats obtenus dans les trois cas sont en grande partie semblables et ont permis d'identifier un rôle de *LAZ3* dans le contrôle de la réponse immunitaire inflammatoire de type Th2 ainsi que dans la formation des centres germinatifs:

Les souris mutantes *LAZ Δ ZN* ou sans gène *LAZ3* présentent un retard de croissance et des signes de mauvaise santé après leur naissance (Dent *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997). La moitié meurent avant 5 semaines (Dent *et al.*, 1997), celles qui survivent développent dans les 3 premiers mois des maladies infectieuses et inflammatoires au niveau des voies aériennes et digestives avec infiltrations de monocytes et granulocytes ce qui expliquerait leur retard de croissance (Ye *et al.*, 1997). Pour l'équipe japonaise, elles meurent à 9 semaines de déficits cardiaques sévères ce qui les a amenés à utiliser des souris dont le gène *RAG1* est inactivé (Fukuda *et al.*, 1997).

Les souris ne présentent pas de différence notable par rapport aux souris témoins au niveau du développement des organes lymphoïdes et de leur population, ce qui exclut un rôle de la protéine *LAZ3* dans cette fonction (Dent *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 1997). En revanche ces souris développent des maladies inflammatoires telles que des myocardites et des vasculites pulmonaires, la rate présente des infiltrations granulocytaires principalement constituées d'éosinophiles et de macrophages (Dent *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 1997). Elles montrent aussi des inflammations de l'intestin, du foie et de la peau avec infiltration d'éosinophiles. Cette inflammation s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules produisant des IgE et IgG1 indiquant une réaction inflammatoire de type Th2 (Ye *et al.*, 1997). La culture de cellules des ganglions lymphatiques et des cellules inflammatoires montre une augmentation d'expression des cytokines produites par les lymphocytes T helper de type 2 (T_H2) : IL-4, IL-5, IL-6 et IL-13 (Dent *et al.*, 1997).

Les souris ne développent pas de centres germinatifs même après immunisation avec un antigène T-dépendant, le TNP-KLH (Dent *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 1997), leur synthèse d'IgM est normale mais elles sont incapables de produire des IgG (Dent *et al.*, 1997), une diminution des taux de la plupart des isotypes surtout IgG est observée (Ye *et al.*, 1997) tandis qu'une immunisation au TNP-Ficol (Ag T-indépendant) induit une production d'anticorps comparable aux témoins (Dent *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 1997). Aucune maturation d'affinité des anticorps produits n'est observée, même après 3 immunisations (Ye *et al.*, 1997).

Les tests de prolifération *in vitro* de cellules B de la rate des souris *LAZ3* (-/-) ne présentent pas de différence avec ceux des souris normales, les cellules n'exprimant plus *LAZ3* gardent donc leur capacité à proliférer (Ye *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997). Chez les souris mutantes Δ ZN, où la protéine LAZ3 est dépourvue de ses doigts de zinc, les cellules B des follicules coexpriment LAZ3 et IgD contrairement aux souris sauvages qui expriment soit l'une, soit l'autre. De plus les cellules qui expriment la protéine LAZ3 mutée sont PNA⁻ (marqueur spécifique des centres germinatifs) et PCNA⁻ (marqueur de prolifération) ce qui indique que *LAZ3* intervient dans l'acquisition du phénotype normal IgD⁻/PNA⁺ des cellules B des centres germinatifs et probablement dans leur prolifération (Ye *et al.*, 1997).

Les souris *RAG1* (-/-) n'ont pas de lymphocytes matures et leur utilisation a permis d'étudier le rôle de LAZ3 dans le compartiment lymphoïde. Les résultats obtenus avec les souris *RAG1*(-/-) reconstituées avec des cellules de la moelle issues de souris *LAZ3* mutantes (Ye *et al.*, 1997) ou sans *LAZ3* (Fukuda *et al.*, 1997) apportent des données supplémentaires : le développement des organes lymphoïdes ainsi que le nombre et la répartition des cellules B et T sont identiques aux souris témoins (Ye *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997). Le défaut de formation des centres germinatifs chez les souris dépourvues du gène *LAZ3* proviendrait d'une anomalie du compartiment lymphoïde plutôt que de celle des cellules folliculaires dendritiques ou des cellules non lymphoïdes (Ye *et al.*, 1997). C'est l'expression de *LAZ3* dans les cellules B et non dans les cellules T qui est essentielle à la formation des centres germinatifs puisque le transfert de cellules B de souris sauvages (donc *LAZ3* +/+) restaure la formation des centres germinatifs contrairement au transfert de cellules T (Fukuda *et al.*, 1997). Les cellules B de ces souris gardent la capacité de proliférer *in vitro*, en réponse à une stimulation antigénique ou à des signaux provenant de lymphocytes T helper (Fukuda *et al.*, 1997). L'absence de centres germinatifs chez ces souris montre que les signaux augmentant l'expression du gène *LAZ3* dans les cellules B activées par l'antigène sont essentiels à la différenciation des cellules B des centres germinatifs (Fukuda *et al.*, 1997).

Le déficit de formation de centres germinatifs en l'absence de gène *LAZ3* explique la diminution de la réponse immunitaire T dépendante puisque celle-ci provient de l'expansion clonale des cellules B dans les centres germinatifs. Le gène *LAZ3* pourrait donc jouer un rôle dans la régulation des lymphocytes Th2 dont la production d'IL4 intervient au niveau des cellules B dans la commutation isotypique des Ig en IgG1 et IgE. En effet, le développement et la fonction des lymphocytes Th2 dépend en partie du facteur de transcription Stat6 en réponse à l'IL-4. Or la séquence d'ADN reconnue par Stat6 est similaire à celle reconnue par LAZ3 (Dent

et al., 1997; Ye *et al.*, 1997). La protéine LAZ3 est capable de réprimer la transcription du gène CD23 en bloquant le site reconnu par Stat6. La protéine LAZ3 pourrait donc bloquer la différenciation des Th2 en réponse à une stimulation antigénique et pourrait jouer un rôle de régulateur de l'inflammation en modulant les voies signalétiques des STATS (Dent *et al.*, 1997).

V - LES CENTRES GERMINATIFS

Les centres germinatifs (CG) sont localisés au niveau des organes lymphoïdes secondaires, dans les follicules des ganglions lymphatiques, des amygdales et des plaques de Peyer, et au niveau des bifurcations des artérioles qui traversent la pulpe blanche de la rate.

Les CG sont constitués d'un foyer de cellules lymphoïdes B en prolifération rapide. Ils apparaissent au sein des follicules primaires après une stimulation antigénique pour environ trois semaines. Ils réapparaissent ensuite quand le même Ag est à nouveau rencontré. Les centres germinatifs sont à l'origine du développement des cellules B mémoires, à la suite de la commutation isotypique des Ig et de l'hypermutation somatique des gènes codant les régions variables des chaînes d'Ig (Ahmed et Gray, 1996).

Dans les CG, la prolifération très rapide des cellules B s'accompagne d'une fréquence élevée de phénomènes d'apoptose qui permet l'élimination des cellules B autoréactives et/ou non efficaces et donc l'expansion sélective des cellules B dont les Ig ont une forte affinité pour l'antigène. Ces cellules B mémoires peuvent quitter les CG pour passer dans la circulation sanguine et y rester à l'état quiescent (Tsiagbe *et al.*, 1996; Ahmed et Gray, 1996).

V.1 Structure et contenu cellulaire des centres germinatifs

V.1.1 Structure des centres germinatifs

En microscopie photonique, on peut distinguer globalement 2 zones (figure 6, p 50) :

- la zone sombre, éloignée de la zone du manteau, où migrent les cellules B blastiques ou centroblastes, larges cellules en cycle qui n'expriment pas d'Ig de membrane,
- la zone claire, moins dense, contenant de petites cellules B non proliférantes, les centrocytes, qui sont générés dans la zone sombre et migrent vers la zone claire où ils vont exprimer des Ig de membrane. Les cellules de cette zone sont en contact étroit avec les cellules folliculaires dendritiques (CFD). C'est dans cette zone que se fait la sélection des cellules B et l'élimination des cellules mortes par les macrophages. Les cellules B mémoires et les

plasmocytes migrent ensuite vers la zone périphérique dense du follicule (manteau ou «*cap*») puis quittent celui-ci.

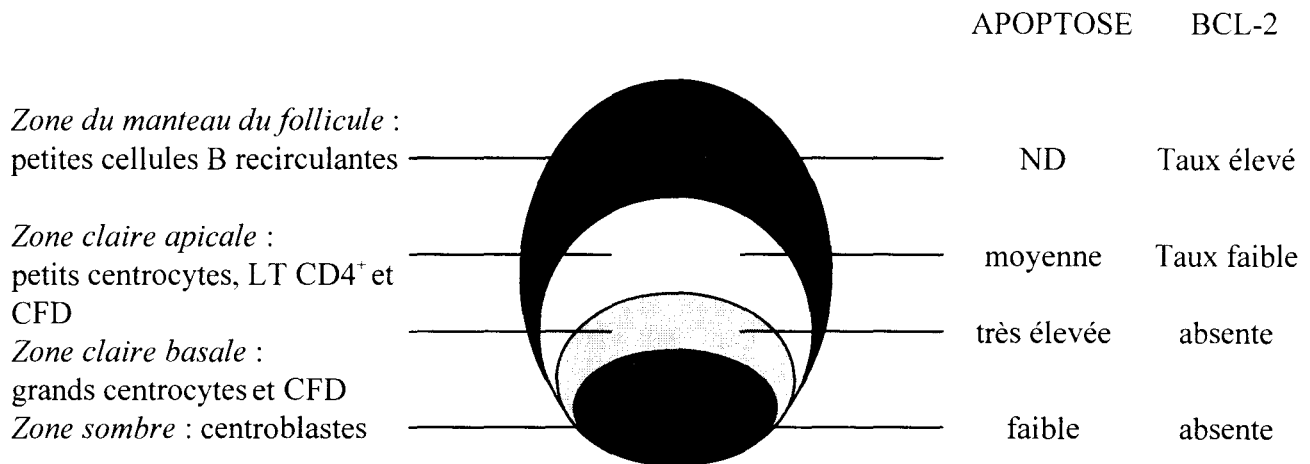


Figure 6 : Schéma représentant un centre germinatif (D'après Tsiagbe *et al.*, 1996).

Abbréviations : LT : lymphocytes T, CFD : cellules folliculaires dendritiques, ND : non déterminée.

V.1.2 Les cellules des centres germinatifs

Les cellules T des centres germinatifs ont un rôle considérable puisqu'en absence de stimulation des cellules T, la formation de centres germinatifs dans les ganglions lymphatiques n'a pas lieu. Chez l'Homme, les lymphocytes T des CG portent des marqueurs de surface caractéristiques (ex: CD4, CD3) (Tsiagbe *et al.*, 1996). Ils peuvent aussi exprimer le CD40-L qui joue un rôle important dans la formation des CG : les souris dépourvues de CD40-L n'ont pas ou peu de CG (Kawabe *et al.*, 1994). Généralement, les cellules T présentes dans les CG sont spécifiques d'un épitope de l'antigène qui a induit la formation des CG.

- Les cellules folliculaires dendritiques (CFD) sont des cellules non phagocytaires caractérisées par leur longues extensions dendritiques qui forment un fin réseau à travers les cellules B folliculaires et les CGs. Les CFD expriment non seulement des récepteurs qui servent à fixer les antigènes ou les complexes immuns (FC γ -R et de récepteurs aux molécules C1, C2 et C3 du complément) mais également de nombreuses molécules d'adhésion intervenant dans les interactions cellulaires (Liu *et al.*, 1992; Tsiagbe *et al.*, 1996).

- Les cellules B des centres germinatifs : les précurseurs des cellules B des centres germinatifs, comme ceux des autres cellules B, proviennent de la moelle osseuse. Ces cellules expriment des marqueurs B spécifiques (ex: CD45) et portent également des marqueurs d'activation (CALLA (CD10), CD38) (Tsiagbe *et al.*, 1996). Contrairement aux cellules B circulantes, les cellules B des CG ont une grande affinité pour la lectine et le PNA (*peanut agglutinin*), propriété utilisée pour le marquage des CG en histochimie. Il existe une différence d'expression de certains marqueurs de surface selon la zone du CG où se trouvent les cellules B (Tsiagbe *et al.*, 1996).

V.2 Développement des centres germinatifs.

Les CG se forment environ au 4ème jour lors de la réponse immunitaire dépendante des cellules T. Les cellules B naïves sont activées en dehors des follicules dans les zones riches en cellules T des organes lymphoïdes secondaires notamment par les T helper CD4+ situés dans les gaines lymphoïdes périartériolaires ou PALS (*periarteriolar lymphoid sheath*). Deux voies sont possibles pour l'établissement de cellules B spécifiques de l'antigène :

- soit, les cellules B activées continuent leur développement local formant ainsi des foyers de plasmocytes à vie brève, à proximité des PALS,
- soit, les cellules B migrent jusqu'aux follicules des organes lymphoïdes II et forment des CG au sein desquels elles se différencient en cellules B mémoire à vie longue (Mc Lennan, 1994).

Chaque centre germinatif se développe de façon clonale à partir de 1 à 3 précurseur(s) B recrutés du pool de cellules circulantes après une immunisation. Ces cellules proviendraient de cellules IgD+ stimulées par l'antigène devenant IgD- dans les CG, ou de cellules IgM+ n'exprimant pas encore d'IgD (Tsiagbe *et al.*, 1996). L'origine clonale des cellules B des CG a pu être confirmée notamment par l'analyse de la structure des régions variables des gènes d'Ig (Küppers *et al.*, 1993).

Au premier stade du développement du CG, les petites cellules folliculaires non proliférantes du CG se déplacent vers la périphérie du follicule pour former le manteau qui entoure le CG.

Le deuxième stade consiste en la polarisation du CG : quand le réseau de cellules folliculaires dendritiques est rempli de blastes, un signal non identifié est donné à ces cellules. Elles se déplacent alors à un pôle du réseau de CFD pour former la zone sombre du CG (à

proximité des PALS) (figure 7, page 53). Pendant cette migration, les cellules B prolifèrent et se différencient en centroblastes caractérisés par le fait qu'ils n'expriment plus d'Ig de surface. Les centroblastes restent dans le cycle cellulaire, leur nombre n'augmente pas car ils se divisent et forment des centrocytes qui migrent vers la zone claire du CG. Les centrocytes ne se divisent pas et expriment à nouveau des Ig de surface. Ils constituent une population labile constamment renouvelée par le pool de centroblastes en division. Les centrocytes présentant une forte affinité pour les auto-Ag et ceux présentant une faible affinité pour l'antigène sont éliminés par apoptose, les autres, présentant la plus forte affinité pour l'antigène, continuent leur différenciation en cellules productrices d'anticorps ou en cellules B mémoire (Mc Lennan, 1994).

V.3 Fonction des centres germinatifs

V.3.1 Centres germinatifs et réponse aux antigènes.

Il apparaît que le développement des CG n'a lieu qu'après une stimulation immunogène. Le recrutement des cellules B naïves dans la réponse T-dépendante a lieu pendant les quelques jours qui suivent l'exposition à l'antigène. La réponse est ensuite maintenue par les clones de cellules B mémoire (Tsiagbe *et al.*, 1996).

Les cellules T Ag spécifiques et les CFD porteuses de complexes immuns sont primordiales pour leur formation, suite aux interactions entre cellules B et T, entre FDC et cellules B et entre cellules B elles-mêmes. Dans les CG, les cellules T CD4⁺ spécifiques de l'antigène expriment le CD40-L. Les études de l'effet d'anti-CD40L ou d'anti B7-2 sur la formation des CGs suggèrent que les interactions cellulaires *via* ces molécules et leurs ligands sont importantes pour le maintien des CG (Kawabe *et al.*, 1994; Tsiagbe *et al.*, 1996).

V.3.2 Rôle des centres germinatifs dans la création et l'expansion de cellules B mémoire.

Le stade initial de la formation des CG est associé à la croissance exponentielle des cellules B blastiques à l'intérieur des follicules. Les cellules B PNA⁺ se différencient en cellules B matures PNA⁻ ou cellules mémoire qui vont dans la circulation et sont disséminées dans les tissus lymphoïdes.

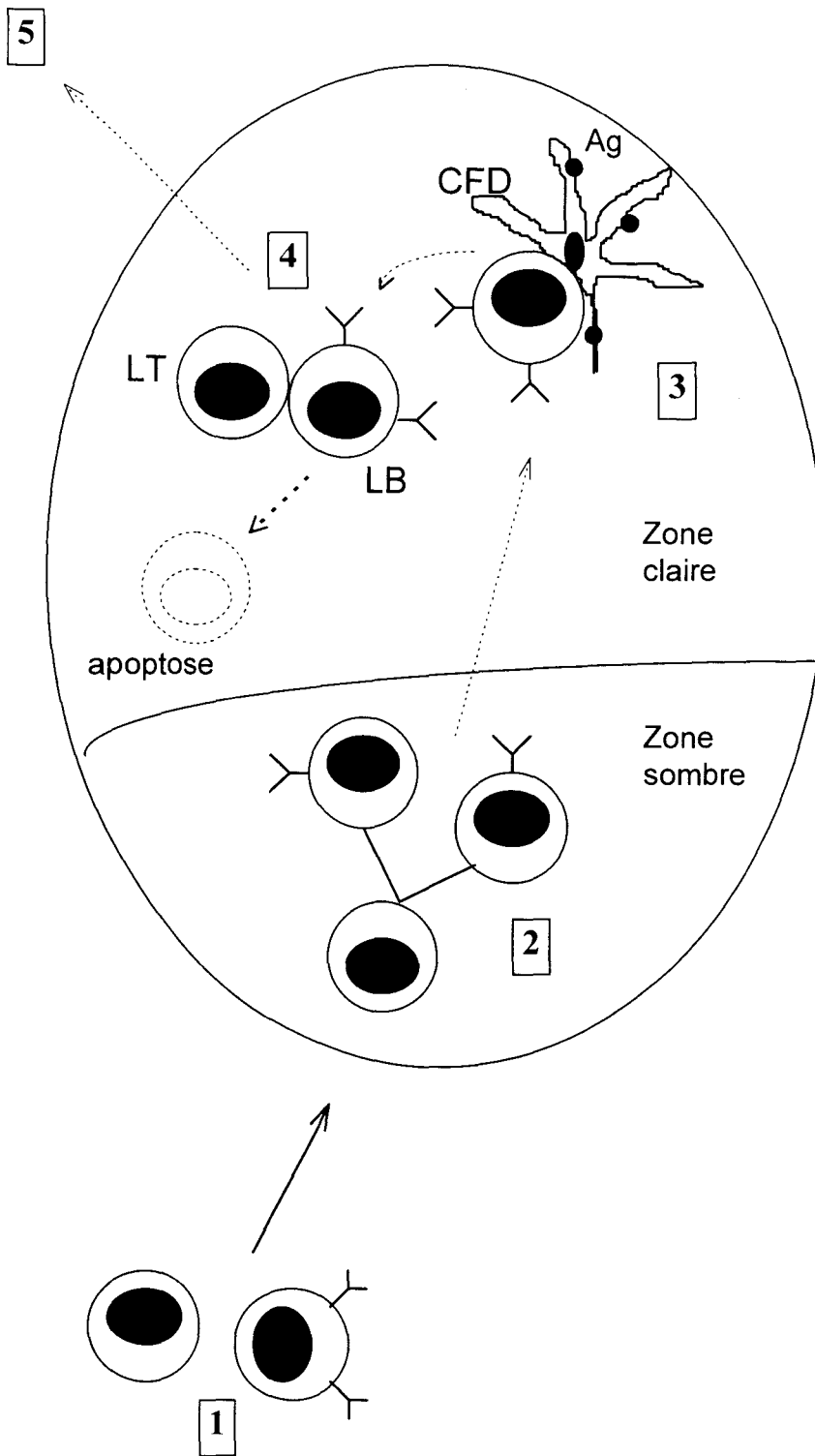


Figure 7 : Modèle de voie de sélection des cellules B dans les centres germinatifs (d'après Kelsoe, 1995).

(1) Les cellules T (LT) spécifiques de l'antigène (Ag) et les cellules B activées (LB) migrent dans les follicules. (2) Les centroblastes prolifèrent et constituent la zone sombre du centre germinatif. Ils introduisent des mutations dans la région variable des gènes d'Ig et donnent naissance aux centrocytes qui expriment l'Ig mutante à leur surface. (3) Les centrocytes migrent dans la zone claire du centre germinatif où ils rencontrent l'Ag porté par les cellules folliculaires dendritiques (CFD). L'Ag est internalisé par les centrocytes et réexprimé à leur surface par le CMH de classe II. (4) Les centrocytes présentent alors l'Ag aux lymphocytes T des CG et reçoivent des signaux pour devenir des cellules B mémoire et quitter le centre germinatif. En absence de ces signaux, les centrocytes sont éliminés par apoptose.

La commutation d'isotype d'Ig se produit dans les CG (mais pas uniquement) et aboutit à l'expression d'anticorps de classe G, A ou E au lieu des classes M et D, par les plasmocytes quittant les follicules (Rajewsky, 1996). Le moment où se produit la commutation de classe n'a pas été précisément défini mais les signaux de commutation sont souvent envoyés avant que les centrocytes ne soient sélectionnés et induits à se différencier (Mc Lennan, 1994). Certaines cytokines (CD23 soluble, IL-1 α , IL-2) induiraient la différenciation des plasmocytes et l'isotype produit (Mc Lennan, 1994).

V.3.3 Rôle des centres germinatifs dans la diversité du répertoire B :

Hypermutation somatique des gènes des régions variables des Ig.

La maturation de l'affinité des anticorps pendant la réponse immunitaire provient d'une compétition entre les cellules B portant des anticorps d'affinité différente pour l'antigène. Le lieu de cette compétition est le microenvironnement du CG. Le processus qui aboutit à cette différence d'affinité est la mutation somatique des régions variables des Ig, après le réarrangement primaire des gènes d'Ig (Tsiagbe *et al.*, 1996; Mc Lennan, 1994). Ce processus de mutation est induit dans les cellules déjà activées par l'antigène. Le mécanisme enzymatique produisant ces mutations somatiques n'est pas totalement connu mais il serait déclenché au cours de la phase de croissance exponentielle des cellules B blastiques dans les follicules (Liu *et al.*, 1992; Kelsoe, 1995). Le processus de mutation coïncide avec la polarisation du CG (Liu *et al.*, 1992). Une fois que ce processus est actif dans les cellules B, il peut continuer en absence de cellules T ou des facteurs qu'elles produisent (Tsiagbe *et al.*, 1996).

Les mutations s'accumulent par incorporation de 1 à 3 substitution(s) de nucléotide(s) de préférence sur un seul brin d'ADN. Le processus d'hypermutation favorise les mutations de transition, certaines bases sont plus souvent remplacées que d'autres. Des points de mutation préférentielle (*hotspots*) existent dans les gènes VH et VL, en particulier au niveau de motifs (C/A) AG (C/T) T (Kelsoe, 1995; Tsiabge *et al.*, 1996). Au cours du processus de sélection, les mutations se concentrent au niveau des régions CDRs (*complementary-determining regions*) (Kersoe, 1995). Des études *in vitro* ont montré que les séquences de l'intron et l'*enhancer* en 3' du locus Ig κ murin sont importantes pour l'hypermutation de la région V κ J κ tandis que la séquence cible et le promoteur V κ peuvent être remplacés par n'importe quelle autre séquence (Yelamos *et al.*, 1995). Un signal provenant de l'interaction de forte affinité entre Ag et Ig de surface indiquerait aux cellules d'arrêter le processus de mutation somatique (Kelsoe, 1995).

Au pic maximum de la réponse primaire le taux de mutations dans les régions V atteint environ 10^{-3} /pb/division, puis il diminue à moins de 10^{-7} /pb/division après les autres immunisations. Après des immunisations répétées, les cellules B mémoire produisent une réponse d'affinité grandissante et continuent d'accumuler les mutations. Ensuite, pendant la génération de cellules productrices d'AC à partir de cellules B mémoire, les mutations cessent (Tsiagbe *et al.*, 1996; Rajewsky, 1996).

Le taux d'hypermutation a été évalué dans une lignée de lymphome folliculaire à 0.7×10^{-6} /pb/division. L'addition d'IL2 et d'IL4 augmente ce taux de 10 fois (Wu *et al.*, 1995). Un exemple de l'importance du microenvironnement des CG pour l'induction des mutations somatiques est celui des cellules T porteuses d'un TCR $V\alpha 11 V\beta 3$. Ces cellules présentent des mutations somatiques dans leur gène *V $\alpha 11$* alors qu'elles n'ont pas lieu dans les régions V du TCR des autres LT situés dans le thymus ou les organes lymphoïdes secondaires (Zheng *et al.*, 1994). Le processus de mutation somatique n'est donc pas uniquement réservé aux cellules B. Il est intéressant de noter le taux de mutation élevé du gène *LAZ3* (0.14 à 1.6×10^{-2} /pb) dans les lymphomes dérivés des CG bien que ce gène n'ait aucune homologie avec les gènes d'Ig (Migliazza *et al.*, 1995).

V.3.4 Rôle des centres germinatifs dans la sélection positive et négative des cellules B mémoires

Il existe deux phases de sélection dans les centres germinatifs:

(i) au stade centroblaste, dans la zone sombre, les cellules autoréactives subissent une sélection négative si elles reconnaissent des Ag non présentés par un lymphocyte T et donc les anticorps du soi,

(ii) au stade centrocyte, une sélection positive s'effectue au contact des FDC et des LT : les cellules capables de reconnaître avec une forte affinité les complexes immuns (Ag-IC) à la surface des FDC peuvent présenter cet Ag aux cellules T CD40L+ spécifiques (dans la zone apicale claire) et sont protégées, donc sélectionnées positivement dans la population des centrocytes et cellules B mémoire. Les cellules à faible affinité pour l'antigène sont détruites par apoptose. (Tsiagbe *et al.*, 1996; Rajewsky, 1996).

Le contrôle génétique du processus de sélection ferait intervenir BCL-2. Alors que cette protéine n'est pas exprimée dans les cellules des CG, elle est détectée dans les petits

lymphocytes et les cellules B blastiques extra-folliculaires. Le signal Ag-Ig induit l'expression de BCL-2 qui protégerait de l'apoptose les cellules des CG ayant reconnues l'antigène (Liu *et al.*, 1992; Mc Lennan, 1994; Rajewsky, 1996). Des molécules d'adhésion et des marqueurs de surface sur les FDC et des cellules B, médient aussi la protection contre l'apoptose. Citons VCAM-1/VLA-4, ICAM-1/LFA-1, CD21 (CR2), CD23 exprimé par les FDC, CD19 (Mc Lennan, 1994; Tsiagbe *et al.*, 1996). La protection contre l'apoptose par interaction avec les CFD fait intervenir un blocage rapide et irréversible des endonucléases. Elle est distincte des effets de CD40, CD21 et la fixation à l'Ig de surface (Tsiagbe *et al.*, 1996).

La susceptibilité des centroblastes à l'apoptose est associée à de faibles taux d'AMPc, l'absence de BCL-2 et une forte expression de FAS (CD95), Mcl-1 et Bax (Tsiagbe *et al.*, 1996; Rajewsky, 1996).

V.5 Certains gènes intervenant dans le développement des centres germinatifs sont impliqués dans les leucémies et les lymphomes.

Une partie des gènes intervenant dans le développement des centres germinatifs ont pu être identifiés notamment par les expériences de *knock-out* chez la souris. Parmi ces gènes présentés dans le tableau 2, page suivante, se trouvent RAG 1 et RAG 2 indispensables au réarrangement V(D)J des gènes d'Ig et du TCR, des facteurs de croissance ou des cytokines (IL-4, lymphotoxine- α), des récepteurs ou des marqueurs de surface des cellules B et T (CD19, CD40, CD40-L, TNF-RI), des kinases et des facteurs de transcription (lyn, GC kinase). Il est intéressant de noter que certains de ces gènes sont impliqués dans le développement de leucémies ou de lymphomes :

- *LAZ3/BCL-6*, dont l'implication dans la formation des centres germinatifs a été démontrée récemment par la réalisation de souris dépourvues d'un gène *LAZ3/BCL-6* fonctionnel. Les résultats de ces études ont été présentés plus haut (chapitre IV-6).

- *OBF-1/OCA-B/BOB1* : cofacteur B-spécifique de OCT-1 et OCT-2, facteurs de transcription des gènes d'Ig, est lui aussi essentiel à la formation des CG mais pas au réarrangement ni à la transcription des gènes d'Ig (Schubart *et al.*, 1996). Curieusement, ce gène est le partenaire de *LAZ3* dans la translocation t(3;11)(q27;q23) (Galiègue-Zouitina *et al.*, 1996).

- *BCL-3* : identifié comme proto-oncogène impliqué dans la translocation t(14;19) dans la leucémie lymphocytaire chronique B (LLC) (Ohno *et al.*, 1990). Il code un membre de la famille I κ B. Sa fonction dans la réponse immunitaire a pu être mise en évidence grâce aux souris *BCL3*^{-/-}. Celles-ci sont incapables de produire des anticorps spécifiques de l'antigène, les organes

lymphoïdes secondaires ont une microarchitecture anormale et ne présentent pas de CG, les souris présentent une perte partielle de cellules B et une absence de réaction immunitaire de protection Th1 (Schwartz *et al.*, 1997).

L'altération de un ou plusieurs de ces gènes au niveau des cellules lymphoïdes pourrait modifier la prolifération, la différenciation ou la survie de ces cellules et participer à l'expansion incontrôlée d'un clone, contribuant ainsi au développement d'un lymphome ou d'une leucémie.

| Marqueur génétique | altération immunitaire majeure | centres germinatifs |
|--|---|--|
| CD 40 $-/-$ exprimé par LB et CFD | Absence de commutation de classe des Ig Altération de réponse T dépendante | Absent +/- Ag |
| CD40L $-/-$ exprimé par LT activés | Absence de commutation des Ig | Absent +/- Ag |
| Lyn $-/-$ (tyrosine kinase de la famille src) | signal CD40 et LB↓ auto-Ac | Absent +/- Ag |
| CD19 $-/-$ marqueur LB | réponse Ac T-indépendante ↑ réponse Ac T-dépendante ↓ | diminution de 95 à 100%, follicules normaux |
| CD19↑ marqueur LB | réponse Ac T-indépendante ↓ réponse Ac T-dépendante ↑ | réponse aux Ag ↓ |
| CD23 $-/-$ exprimé par LB et CFD | réponse Ac IgE↑↑ | normaux |
| IL4 $-/-$ | IgG1 et IgE faible réponse immune ↓ | absents au niveau des Plaques de Peyer, normaux dans le reste des organes lymphoïdes |
| IL2 $-/-$ | désordre lymphoprolifératif, auto-Ac/immunité | hyperdéveloppés |
| LT- α $-/-$, TNFR-I $-/-$ | Absence de ganglions lymphatiques et Plaques de Peyer | Absent |
| IL-5 $-/-$ | cellules B1 et éosinophiles ↓↓ | normaux |
| IL-6 $-/-$ | Réponse Ac IgG ↓↓ | taille diminuée, architecture anormale |
| TCR- α $-/-$ | Auto-Ac, IL-2↓, IL-4 ↑, IFN- γ ↑, cellules T $\gamma\delta$ ↑↑ | rares, pas de réponse à l'immunisation |
| TCR- β $-/-$ | réponse Ac T-dépendante ↓↓ | Absent |
| LSIRF/IRF4 $-/-$ | blocage de la différenciation tardive des LB, Ig ↓↓, adénopathie lymphoïde | Absent |
| Blr1 | formation ganglions lymphatiques et plaques de Peyer affectée | Absent |
| CD28 | pas d'IgG1 T-dépendante | Absent |

Tableau 2 : Les centres germinatifs chez divers souris modifiée génétiquement. D'après Tsiagbe *et al.*, 1996.

LB : lymphocyte B, LT : lymphocyte T, CFD : cellule folliculaire dendritique, CD40-L : ligand du CD40, Blr1 : récepteur de cytokine couplé aux protéines G, spécifique des LB, LT- α : Lymphotoxine- α , TNFR-I : récepteur de type I du TNF (*Tumor necrosis factor*), LSIRF/IRF4 : facteur de transcription régulateur de l'interféron, lymphocyte-spécifique.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les translocations impliquant la région 3q27 sont détectées dans près de 15% dans les Lymphomes non Hodgkiniens (L.N.H.) et représentent la troisième anomalie la plus fréquente dans cette pathologie (Offit *et al.*, 1989; Bastard *et al.*, 1992). Elles sont exclusivement localisées dans une région appelée M.T.C. (*Major translocation cluster*) de 3,3 kb, appartenant au premier intron du gène *LAZ3/BCL6* (Deweindt *et al.*, 1993). Ce gène code une protéine nucléaire comportant six doigts de zinc dans sa région C-terminale et un domaine conservé d'interaction entre protéines appelé *BTB/POZ* dans sa région N-terminale (Kerckaert *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 1993; Miki *et al.*, 1994). La protéine *LAZ3/BCL6* se comporte comme un répresseur transcriptionnel sur sa séquence d'ADN cible (Deweindt *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1996). Son expression intervient dans la différenciation du tissu lymphoïde normal, plus précisément au niveau des centres germinatifs (Cattoretti *et al.*, 1995; Flenghi *et al.*, 1995). *LAZ3/BCL6* est exprimé dans les cellules B matures des centres germinatifs contrairement aux précurseurs B immatures et aux plasmocytes (Cattoretti *et al.*, 1995; Onizuka *et al.*, 1995; Allman *et al.*, 1996). Le rôle de *LAZ3/BCL6* dans la formation des centres germinatifs et la réponse antigénique T-dépendante a été mis en évidence récemment par les études d'inactivation du gène chez la souris (Allman *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997).

Une dérégulation du gène *LAZ3* dans les LNH pourrait résulter de deux mécanismes:

1) l'hypothèse la plus couramment admise est celle d'une altération de l'expression du gène par substitution de promoteur suite aux translocations qui interviennent dans le MTC et qui séparent le gène de ses régions régulatrices en 5' (Ye *et al.*, 1995). Ces translocations/fusion ont lieu entre le gène *LAZ3* en 3q27 et soit, les gènes d'Ig sur les chromosomes 14, 2 et 22, soit, d'autres gènes comme le gène *RHO H* en 4p13 codant pour une nouvelle petite protéine G (Dallery *et al.*, 1995), le gène *BOB1/OBF1*, en 11q23, codant pour un coactivateur des facteurs de transcription OCT1 et OCT2, spécifique des cellules B (Gstaiger *et al.*, 1995; Strubin *et al.*, 1995; Galièghe-Zouitina *et al.*, 1996) ou du gène de l'histone H4 (Akasaka *et al.*, 1997).

2) la présence de mutations et/ou délétions souvent bialléliques dans le MTC suggère l'existence d'autres mécanismes (Migliazza *et al.*, 1995, Nakamura *et al.*, 1995&1996).

Cependant: - la protéine produite n'est pas modifiée puisque le codon d'initiation de la traduction est situé dans l'exon 3, qu'aucune mutation ne touche la partie codante et qu'il n'existe pas de protéine de fusion,

- jusqu'à présent, aucune corrélation entre réarrangement et expression du gène *LAZ3* n'a pu être clairement établie (Otsuki *et al.*, 1995; Bajalika *et al.*, 1997).

La fréquence des réarrangements au niveau de la région MTC du gène *LAZ3* dans 30 à 40% des lymphomes diffus à grandes cellules et 6 à 14% des lymphomes folliculaires nous a amené à étudier plus précisément cette région.

Les études cytogénétique et moléculaire effectuées chez un patient (GUI) atteint de LNH et une lignée cellulaire établie (VAL) ont montré l'existence de réarrangements bialléliques au niveau du MTC du gène *LAZ3* : (GUI) présente une monosomie du chromosome 3 et trois microdélétions de 22, 25 et 101 bp au niveau du MTC; (VAL) porte une translocation t(3;4)(q27;p13) sur un allèle et une délétion de 2450 bp dans le MTC sur l'autre allèle.

Afin de localiser d'éventuels éléments de régulation transcriptionnelle dans la région du MTC du gène *LAZ3*, nous avons réalisé des expériences de transfection transitoire d'un plasmide rapporteur CAT, comportant la région du MTC placée en amont du promoteur de la thymidine kinase (tk).

Nous avons entrepris une étude de la conservation phylogénétique du promoteur et du MTC afin de définir des régions bien conservées et donc susceptibles de jouer un rôle important dans la régulation de l'expression du gène *LAZ3*, médiée par cette région. Pour cela, nous avons cloné l'équivalent murin du promoteur et du MTC du gène *LAZ3*.

Nous avons également tenté le clonage des protéines se fixant sur les séquences délétées chez le patient (GUI) par la technique de simple-hybride chez la levure.

Enfin, nous avons étudié, dans les cas dont nous disposons, les conséquences des réarrangements du gène *LAZ3* sur l'expression de ses allèles.

RESULTATS

I - DEUX CAS DE REARRANGEMENTS BIALLELIQUES DANS LE MTC

I.1 Mise en évidence des réarrangements du gène *LAZ3* dans la lignée (VAL):

La lignée (VAL) a été établie par le Dr. C. Bastard à partir de cellules médullaires d'un patient atteint d'un lymphome diffus à grandes cellules. Elle peut servir de modèle de progression tumorale. Son caryotype est le suivant:

49,XX, dup(2)(p12p16), t(3;4)(q27;p11), t(8;14;18)(q24;q32;q21), + 8, + i[der(8q) t(8;14;18)], + 12, dup(12)(q21q24)

Il s'est avéré que la région du chromosome 4 impliquée dans la translocation t(3;4) n'est pas située en 4p11 mais en 4p13 (Dallery *et al.*, 1997). La translocation t(8;14;18) est une translocation complexe impliquant les gènes *MYC*, *BCL2* et les gènes d'Ig. Il s'agit probablement d'une forme secondaire réarrangée de la t(14;18)(q32;q21) présente dans les lymphomes centrofolliculaires.

L'analyse en Southern blot de la lignée (VAL) a montré que le réarrangement de la région 3q27 touche les 2 chromosomes 3: un chromosome est transloqué, tandis que l'autre porte une délétion d'environ 2,4 Kb dans la bande *EcoRI* de 3,3 Kb correspondant au MTC du gène *LAZ3* (Deweindt *et al.*, 1993). La position du point de cassure ainsi que la taille et la localisation précise de la délétion ont été déterminées après clonage et séquençage des deux bandes réarrangées. Le point de cassure de la translocation t(3;4) est situé à 9 pb de celui de la t(3;14) du patient (LAR) (Kerckaert *et al.*, 1993). Nous avons ensuite montré que la délétion sur l'autre chromosome mesure 2450 pb, qu'elle débute environ 100 pb derrière le premier exon du gène *LAZ3/BCL6* et qu'elle se termine à environ 300 bp du site *EcoRI* terminant le MTC (Figure 8, p 65 et figure 12 p 78-79).

1.2 Un autre réarrangement biallélique au niveau du MTC du gène *LAZ3/BCL6* chez un patient

L'étude cytogénétique de l'ADN de patients atteints de L.N.H., réalisée par le Dr. C. Bastard., a mis en évidence chez l'un d'entre eux (GUI), une monosomie 3, sans autre anomalie visible en 3q27. Par Southern blot, une délétion d'environ 200 pb dans le MTC fut suspectée sur

l'unique chromosome 3. Le clonage et le séquençage de la bande réarrangée (réalisés par S. Quief) ont ensuite mis en évidence trois microdélétions de 101, 25 et 22 pb. également situées dans le MTC. Il est intéressant de remarquer que ces délétions sont situées à proximité de différents points de cassure (Figure 8, p 65 et figure 12, p 78-79).

Aucune séquence similaire aux signaux de recombinaison heptamère-nonamère n'a été identifiée à proximité de ces délétions, leur formation ne peut donc pas être attribuée à une erreur de la recombinaison des immunoglobulines.

D'autres altérations souvent bialléliques incluant des mutations et/ou des délétions ont aussi été localisées par PCR-SSCP dans cette région dans 73% des lymphomes diffus à grandes cellules et dans 47% des lymphomes folliculaires. Une zone de 730 pb située en aval du premier exon non codant, qui est mutée dans 28 cas sur 29 a été définie comme un *major cluster* (Migliazza *et al.*, 1995) (noté MMC pour *Major Mutation Cluster* sur la figure 8a, p 65). D'autres réarrangements bialléliques du gène *LAZ3/BCL6* ont été mis en évidence chez 7 patients atteints de L.N.H., dont 3 présentent une délétion (de taille indéterminée) au niveau du MTC (Nakamura *et al.*, 1995). Une autre étude montre l'existence d'une délétion de 1,5 kb dans cette même région sur l'allèle non réarrangé d'un patient avec une translocation t(3;22) (Nakamura *et al.*, 1996), laissant présumer l'importance de cette région dans la pathologie.

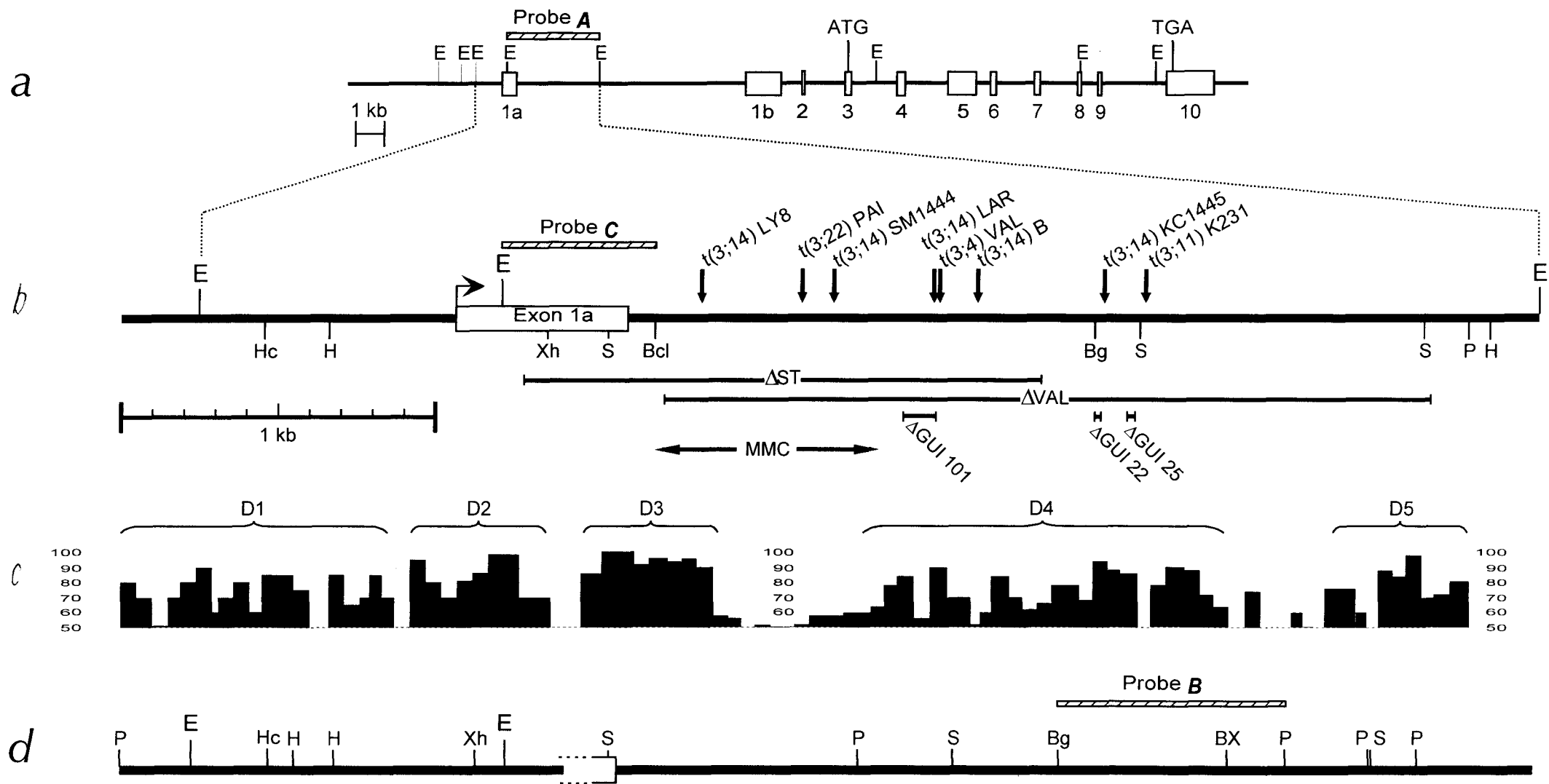


Figure 8: Cartographie des séquences humaines et murines analysées.

a - Organisation génomique du gène *LAZ3/BCL6* humain. b - carte de restriction du promoteur et du MTC humain. Les flèches indiquent les points de cassure publiés.

MMC: *Major Mutation Cluster*, région préférentiellement mutée décrite par Migliazza *et al.*, 1996. Les délétions sont représentées par des segments.

c - Histogramme illustrant les homologies entre les séquences humaine et murine présentées en b et c. Seuls les pourcentages supérieurs à 50% sont représentés.

d - Carte de restriction de la séquence murine correspondant à la séquence humaine présentée en a.

II - EXISTE-T-IL DES ELEMENTS REGULATEURS DE TRANSCRIPTION DANS LE MTC?

Afin de localiser d'éventuels éléments de régulation transcriptionnelle dans la région du MTC du gène *LAZ3/BCL6*, des expériences de transfection transitoire ont été réalisées à l'aide d'un plasmide comportant la région du MTC germinale ou celle du patient (GUI) placée en amont du promoteur de la thymidine kinase (tk), suivi du gène rapporteur de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT). Les constructions utilisées sont présentées figure 9, ci-dessous. L'activité CAT obtenue à partir du plasmide pBLCAT2 vide sert de référence aux autres constructions. Cette approche fonctionnelle a pu être réalisée dans les lignées cellulaires HeLa et NIH3T3.

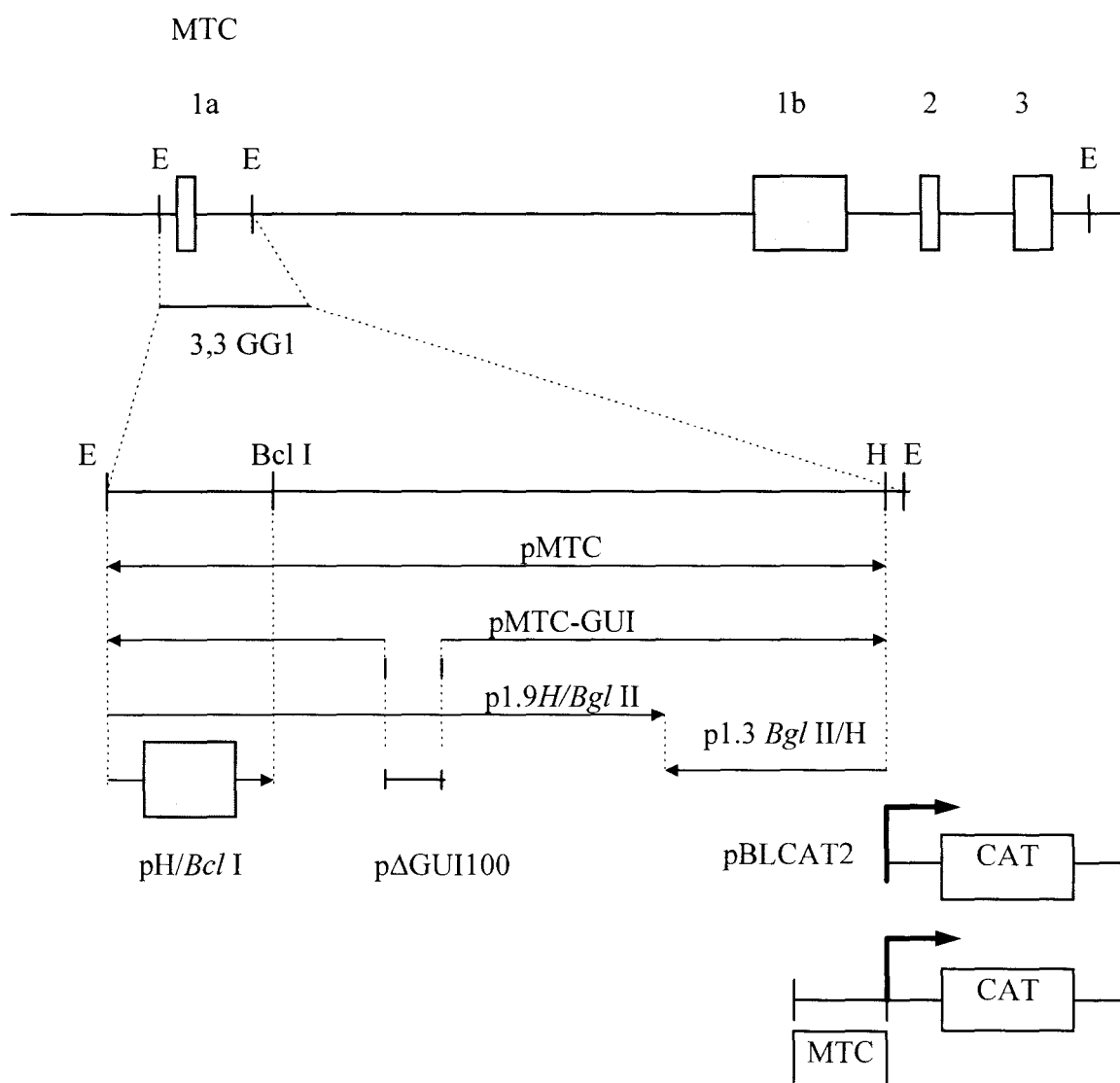


Figure 9 : Schéma des différentes constructions utilisées en transfection transitoire.

CAT : gène rapporteur de la chloramphénicol acétyl transférase. E: *EcoRI*, H: *HindIII*.

II. 1 Transfections dans la lignée cellulaire HeLa

Les premières expériences ont été effectuées dans les cellules HeLa par la technique de transfection au DOTAP (Boehringer), et la normalisation des extraits par rapport à la mesure de leur DO à 280 nm, suivie d'un test CAT et du comptage de la radioactivité par scintillation (cf Matériel et Méthodes). Les résultats obtenus, présentés figure 10-A et 10-B p 68 et 69 et figure 11, p 72 montrent un effet répresseur de la région MTC (construction pCAT-MTC_S) sur la transcription d'environ 70% par rapport au témoin pBLCAT2. Cet effet dépend de l'orientation du fragment puisque l'effet répresseur du même fragment orienté en sens inverse de transcription n'est plus que de 20% (construction pCAT-MTC_{AS}). Une partie de cet effet répresseur provient des séquences qui sont délétées dans le MTC du patient (GUI) car leur absence diminue le taux de répression du MTC ceci uniquement si le sens de transcription est respecté (constructions pMTC-GUI contre pCAT-MTC). Les résultats obtenus avec la construction contenant uniquement la séquence délétée de 101 pb chez (GUI) ne permettent pas de conclure quant à son rôle sur la transcription puisqu'elle est soit répressive, soit activatrice selon les deux séries d'expériences. Deux sous-fragments du MTC ont aussi été testés: la construction p1.9H/Bg/II comprenant la partie 5' du MTC et la construction p1.3Bg/II/H comprenant l'autre partie du MTC à partir de la séquence G22. Le sous-fragment 1.3Bg/II/H a un effet activateur d'environ 50% par rapport au témoin. Il n'est pas possible de conclure sur le rôle du premier étant donné l'écart-type entre les valeurs obtenues.

La technique de transfection à la lipofectamine et l'utilisation d'un vecteur de cotransfection, pSVLuc, comportant le gène rapporteur de la luciférase, ont été employées par la suite (cf Matériel et Méthodes). Les résultats obtenus dans la lignée HeLa sont présentés figure 10-B, p 69. Le faible nombre de points réalisés est dû à des problèmes de contaminations ou une faible efficacité de transfection de certaines constructions. Le MTC n'a cette fois plus d'effet sur la transcription quand le fragment est orienté dans le sens de transcription. En sens contraire, il réprime d'environ 50% la transcription dans 4 séries d'expériences mais montre une faible capacité activatrice dans 2 séries. L'activité du fragment 1.9H/Bg/II est équivalente à celle du témoin, il ne joue donc apparemment aucun rôle sur la transcription. Le sous-fragment H/Bc/II du MTC, comprenant une partie de l'exon 1 et le début de l'intron 1, montre une capacité activatrice de transcription de 50 à 300%. Il n'est pas possible d'évaluer le rôle des délétions (GUI) dans ces séries étant donné le faible nombre de points réalisés avec les constructions pMTC-GUI.

Tranfection dans les cellules HeLa par DOTAP

(A1)

| | pBLCAT2 | pCAT-MTC _S | pCAT-MTC _{AS} | p1.9H/BgII | p1.3H/BgII | pMTC-GUI _S | pMTC-GUI _{AS} | pGUI Δ 100 |
|-------------|---------|-----------------------|------------------------|------------|------------|-----------------------|------------------------|-------------------|
| série 1 | 100 | 17 | 62 | - | - | - | - | - |
| série 2 | 100 | 49 | 62 | 69 | 123 | - | - | - |
| série 3 | 100 | 44 | 16 | 56 | 180 | - | - | - |
| série 4 | 100 | 35 | 16 | 71 | 140 | - | - | - |
| série 5 | 100 | 30 | 63 | 154 | 139 | 50 | 66 | - |
| série 6 | 100 | 31 | 79 | 172 | 163 | 78 | 89 | 215 |
| série 7 | 100 | 23 | 54 | - | - | 60 | 76 | 56 |
| moyenne | 100 | 33 | 71 | 104 | 149 | 63 | 77 | 136 |
| écart moyen | 0 | 9 | 29 | ns | 18 | 10 | 8 | ns |

(A2)

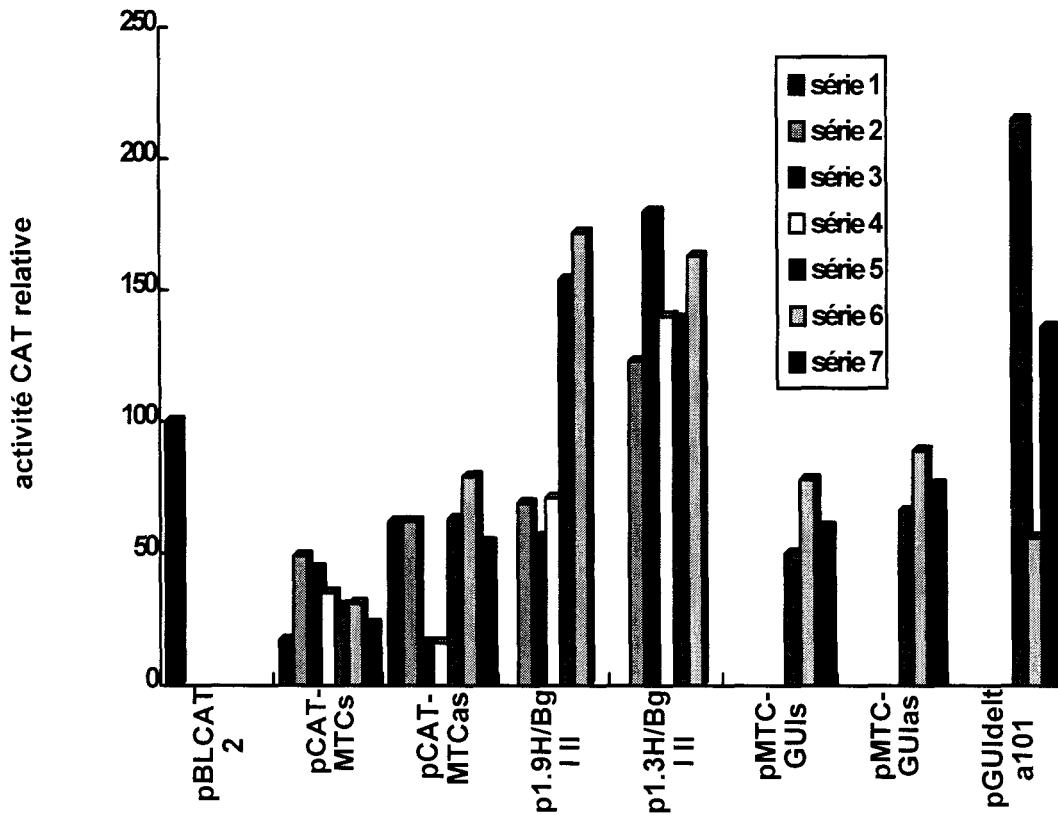


Figure 10.A : Effets des séquences du MTC en transfection transitoire par DOTAP dans les cellules HeLa.

L'activité des différentes constructions pour chaque série d'expérience est présentée sous forme de tableau (A1) et de graphique (A2). L'activité CAT est exprimée en pourcentage par rapport à celle du plasmide témoin pBLCAT2 qui est ramenée à 100. Chaque valeur est la moyenne de deux à quatre points par série. Abréviations : ns : non significatif, - : non déterminé.

Transfection dans les cellules HeLa par lipofectamine

(B1)

| | pBLCAT2 | pCAT-MTC _s | pCAT-MTC _{AS} | p1.9H/Bgl II | p1.3H/Bgl II | pMTC-GUI _s | pMTC-GUI _{AS} | pGUIΔ100 | H/Bcl1 |
|-------------|---------|-----------------------|------------------------|--------------|--------------|-----------------------|------------------------|----------|--------|
| série 1 | 100 | - | 139 | - | - | 34 | 52 | - | - |
| série 2 | 100 | 86 | 32 | 100 | - | - | - | - | - |
| série 3 | 100 | 75 | 47 | 97 | 160 | - | 72 | 94 | - |
| série 4 | 100 | 110 | 47 | - | - | - | - | - | 325 |
| série 5 | 100 | - | 124 | 110 | - | - | - | 145 | 300 |
| série 6 | 100 | 108 | 44 | - | - | - | - | - | 154 |
| moyenne | 100 | 95 | 72 | 102 | 160 | 34 | 62 | 120 | 260 |
| ecart moyen | 0 | 14 | ns | 5 | 0 | 0 | 10 | ns | ns |

(B2)

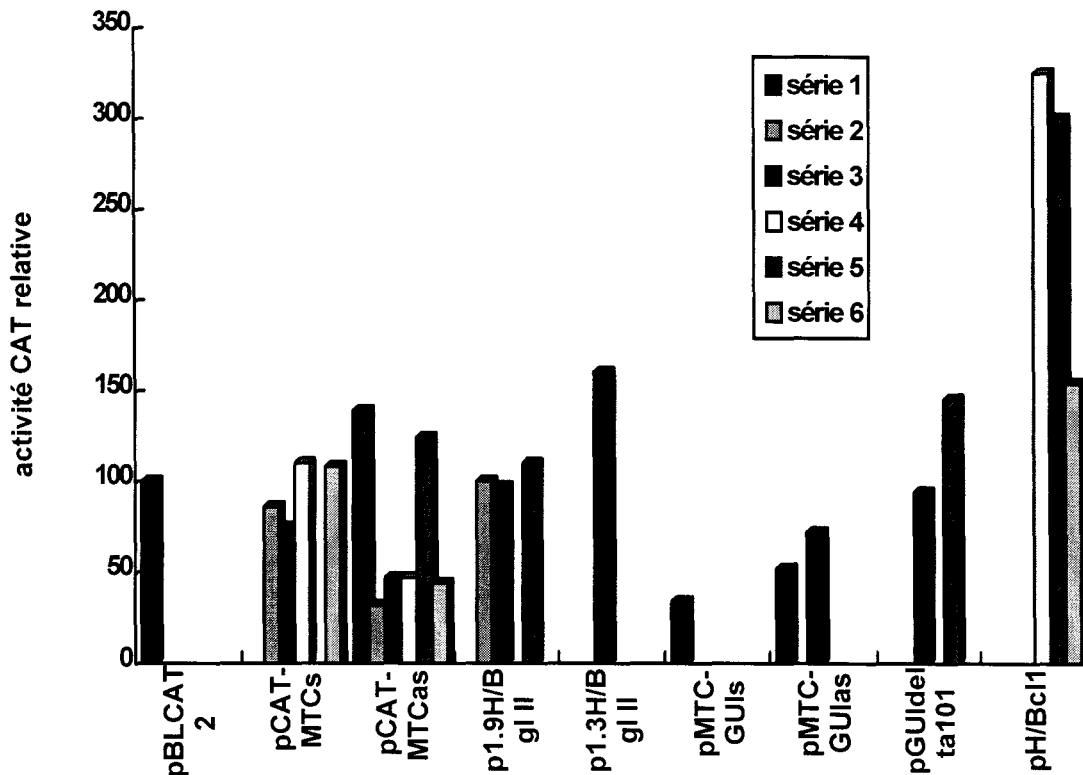


Figure 10.B : Effets des séquences du MTC en transfection transitoire par lipofectamine dans les cellules HeLa.

Après correction selon l'activité du vecteur pSVLuc, l'activité CAT a été mesurée par comptage à scintillation liquide. Elle est exprimée en pourcentage par rapport à celle du plasmide témoin pBLCAT2 qui est ramenée à 100. L'activité des différentes constructions pour chaque série d'expérience est présentée sous forme de tableau (B1) et de graphique (B2). Abréviations : ns : non significatif, - : non déterminé.

Transfections dans les cellules NIH3T3 par DOTAP

(C1)

| | pBLCAT2 | pCAT-MTC _s | pCAT-MTC _{AS} | pMTC-GUI _s | pMTC-GUI _{AS} | pGUI Δ 100 |
|-------------|---------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|
| série 1 | 100 | 34 | 30 | 26 | 37 | nd |
| série 2 | 100 | 50 | 82 | 57 | 50 | 173 |
| série 3 | 100 | 77 | 112 | 48 | 65 | 129 |
| moyenne | 100 | 54 | 75 | 44 | 51 | 151 |
| écart moyen | 0 | 16 | 30 | 12 | 10 | 22 |

(C2)

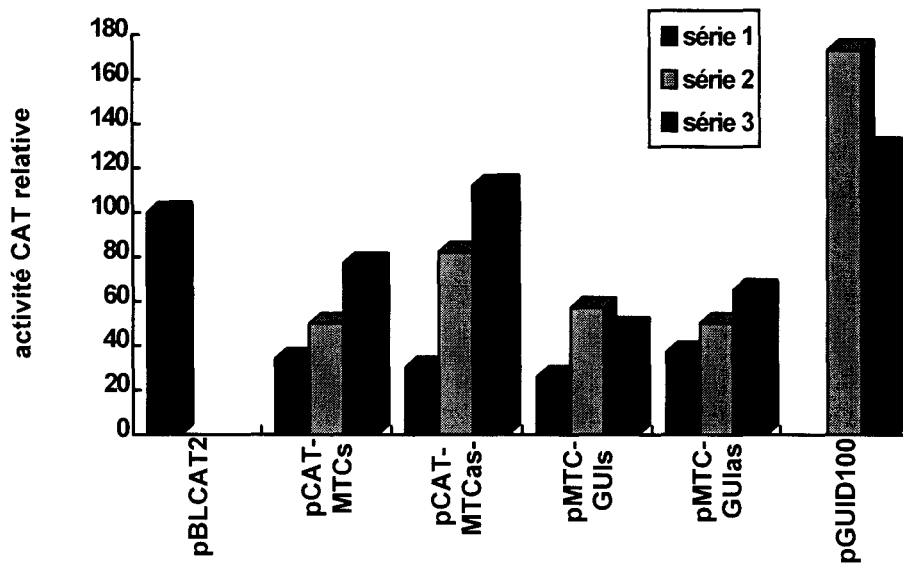


Figure 10.C : Effets des séquences du MTC en transfection transitoire par DOTAP dans les cellules NIH3T3. L'activité CAT est exprimée en pourcentage par rapport à celle du plasmide témoin pBLCAT2 qui est ramenée à 100. L'activité des différentes constructions pour chaque série d'expérience est présentée sous forme de tableau (C1) et de graphique (C2). Chaque valeur est la moyenne de deux à quatre points par série. Le comptage du pourcentage d'acétylation a été effectué par scintillation liquide. Abréviations : ns : non significatif, - : non déterminé.

Transfection dans les cellules NIH3T3 par lipofectamine

(D1)

| | pBLCAT2 | pCAT-MTCs | pCAT-MTC _{AS} | pMTC-GUI _s | pMTC-GUI _{AS} | pGUIΔ100 | pH/Bcl I | p1.9H/Bgl II | p1.3H/Bgl II |
|-------------|---------|-----------|------------------------|-----------------------|------------------------|----------|----------|--------------|--------------|
| série 1 | 100 | 50 | 106 | 17 | 80 | 287 | 798 | - | - |
| série 2 | 100 | 50 | 74 | 10 | - | 99 | 350 | 158 | 286 |
| série 3 | 100 | 35 | 72 | 20 | 28 | 40 | 220 | 89 | 162 |
| série 4 | 100 | - | - | 7 | 11 | 52 | 170 | 53 | 70 |
| série 5 | 100 | 44 | 48 | 5 | 11 | 67 | 160 | 49 | 107 |
| moyenne | 100 | 45 | 75 | 12 | 33 | 109 | 340 | 87 | 156 |
| écart moyen | 0 | 5 | 16 | 5 | 24 | ns | ns | 36 | 68 |

(D2)

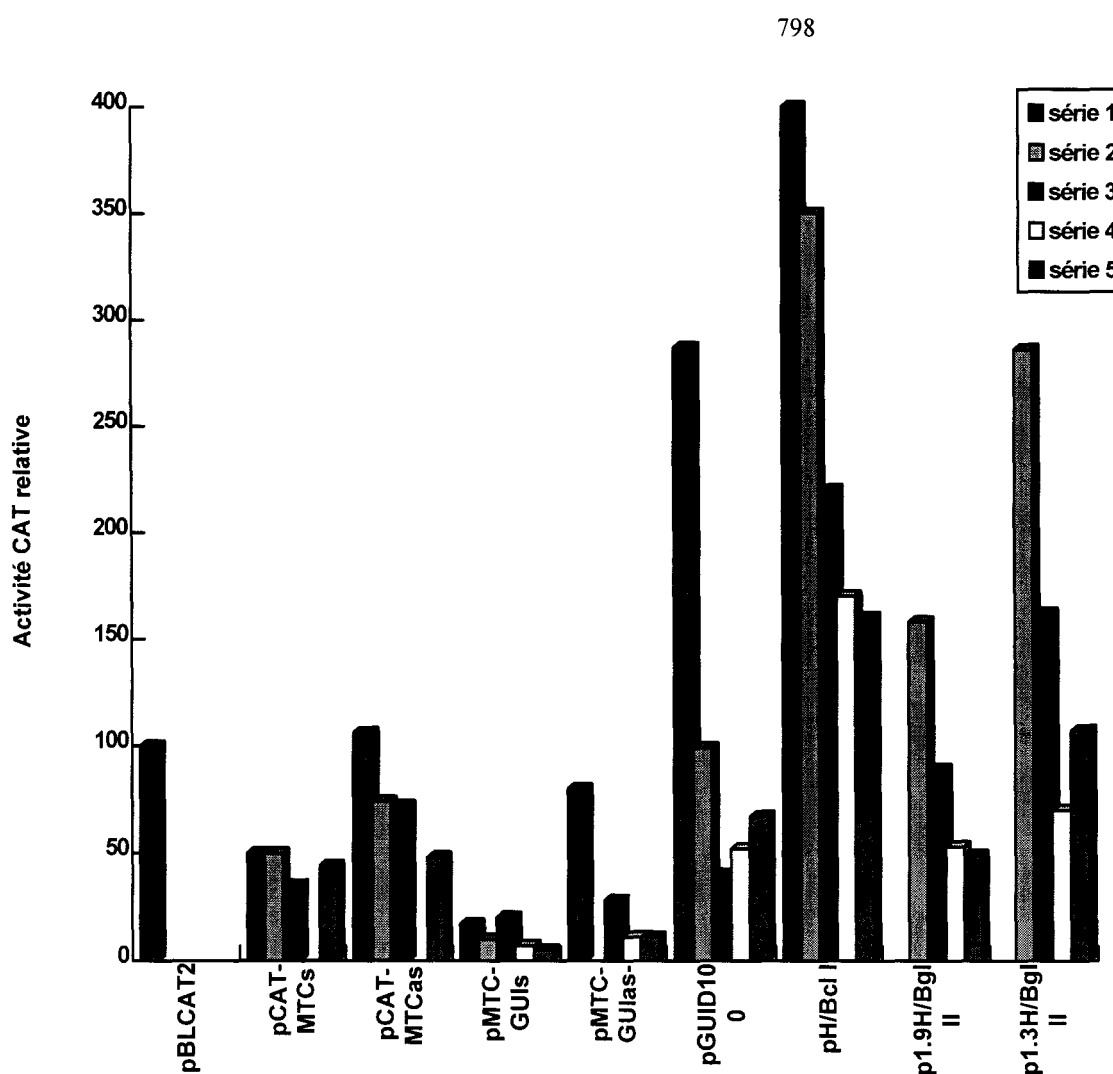
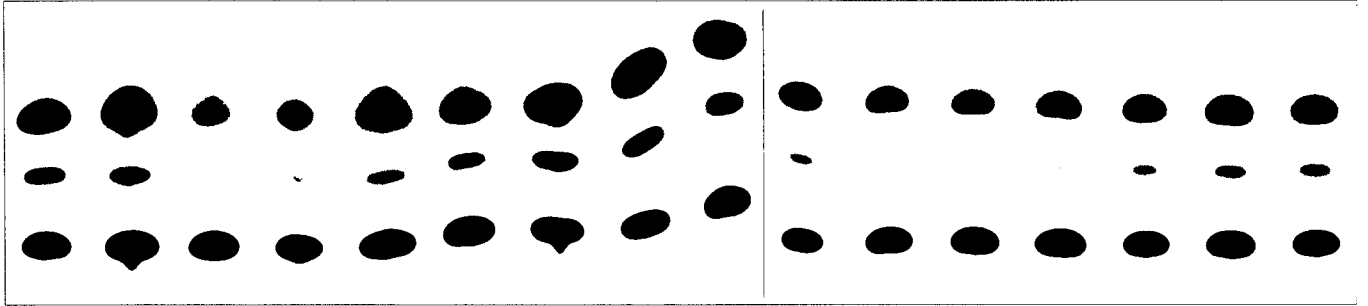


Figure 10.D : Effets des séquences du MTC en transfection transitoire par lipofectamine dans les cellules NIH3T3. Après correction selon l'activité du vecteur pSVLuc, l'activité CAT a été mesurée par comptage à scintillation liquide pour les séries 1 à 3, et par comptage au Phosphorimager pour les séries 4 et 5.

Pourcentage
d'acétylation

24,5 20,3 6,4 8,6 13,6 17 36,6 38 37,7 30 15,5 10,4 9,4 15,4 15,4 17



pBLCAT2

pCATMTC_S

pCATMTC_{AS}

p1.9H/Bgl II

p1.3Bgl II/H

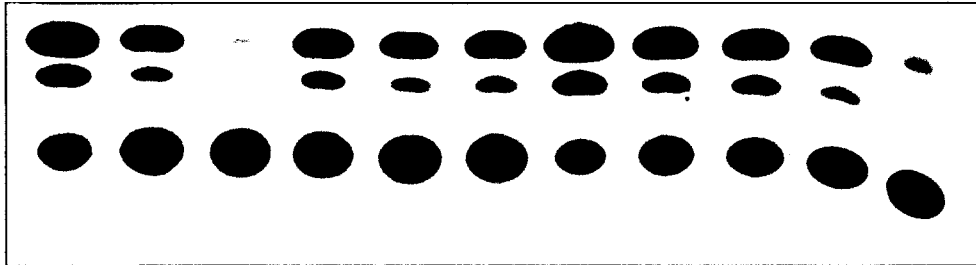
pMTC-GUI_S

pMTC-GUI_{AS}

(A) HeLa

Pourcentage
d'acétylation

73 20,4 2,5 30,7 19 25 76 51 47 22 5



pBLCAT2

pMTC-GUI_S

p1.9H/Bgl II

pH/Bcl I

p1.3Bgl II/H

pMTC-GUI_{AS}

pCATMTC_S

pΔGUI100

pCATMTC_{AS}

(B) NIH 3T3

Figure 11 : CAT essai représentatif des résultats obtenus dans la lignée HeLa (A) et NIH3T3 (B). Le pourcentage d'acétylation de chaque point est indiqué.

Le fragment 1.3*Bg*/II/H conserve un effet activateur de transcription de 60%, toutefois ce résultat ne provient que d'une seule série d'expériences.

Dans les cellules HeLa, l'activité du MTC sur la transcription étant différente selon la technique utilisée, il est difficile de conclure. Concernant les séquences délétées dans le MTC du patient (GUI), selon la technique de transfection au DOTAP, elles interviendraient dans l'activité répressive du MTC sur la transcription observée. Le sous-fragment 1.9H/*Bg*/II du MTC n'a pas d'effet sur la transcription cependant, il contient le fragment H/*Bc*/II qui à lui seul augmente la transcription de 2,5 fois en moyenne. Enfin, le fragment 1.3*Bg*/II/H qui contient les séquences G22 et G25 active la transcription de 1,5 fois. Ce fragment pourrait contenir des séquences activatrices compensant l'effet des séquences G22 et G25.

II.2 Transfections dans la lignée murine NIH3T3

Les mêmes expériences ont été réalisées dans la lignée NIH3T3 par les techniques DOTAP et lipofectamine en utilisant le vecteur pSVluc comme témoin de transfection dans les deux cas (figure 10 C et D, p 70-71 et figure 11, p 72).

En ce qui concerne les résultats obtenus par DOTAP (figure 10C, p 70), on note un effet répresseur du MTC de 50% en moyenne par rapport au témoin dans le sens de transcription. Les valeurs obtenues par la même région clonée en sens inverse ne permettent pas de conclure (écart-type trop important). Les délétions (GUI) ne modifient quasiment pas le taux de répression. La séquence Δ (GUI)101 seule, active la transcription de 50% en moyenne.

Par la technique de transfection utilisant la lipofectamine, les résultats obtenus avec le MTC germinal sont concordants avec les précédents. En revanche, la répression par le fragment porteur des délétions (GUI) est beaucoup plus prononcée (près de 90% de répression). Cet effet est moins important en orientation inverse (70%). Ces résultats suggèrent que les séquences délétées chez le sujet (GUI) sont des séquences activatrices dans la lignée NIH3T3. Le rôle de la séquence Δ (GUI)101 est difficile à interpréter puisque son effet varie selon les séries. Il en est de même pour les fragments 1.9H/*Bg*/II et 1.3*Bg*/II/H. En revanche, le fragment H/*Bc*/II montre une capacité activatrice de transcription de 2 à 3 fois.

Dans la lignée NIH3T3, le MTC est capable de réprimer la transcription de 50% s'il est orienté dans le sens de transcription. La présence des délétions dans le MTC du patient (GUI) augmente cette capacité répressive de 30 à 40% quand le fragment est orienté dans le sens de transcription. Les séquences délétées ont donc probablement un rôle activateur sur la transcription

dans la lignée NIH3T3 (contrairement aux cellules HeLa). Pourtant la séquence $\Delta(\text{GUI})101$ seule n'est activatrice que dans une série d'expériences. Comme dans les cellules HeLa, le fragment *H/BcII* est activateur de 2 à 3 fois, tandis que le fragment 1.9*H/Bg/II* n'a quasiment pas d'effet.

Des essais de transfections dans différentes lignées de type B (Raji, Karpas 562 et Karpas 422) et la lignée T HSB2 ont été tenté par DOTAP ou lipofectamine puis par électroporation en faisant varier la quantité de cellules, la quantité de plasmide ou la dose de lipofectamine. Malheureusement ces tests n'ont pas permis d'obtenir des taux de transfection corrects dans ces cellules. Des expériences de transfection par lipofectamine dans les lignées COS-1 (cellules de rein de singe) et HT29 (tumeur du colon) n'ont pas montré de différence significative entre les différentes constructions par rapport au témoin pBLCAT2.

Ces expériences de transfection n'ont pas permis de mettre en évidence un rôle prépondérant de la région MTC sur la transcription. Etant donné les différences peu significatives entre les valeurs obtenues, il n'est possible que de donner une tendance de l'effet des constructions sur la transcription. La région du MTC tend à diminuer l'activité d'un promoteur hétérologue (en l'occurrence tk) dans les deux lignées. Le fragment 1.9*H/Bg/II* n'a pas d'effet sur la transcription dans les deux lignées étudiées. Le fragment *H/BcII* en 5' du MTC est activateur de 2 à 3 fois dans les deux lignées. Les délétions (GUI) renforcent l'effet répresseur du MTC dans la lignée NIH3T3, cet effet est moindre dans la lignée HeLa. Il aurait été intéressant d'étudier l'effet de ces délétions ou d'autres réarrangements sur la transcription du gène *LAZ3*, mais nous ne disposons pas de matériel pour réaliser une lignée cellulaire à partir du patient (GUI) ou d'autres patients. Concernant la lignée (VAL), le gène *LAZ3* s'exprime malgré la présence d'un double réarrangement dans le MTC.

Les expériences de transfection réalisées ne permettant pas de dégager les régions du MTC importantes dans la régulation de la transcription, une étude de la conservation phylogénétique du promoteur et du MTC a été réalisée afin de définir des domaines bien conservés et donc susceptibles de jouer un rôle dans la régulation de l'expression du gène LAZ3/BCL6.

III - COMPARAISON DE SEQUENCES DES REGIONS 5' NON TRADUITES DU GENE *LAZ3/BCL6* HUMAIN ET MURIN.

Nous avons pu observé que la région MTC, pourtant en majeure partie intronique, est très conservée entre les espèces, par l'utilisation de plusieurs sondes dérivant du MTC qui ont révélé un important signal d'hybridation sur un *zooblot* (résultats non publiés). Ce résultat a été publié par l'équipe de Baron *et al.*, qui montre en 1993, la conservation phylogénétique de la région du point de cassure sur le chromosome 3 entre le lapin, le rat, le veau et le singe. Afin de préciser le degré de conservation du MTC, nous avons cloner son équivalent chez la souris.

III.1 Clonage de l'équivalent chez la souris du MTC et du promoteur du gène *LAZ3/BCL6*.

Une banque d'ADN génomique de souris (donnée gracieusement par A. Bègue, Institut Pasteur de Lille) a été criblée avec le fragment *EcoRI* de 3,3 Kb du MTC humain (Sonde A, figure 8, p 65) dans des conditions d'hybridation peu stringentes (cf Matériel et Méthodes). Un seul clone (GM38) a été obtenu, un fragment *EcoRI* de 3,1 Kb s'hybridant avec la sonde A a été sous-cloné dans un vecteur pBluescript (Stratagène) puis séquencé (plasmide Q2). L'extrémité 5' de ce fragment commençait dans le MTC, au niveau de la séquence correspondant à la délétion $\Delta(\text{GUI})22$. Le fragment *PstI* de 0,7 Kb provenant de la partie 5' du plasmide Q2 a été utilisé comme sonde (sonde B) pour cribler à nouveau la banque dans des conditions stringentes. Deux clones ont été obtenus (NIH2A et NIH2B), un fragment *EcoRI* de 3.2 Kb et un fragment *PstI* de 1.9 Kb s'hybridant avec la sonde B ont été sous-clonés et séquencés (plasmides 2A et B6). Ces fragments débutaient plus en 5' que Q2 mais ne contenaient pas l'extrémité 5' du MTC. Le fragment *HindIII/BclI* du MTC humain (sonde C) a été hybridé sur l'ADN des deux phages NIH2A et NIH2B et a permis d'identifier et sous-cloner une bande *PstI* de 1.6 Kb du clone NIH2B (plasmide E6). La séquence a révélé que ce fragment contenait une partie du promoteur et du MTC du gène *LAZ3/BCL6* murin.

L'alignement des séquences des différentes constructions a été réalisé par le programme NALIGN du logiciel PCGENE. Une représentation schématique est présentée figure 8c, p 65. L'alignement des séquences révèle l'existence de domaines très conservés entre l'Homme et la Souris (figure 8c, p 65 et figure 12 p 78-79). La totalité de la séquence humaine comprenant le

promoteur et le MTC du gène (4310 pb) présente une homologie de 79% avec son équivalent murin (4138 pb).

III.2 Conservation de séquence du promoteur.

Le premier domaine conservé **D1**, qui correspond au premier Kpb de l'alignement, se superpose avec la région promotrice humaine du gène *LAZ3/BCL6* déjà caractérisée (Ohashi *et al.*, 1995). La comparaison de séquence avec son équivalent murin montre une homologie de 79% (Figure 8, p 65). Plusieurs éléments de réponse déjà décrits sont très conservés chez la souris: deux *E-box*, un site de reconnaissance pour respectivement les facteurs de transcription LAZ3/BCL6, Sp1 et GATA-1 sont entièrement conservés; en revanche, certains éléments de réponse n'existent que chez la souris. Par exemple il existe un deuxième site Ap1 et des sites potentiels pour les facteurs PEA 3, SRF, PU1 et Ap3 chez la souris (voir Figure 12, p 78-79). Deux *CCAAT boxes* (positions 511 et 666 figure 12) et quatre *TATA boxes* potentielles (positions 60, 310, 1004 et 1118, figure 12) ont été localisées chez l'homme. L'une d'entre elles est entièrement conservée chez la souris mais ne correspond pas à la *TATA box* identifiée chez l'homme par Ohashi *et al.*, 1995. Cette dernière n'a d'ailleurs pas d'équivalent chez la souris.

La région autour du site d'initiation de la transcription appartient au domaine conservé **D2** qui montre 83% d'homologie avec la séquence murine. Le début de l'ADNc murin publié commence 491 bp en aval de l'humain. Le site d'initiation de la transcription chez la souris n'est pas connu mais il est possible qu'il soit différent de celui observé chez l'homme.

III.3- Conservation de séquence du MTC.

Les résultats de l'alignement des séquences humaine et murine correspondant au MTC font état d'une importante homologie de 79%, aussi importante que celle du promoteur. Cette étude a permis de délimiter dans le MTC trois domaines conservés: **D3** (d'environ 400 pb), contenant la fin du premier exon non codant et les 250 bp du premier intron; **D4** (d'environ 1,2 kb), contenant les trois délétions (GUI) et **D5** (d'environ 350 pb), contenant la fin de la délétion (VAL) (Figure 8c, p 65 et figure 12, p 78-79).

Le domaine D3 montre 94 % d'homologie avec son équivalent murin. Ce taux d'homologie n'est pas seulement dû à la présence de séquences exoniques souvent bien conservées puisque sans la séquence de l'exon 1A, le taux d'homologie du domaine D3 reste de

90%. Deux sites consensus Stat6 entièrement conservés susceptibles d'être reconnus par la protéine LAZ3/BCL6 sont présents dans le premier exon non codant. Ils pourraient intervenir dans un processus d'auto-régulation du gène *LAZ3/BCL6*. D'autant plus qu'ils sont situés dans le fragment *H/BclI* transcriptionnellement actif dans les cellules HeLa et NIH3T3.

Dans le domaine D4, les séquences correspondant à une délétion chez le patient GUI appartiennent à de petits blocs de forte homologie (92%). Il est important de noter que le fragment de 22 bp est homologue à 100% à celui de la souris, celui de 25 bp est identique à deux bases près (en plus chez la souris) et celui de 101 bp est un peu moins conservé mais reste homologue à 81%. Les délétions (GUI) ne correspondent pas à des séquences reconnues par des facteurs de transcription, pourtant ces délétions sont les seules anomalies en 3q27 de l'allèle unique de ce patient.

Le domaine D5 situé à la fin du MTC montre 83% d'homologie, c'est dans cette région que se termine la délétion (VAL).

Une recherche de séquences répétées a été effectuée. Aucune séquence répétée directe ou inversée de plus de 15 pb n'a été trouvée dans la séquence humaine. Trois séquences répétées directes sont présentes dans la séquence murine. Des séquences palindromiques ont été localisées dans les deux séquences, l'une d'entre elle est superposée en partie à la séquence délétée (GUI)²² et entièrement conservée.

La recherche de sites connus pour intervenir dans la recombinaison au cours des translocations chromosomiques révèle l'existence de plusieurs séquences *Chi-like* notamment à proximité du point de translocation t(3;11) de la lignée K231 (Galiègue-Zouitina *et al.*, 1996). Une autre séquence *Chi-like* se situe une quarantaine de bases en amont du début de la délétion (VAL) (voir figure 12, p 78-79). Ces sites sont très proches du site de fixation du complexe C1 ou de la protéine bp45 (Jaeger *et al.*, 1994). Un site reconnu par la Transline a déjà été identifié à proximité du point de cassure d'une t(3;14) (Aoki *et al.*, 1995). Un autre correspondant exactement au consensus GCC(A/T)(G/C)(G/C)(A/T) est localisé juste en amont de la délétion décrite par Nakamura *et al.*, en 1996. Deux autres identiques à une base près sont localisés en position 2323-2330 à environ 200 bp en amont de la délétion (GUI) de 101 pb et en position 4127-4134 à 90 pb de la fin de la délétion (VAL) (voir figure 12, p 78-79). Mais jusqu'à présent le rôle de la Transline dans la genèse de délétions n'a pas été montré.

Légende de la figure 12 p 78-79: Les éléments régulateurs potentiels sont soulignés, ceux entièrement conservés sont encadrés. (+1) : site d'initiation de la transcription chez l'homme. ▽: bordures des délétions, ▼: points de translocation. La fin du premier exon est indiqué par S.D.(site donneur d'épissage).

IV - DES PROTEINES D'EXTRAITS NUCLEAIRES DE CELLULES B DE ET CELLULES HeLa RECONNAISSENT LES SEQUENCES LES MIEUX CONSERVEES DELETEES CHEZ LE PATIENT (GUD).

Afin de vérifier si les séquences délétées les mieux conservées G22 et G25 sont reconnues spécifiquement par des protéines, des expériences de gel-retard ont été réalisées avec des extraits nucléaires de cellules de la lignée HeLa, qui exprime peu d'ARNm *LAZ3*, des extraits nucléaires de cellules de deux lignées B: Raji, qui exprime un taux élevé d'ARNm *LAZ3* et Rec, qui n'exprime pas d'ARNm *LAZ3*. Les résultats obtenus sont montrés figure 13 A et B, p 81. Les complexes retardés A, B, C, D et E disparaissent en présence d'un excès de compétiteur froid spécifique mais sont toujours présents en présence d'un compétiteur froid non spécifique (oligonucléotide Pu-1) prouvant qu'ils sont bien spécifiques des séquence. Le complexe retardé B obtenu avec la sonde G22 et les complexes retardés C, D et E obtenus avec la sonde G25, sont observés dans les trois lignées suggérant que les protéines complexées sont exprimées de façon ubiquitaire et indépendamment de l'expression du gène *LAZ3*. En revanche, une bande retardée A apparaît uniquement dans la lignée Raji, avec la sonde G22. La ou les protéines de ce complexe pourrait jouer un rôle dans l'expression du gène *LAZ3* dans cette lignée.

La bande retardée un peu plus basse qui apparait avec les complexes B et C, lors de la compétition avec les oligos G22 ou G25 froids, pourrait provenir d'une compétition insuffisante d'un complexe de protéines se fixant sur ces séquences: l'une de ces protéines aurait une affinité plus importante pour sa séquence d'ADN cible et ne serait pas déplacée par la quantité d'oligonucléotide froid utilisée.

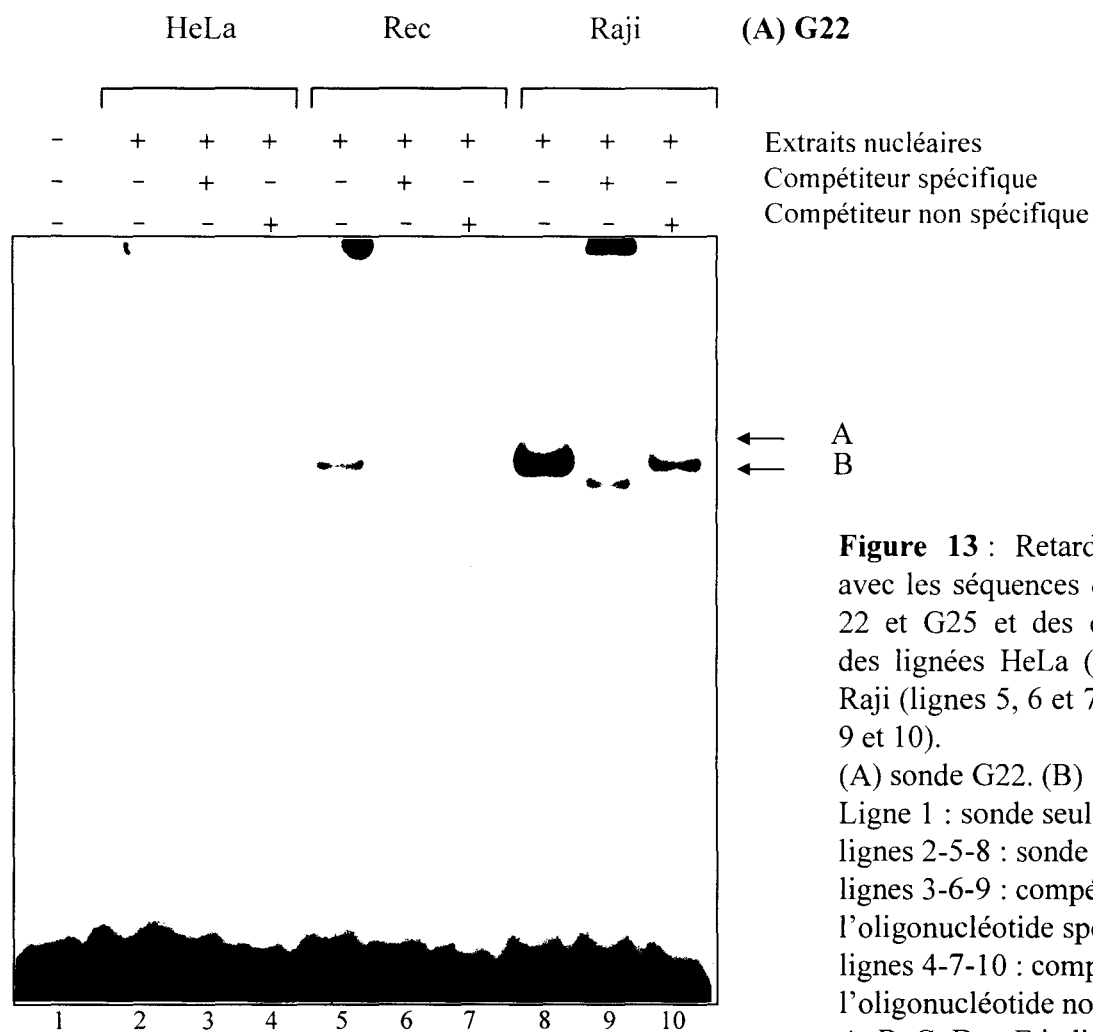


Figure 13 : Retard en gel effectué avec les séquences des délétions GUI 22 et G25 et des extraits nucléaires des lignées HeLa (lignes 2, 3 et 4), Raji (lignes 5, 6 et 7) et Rec (lignes 8, 9 et 10).

(A) sonde G22. (B) sonde G25.

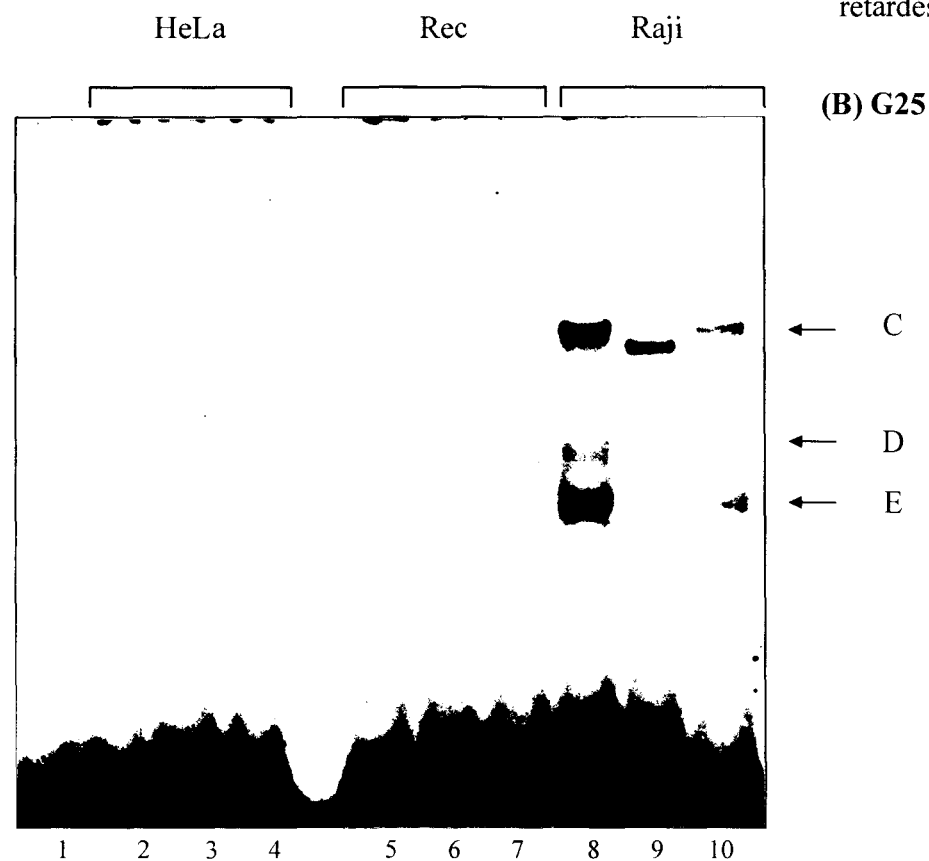
Ligne 1 : sonde seule ;

lignes 2-5-8 : sonde plus extrait ;

lignes 3-6-9 : compétition avec l'oligonucléotide spécifique froid ;

lignes 4-7-10 : compétition avec l'oligonucléotide non spécifique PU1.

A, B, C, D et E indique les complexes retardés spécifiques.



V- ESSAI DE CARACTERISATION DES PROTEINES FIXANT LES SEQUENCES G22 ET G25.

La technique du simple-hybride a été choisie pour l'identification des protéines se fixant sur les séquences G22 et G25. En effet, ce système, dérivé du double-hybride, permet le clonage de nouveaux gènes codant des protéines reconnaissant une séquence cible d'ADN en utilisant un test génétique *in vivo* chez la levure (Wang & Reed, 1993; Li & Herskowitz, 1993; Gstaiger *et al.*, 1995).

V.1 Principe du simple-hybride

Dans un premier temps, la séquence d'ADN cible est clonée dans un vecteur en amont d'un gène rapporteur. Plusieurs types de vecteurs peuvent être utilisés: soit pHISi dont le gène rapporteur *HIS3* code l'histidine, soit pLacZi dont le gène rapporteur est *lacZ*. Le vecteur est ensuite intégré au génome de la levure par recombinaison homologe après transformation (figure 14, p 83).

Dans un deuxième temps, la nouvelle souche ainsi formée est transformée par une banque d'ADNc clonée en fusion avec le domaine transactivateur de GAL4 (vecteur pACT). Les transformants sont étalés sur milieu sélectif: si une protéine hybride de la banque interagit avec la séquence cible intégrée, le gène rapporteur est activé permettant la croissance des levures sur milieu sans histidine (pour le rapporteur *HIS3*). Pour les double transformants His et lacZ sélectionnés sur milieu HIS-URA-, un test β gal confirme l'interaction. Le plasmide codant la protéine d'intérêt est extrait des clones positifs et amplifié en bactéries avant d'être séquencé (figure 14, p 83) (pour plus de détails voir Matériel et Méthodes).

V.2- Criblage par simple-hybride à l'aide du rapporteur pHIS

Le rapporteur pHIS a été choisi pour son apparente simplicité d'utilisation: sélection sur milieu sélectif uniquement. Le protocole Clontech conseille de cloner en tandem 3 copies de la séquence d'ADN étudiée en amont du promoteur du vecteur. Devant la difficulté d'obtenir des multimères sens de 3 copies des séquences G22 et G25 nous avons été amené à effectuer deux criblages en utilisant une seule copie des séquences G22 et G25 clonées dans le vecteur pHISi et une banque de cDNA de lymphocytes humains (*Matchmaker cDNA library Clontech*).

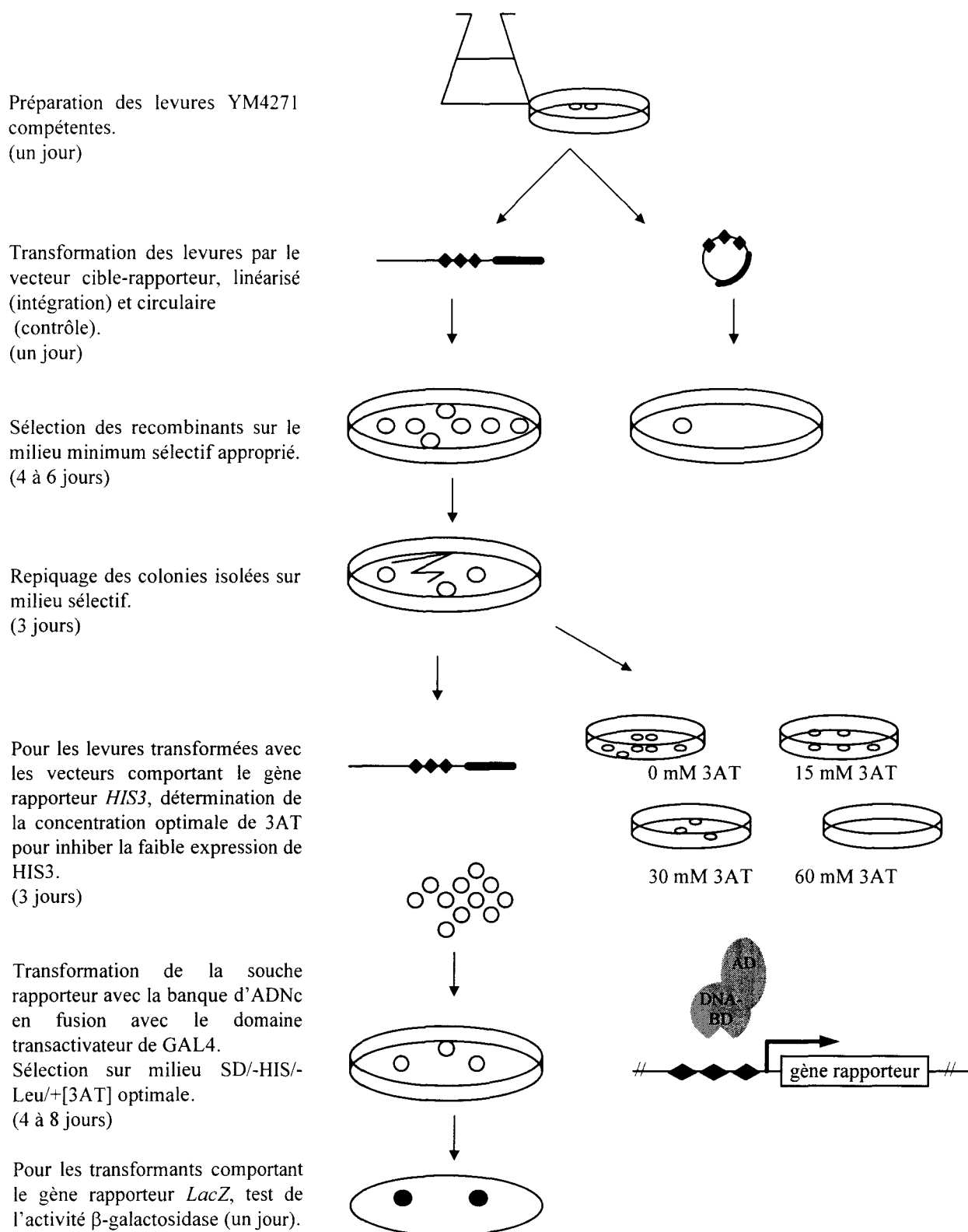


Figure 14 : Schéma du protocole de simple-hybride pour l'identification d'ADNc codant la protéine se fixant à la séquence d'ADN cible d'intérêt.

L'intégration du vecteur rapporteur dans la souche de levure a été vérifiée par culture en milieu sans histidine puis en présence de 3 amino-triazol (3AT) (voir Matériel et Méthodes). La nouvelle souche a été ensuite transformée avec l'ADN de la banque. Une dizaine de clones ont été obtenus mais par la suite, ils se sont révélés être des contaminations bactériennes ou des faux-positifs puisqu'aucun plasmide n'a pu être extrait.

Entre temps, les constructions avec 3 copies sens des séquences G22 et G25 ont été obtenues. De nouvelles souches de levures ont été transformées avec le vecteur p3XG22HIS3 ou p3XG25HIS3, la même banque a été criblée dans une de ces souches, une cinquantaine de clones ont été obtenus. Aucun plasmide n'a pu être extrait de ces clones et retransformé en bactéries, ni amplifié par PCR. Des tests par PCR direct sur ces colonies ont montré qu'ils ne contenaient aucun plasmide pACT. Il s'agissait donc de faux-positifs.

V.3 - Criblage d'une banque d'expression avec l'oligonucléotide G22

L'échec de la technique du simple-hybride nous a amené à tester une technique plus rapide par criblage d'une banque d'expression de lymphocytes humains en λ gt11 avec des oligonucléotides marqués au ^{32}P selon le protocole décrit par Singh *et al.*, 1988 (voir Matériel et Méthodes). Cette technique n'a malheureusement pas donné de résultats plus satisfaisants. En effet, deux criblages ont été effectués avec la sonde 3XG22. Un seul clone positif a été obtenu mais n'a pu être isolé.

VI- LES ALTERATIONS DU MTC INFLUENCENT-ELLES L'EXPRESSION DES DEUX ALLELES DU GENE *LAZ3/BCL6*?

Dalla Favera et coll. ont montré dans un cas de LNH porteur d'une translocation t(3;14)(q27;q32) que seul l'allèle transloqué à proximité du promoteur des IgH s'exprime, tandis que l'autre allèle dit « normal » reste silencieux (Ye *et al.*, 1995). Dallery *et al.* avaient mis en évidence par RT-PCR dans la lignée (VAL) un transcrit *RHO H/LAZ3* fusionnant l'exon 1 du gène *RHO H* aux exons 2 et suivants du gène *LAZ3*. De même, l'existence d'un transcrit de fusion entre le gène *BOB1* et le gène *LAZ3* a été montrée (Galiègue *et al.*, 1996) (figure 15, p 86). Il était intéressant de savoir dans le cas de la lignée (VAL) doublement réarrangée et de la lignée Karpas 231 porteuse d'une translocation t(3;11)(q27;q23) si les 2 allèles s'expriment et quels exons non codants sont choisis entre l'exon 1A et l'exon 1B. Pour cela des expériences de RT-PCR et de RNase protection ont été réalisées.

Les résultats des expériences de RNase protection sont montrés dans les pages 90-93 et récapitulés sur le tableau suivant:

| lignées cellulaires | VAL | K231 | K422 | Raji | MCF-7 |
|----------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| RP exon 1A | - | - | + | + | + |
| RP exon 1B | + | - | + | + | + |
| RT-PCR 1A | - | - | + | + | nd |
| RT-PCR 1B | + | - | + | + | nd |

Légende: RP: RNase protection, - : pas de protection (en RP) ou pas d'amplification (en RT-PCR), +: protection ou amplification, nd: non déterminé.

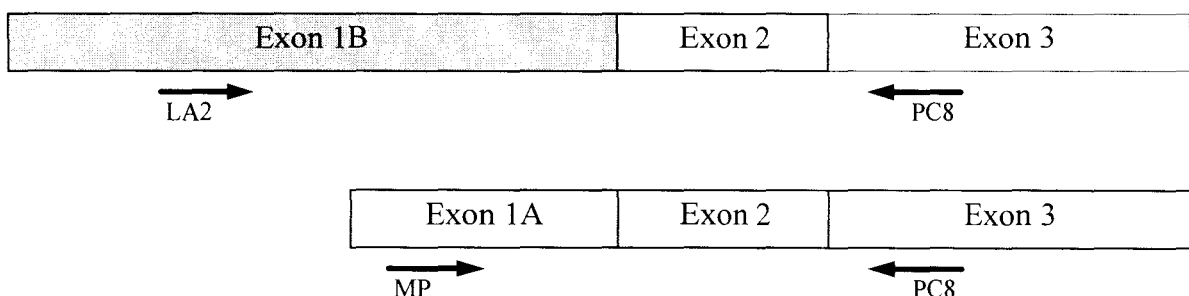


Schéma représentant la position des amorces LA2, PC8 et MP utilisées pour la RT-PCR des transcrits comportant les premiers exons non codants 1A ou 1B du gène *LAZ3*.

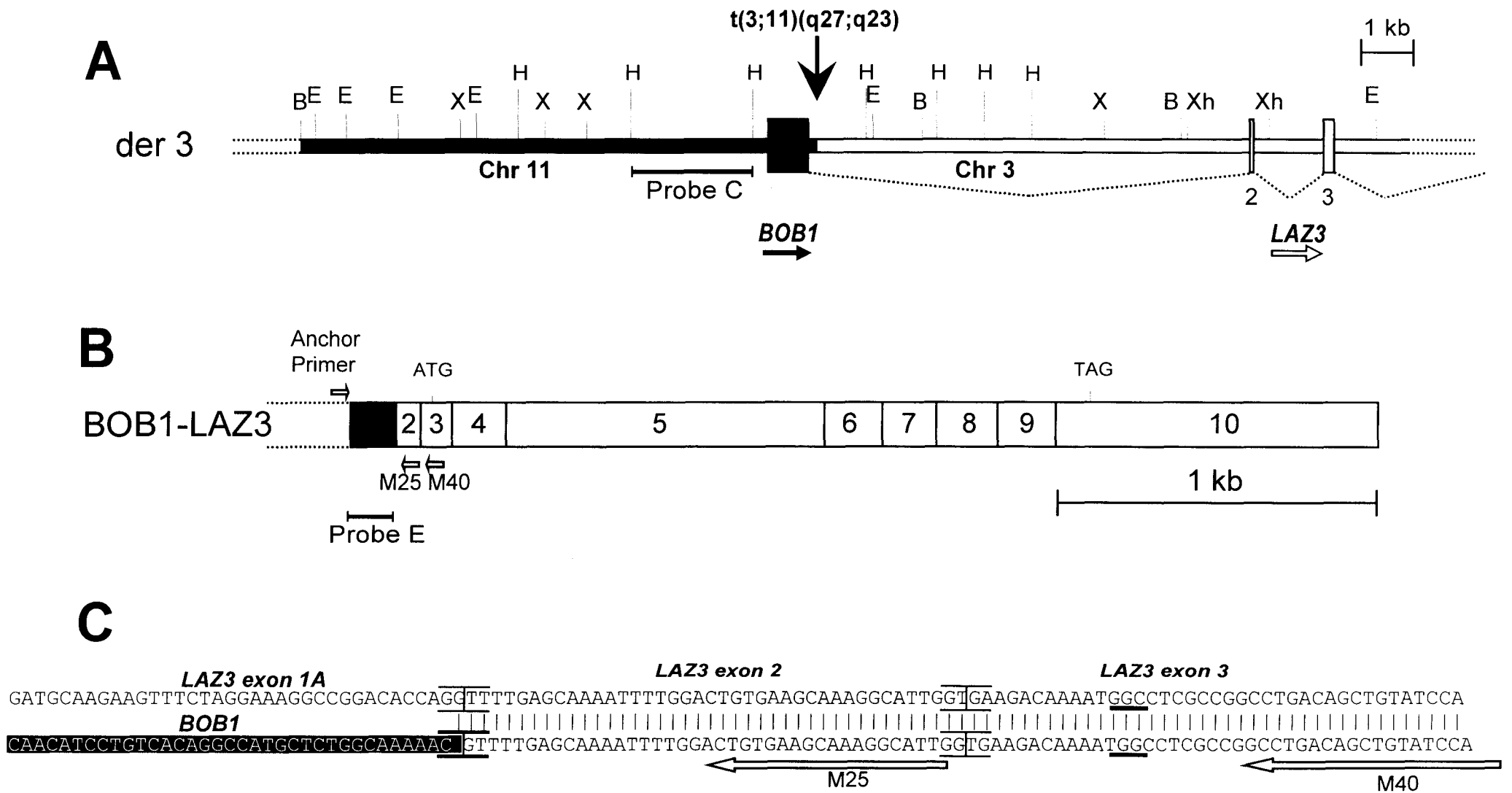


Figure 15: (A) Schéma représentant la région du point de cassure de la translocation t3;11). (B) Représentation schématique du transcrite de fusion BOB1-LAZ3. (C) Alignement des séquences des 3 premiers exons de LAZ3 et du transcrite de fusion BOB1/LAZ3 montrant une jonction d'épissage entre l'exon 1 de BOB1 et l'exon 2 de LAZ3. Les crochets indiquent les sites donneurs et accepteurs d'épissage.

Sondes LAZ3/BCL6:

| | | | |
|----------|-----------|------------|--|
| E8 58 nt | E9 138 nt | E10 450 nt | |
|----------|-----------|------------|--|

Sonde P528 protection de 651 pb

| | | | |
|-----------|----------|-----------|----------|
| E1A 37 nt | E2 38 nt | E3 172 nt | E4 62 nt |
|-----------|----------|-----------|----------|

Sonde P526 b protection totale: 309 pb
272 pb pour E2/E3/E4

| | | | |
|------------|----------|-----------|----------|
| E1B 215 nt | E2 38 nt | E3 172 nt | E4 62 nt |
|------------|----------|-----------|----------|

Sonde P583 b protection totale: 488 pb
272 pb pour E2/E3/E4

| | | | |
|-------------|----------|-----------|----------|
| E1B 1591 nt | E2 38 nt | E3 172 nt | E4 21 nt |
|-------------|----------|-----------|----------|

Sonde P516 protection totale: 1822 pb
231 pb pour E2/E3/E4

| |
|------------|
| E1B 902 nt |
|------------|

sonde P479 fragment *Rsa1/Rsa1* de l'exon 1B
protection totale 902 pb

Sonde RHO H/LAZ3:

| | | | | |
|---------------|--------------|-----------|-----------|-----------|
| RHO E1 250 nt | LAZ E2 38 nt | E3 172 nt | E4 222 nt | E5 220 nt |
|---------------|--------------|-----------|-----------|-----------|

sonde CK2 protection du transcrit de fusion: 900 pb
protection du transcrit LAZ seul: 650 pb
protection du transcrit RHO H seul: 250 pb

Figure 16: Sondes utilisées pour la protection aux ribonucléases .

Les différents exons du transcrit LAZ3 sont représentés par des rectangles blancs à l'exception de l'exon 1B et de la partie non codante en 3' de la sonde P528. L'exon 1 de RHO H est représenté en grisé. Les pointillés indiquent que la taille des exons représentés n'est pas à l'échelle. E : exon, nt: nucléotides, pb : paires de base.

Dans la lignée transloquée K231, ni l'exon 1A ni l'exon 1B ne sont utilisés. le signal détecté avec les sondes P583b et P526a d'environ 270 pb correspond aux exons E2/E3/E4 du gène *LAZ3* et provient du transcrite de fusion *BOB1/LAZ3* (figures 17 et 18, p 90-91). Les mêmes résultats sont obtenus par RT-PCR (tableau, p 85). Par conséquent, l'allèle non transloqué « normal » ne s'exprime pas dans cette lignée. Ce résultat confirme le cas déjà décrit d'une lignée présentant une translocation du gène *LAZ3* mais avec les gènes d'Ig (Ye *et al.*, 1995).

Dans la lignée (VAL), l'allèle transloqué s'exprime sous forme d'un transcrite de fusion *RHOH/LAZ3* (900 pb) détecté par la sonde CK2 (figure19, p 92). L'exon 1A porté uniquement par l'allèle porteur de la délétion n'est pas transcrite (Figures 17 et 18, p 90-91; sonde P526a). L'exon 1B pouvant provenir des deux allèles est transcrite mais faiblement (Figures 17 et 18, p 90-91; sonde P583b). Ces résultats sont confirmés par RT-PCR. Il n'est donc pas possible de conclure sur l'expression de l'allèle porteur d'une délétion dans cette lignée.

Dans les lignées Raji, K422 et MCF-7, les 2 premiers exons non codants sont utilisés mais le transcrite comportant l'exon 1A semble majoritaire (Figures 17 et 18, p 90-91).

Etant donné que la sonde P583 ne contient que la fin de l'exon 1B, d'autres expériences de RNase protection ont été réalisées dans ces mêmes lignées afin de déterminer la taille exacte de l'exon 1B. En effet, l'existence de ce dernier a été mentionnée uniquement par Miki *et al.*, 1994. Pour cela, les sondes P516 et P479 ont été utilisées. P516 comprend l'extrémité 5' du clone de cDNA *LAZ3* obtenu après criblage d'une banque de pancréas et P479 est un fragment de 900 pb de l'exon 1B issu de ce même clone (figure 16, p 87).

Les sondes P516 et P479 ne détectent pas de transcrite 1B dans la lignée K231, confirmant les résultats précédents (Figure 20, p 93). En revanche, la sonde P516 met en évidence plusieurs bandes dans la lignée K422: 1000 pb, 900 pb, communes à la lignée Raji, des bandes de 800, 550 et 350 pb communes aux lignées Raji et (VAL) (Figure20, p 93). L'ensemble des signaux sont faiblement visibles dans la lignée (VAL). Ces bandes indiquent la présence de plusieurs sites d'initiation de transcription dans l'exon 1B. La taille de l'exon 1B pourrait donc être de 790, 570, 300 ou 120 pb selon les lignées cellulaires testées. Il est à noter qu'aucune protection maximale n'est observée avec cette sonde sauf peut-être dans les lignées K422 et Raji. Ceci peut s'expliquer par la longueur de la sonde (1,9 Kb) qui ne s'hybriderait pas totalement. Dans le cas où l'exon 1B mesure environ 790 pb, la séquence de la région avoisinante contient une boîte TATA et une boîte GC potentielles, de même une boîte CAAT potentielle se situe à 570 pb de la

fin de l'exon 1B. La taille de l'exon 1B publié par Miki *et al.*, en 1994 est de 371 pb, valeur assez proche de celle de 300 pb évaluée ici.

Dans toute les lignées, une bande de 230 pb est présente, correspondant aux exons 2/3/4 des transcrits *LAZ3* débutant avec l'exon 1A, ou des transcrits de fusion *RHOH/LAZ3* dans la lignée (VAL) et *BOBI/LAZ3* dans la lignée K231 (Figures 17 à 20, p 90 à 93).

En utilisant la sonde P479 contenant uniquement 906 nt de la partie 5' de la sonde P516, des bandes de 900 pb correspondant à une protection maximale de la sonde sont détectées et indiquent une taille d'au moins 1490 pb pour l'exon 1B (Figure 20, p 93). Des bandes de 700 et 600 pb sont aussi détectées correspondant à une taille de 1290 et 1190 pb. Ces bandes pourraient correspondre aux bandes supérieures qui n'ont pu être mesurées avec précision avec la sonde P516 (trop longue). De façon inverse, les bandes inférieures à 800 pb observées avec P516 correspondent ici à des bandes inférieures à 200 pb difficilement détectables avec la sonde P479.

Ces expériences montrent l'existence d'un autre premier exon non codant dans le gène *LAZ3* et donc d'un autre promoteur. Celui-ci pourrait permettre la production d'un transcrit *LAZ3* normal en dépit de la présence de réarrangement à proximité de l'exon 1A. L'exon 1B est utilisé dans les lignées B testées et dans la lignée VAL (très faiblement) mais n'est pas utilisé dans la lignée K231 suggérant que dans cette lignée l'allèle normal n'est pas exprimé. Une étude chez un grand nombre de patients et de lignées porteurs de réarrangements en 3q27 pourrait déterminer si l'allèle réarrangé est toujours exprimé contrairement à l'allèle non réarrangé silencieux. D'autre part, une étude étendue à des lignées de diverses origines permettrait de déterminer si l'un de ces promoteurs est utilisé de façon tissu-spécifique ou s'il s'agit d'un promoteur ubiquitaire mineur.

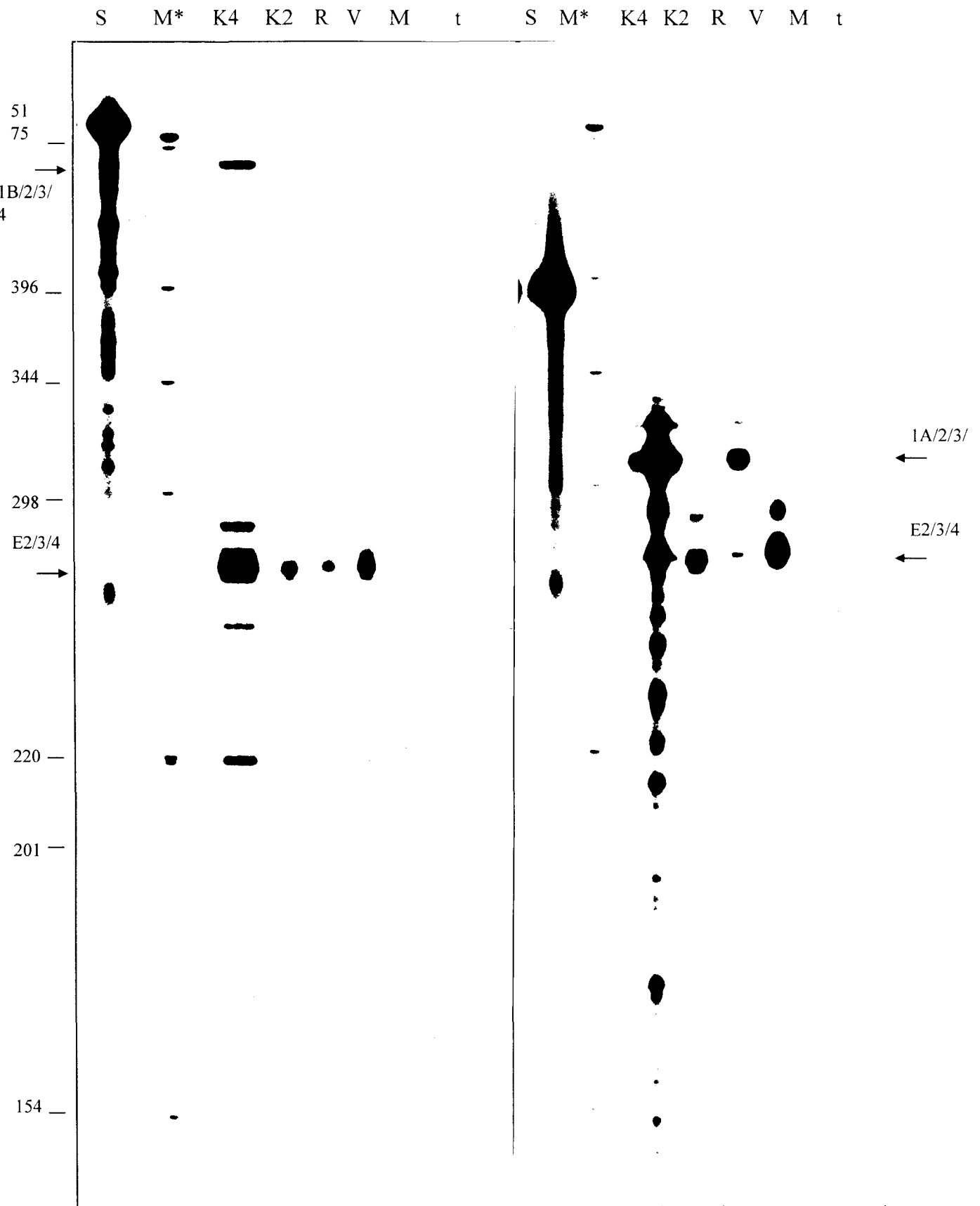


Figure 18 : Protection aux ribonucléases du transcrit *LAZ3* par les sondes P526b et P583b mettant en évidence les exons alternatifs 1A et 1B.

M* : marqueur de taille en nucléotides, S : sonde seule, lignées V: VAL, R : Raji, M : MCF-7, K4 : K422, K2 : K231, t : ARNt. Les fragments protégés sont indiqués par des flèches. 1A/2/3/4, 1B/2/3/4 et E2/3/4 indiquent les exons des différents transcrits du gène *LAZ3*.

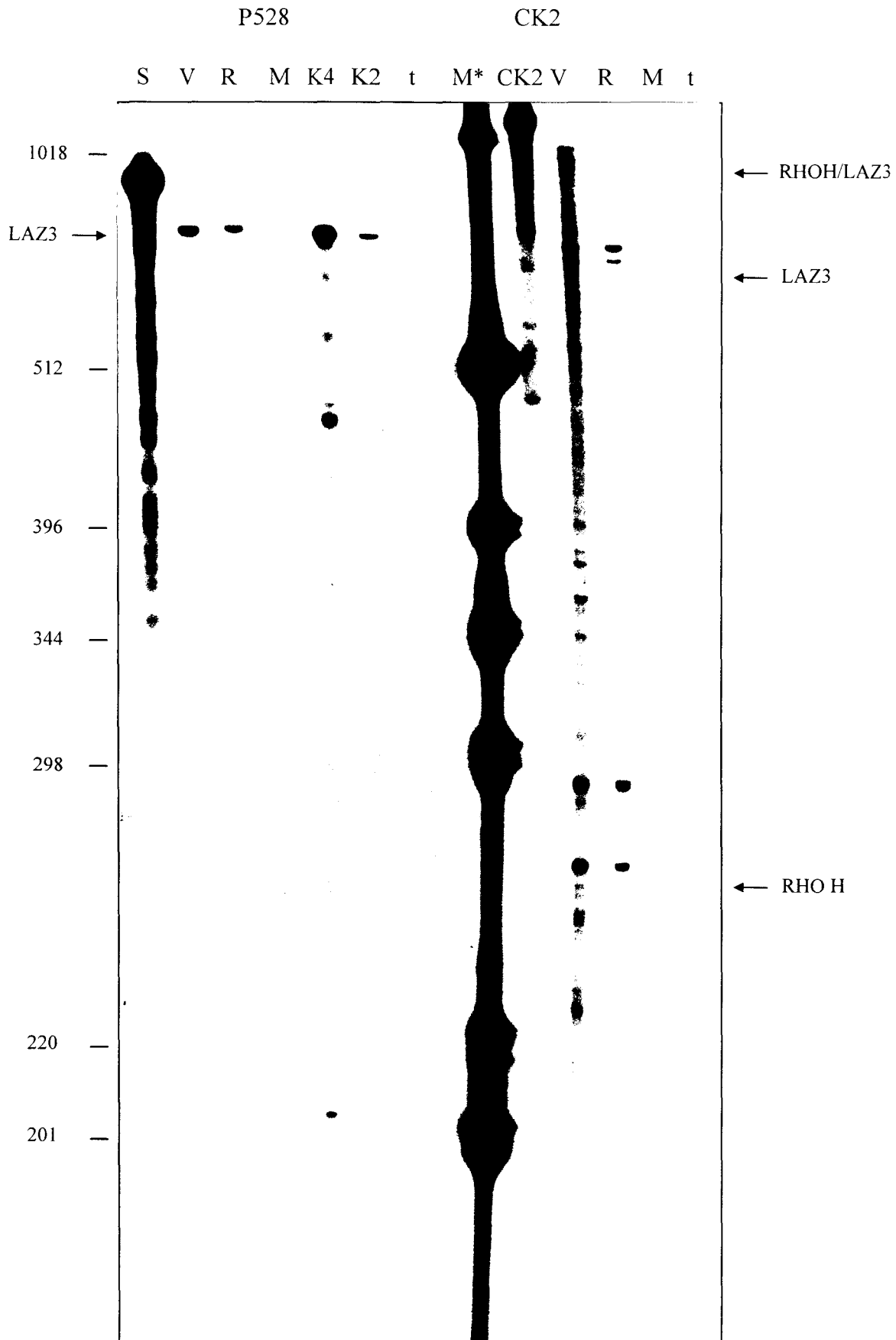


Figure 19 : Protection aux ribonucléases du transcrit *LAZ3* par la sonde P528, des transcrits *LAZ3*, *ROH H* et du transcrit de fusion *RHO H/ LAZ3* par la sonde CK2.

M* : marqueur de taille en nucléotides, S : sonde seule, ARN des lignées V: VAL, R : Raji, M : MCF-7, K4 : K422, K2 : K231, t : ARNt. Les fragments protégés sont indiqués par des flèches.

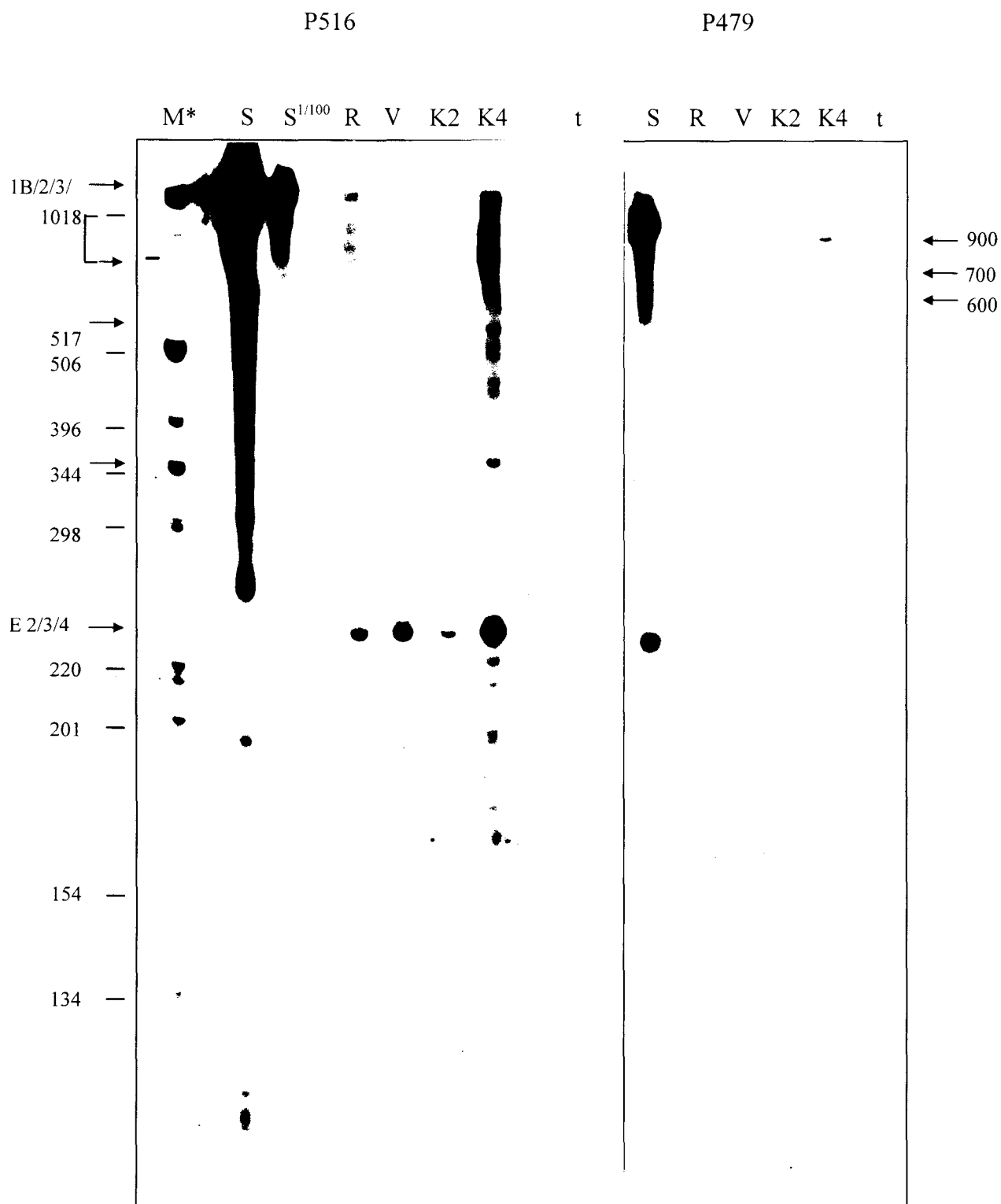


Figure 20 : Protection aux ribonucléases de l'exon 1B du gène *LAZ3/BCL6* par les sondes P516 et P479 dans diverses lignées B.

M* : marqueur de taille en nucléotides, S : sonde seule, lignées R : Raji, V: VAL, K2 : K231, K4 : K422, t : ARNt, 1B/2/3/4 et E2/3/4 : exons des transcrits *LAZ3*. Les fragments protégés sont indiqués par des flèches.

DISCUSSION

I- Existence et conséquences des réarrangements bialléliques dans le MTC

Nous avons décrit deux cas de réarrangements bialléliques du gène *LAZ3* par délétion dans le MTC. Les délétions observées chez le patient (GUI) sont les seules anomalies en 3q27 de son unique chromosome 3 (sous réserve de mutations dans la séquence codante du gène). Ce patient étant atteint d'un lymphome diffus à grandes cellules, ces anomalies sont très probablement impliquées dans le développement de sa pathologie, d'autant plus que ces séquences sont très conservées et pourraient être importantes pour la transcription du gène (la délétion de ces séquences induit une répression de la transcription par le MTC dans la lignée NIH3T3). De plus, les délétions GUI22 et GUI25 sont reconnues par des protéines nucléaires de différents extraits cellulaires. Notamment, la séquence G22 fixe un complexe spécifique de la lignée B Raji et pourrait jouer un rôle dans la régulation de son expression. Il est intéressant de noter que dans cette lignée l'expression du gène *LAZ3* en ARN est importante mais que la protéine n'est pas exprimée. Une observation similaire a été effectuée au niveau des cellules B des centres germinatifs dont l'expression en ARN *LAZ3* est identique à celle des cellules B quiescentes mais dont l'expression en protéine est jusqu'à 34 fois supérieure (Allman *et al.*, 1996). Des mécanismes post-transcriptionnels ou post-traductionnels pourraient être responsables de ce contraste. En effet, la stabilité de la protéine serait régulée par phosphorylation par des MAP kinases (Moriyama *et al.*, 1997). Cette phosphorylation conduirait à la dégradation de la protéine par la voie des protéasomes (ubiquitination) (Niu *et al.*, 1997).

Hormis les deux cas que nous avons étudié, la lignée cellulaire (VAL) et le patient (GUI), d'autres exemples de double réarrangement ont été décrits par d'autres équipes. Nakamura *et al.* ont détecté des réarrangements en 3q27 dans le MTC du gène *LAZ3* dans 7 cas de LNH sur 35. Ces réarrangements sont bialléliques dans 3 cas et sont constitués d'une délétion de taille indéterminée dans la région du MTC contenant le premier exon non codant (Nakamura *et al.*, 1995). Il semble que ces doubles réarrangements participent à une transformation plus rapide des cellules du lymphome et soient des marqueurs de mauvais pronostic puisque ces 3 patients ont rechuté et sont décédés (Nakamura *et al.*, 1995). Un autre cas de réarrangement biallélique a été décrit par la même équipe à partir de l'ADN d'un patient porteur d'une translocation t(3;22)(q27;q11) et d'une délétion de 1,5 kb débutant dans le premier exon et se poursuivant dans le premier intron (Δ ST figure 8, p 65). Ce patient est décédé 3 mois après le diagnostic (Nakamura *et al.*, 1996). Ces délétions ne sont pas des polymorphismes et sont spécifiques aux LNH car l'étude de l'ADN de 80 japonais sains ou non atteints de LNH n'a pas détecté de

délétions dans cette région (Nakamura *et al.*, 1995 & 1996). Il serait intéressant de savoir si ces réarrangements se produisent simultanément ou ont lieu au cours de l'évolution clonale. Pour cela, il faudrait disposer de plusieurs échantillons prélevés au cours du suivi du patient et effectuer cette étude sur un plus grand nombre de cas.

De façon remarquable, ce type de réarrangement par délétion localisé dans la même région et sur les deux chromosomes est inhabituel dans les translocations associées aux lymphomes B. Il existe cependant un cas similaire dans les leucémies T où le gène *TAL-1* est impliqué dans des translocations et des délétions (Brown *et al.*, 1990). Dans ce cas, l'existence de séquences consensus de recombinaison des Ig et des récepteurs T en bordure des réarrangements pourraient expliquer leur formation par des erreurs de recombinaison des gènes d'Ig (Brown *et al.*, 1990). Concernant le gène *LAZ3*, au contraire, aucune séquence de ce type n'a été identifiée en bordure des délétions (Nakamura *et al.*, 1995 & 1996; Bernardin *et al.*, 1997). Cependant, l'existence de séquences reconnues par la Transline et les séquences *Chi-like* qui existent dans le MTC laisse supposer qu'elles pourraient jouer un rôle dans la genèse des translocations (Aoki *et al.*, 1995; Galiègue-Zouitina *et al.*, 1996, figure 12, p 78-79).

Un autre type d'altération a été mis en évidence dans le MTC du gène *LAZ3*, il s'agit de mutations et/ou délétions souvent bialléliques, principalement concentrées dans une région appelée « *major cluster* », située 100 pb derrière le premier exon et s'étendant sur 730 pb dans le premier intron (Migliazza *et al.*, 1995) (figure 8, p 65). La totalité de ces mutations sont des substitutions d'une base, à l'exception d'une insertion et des délétions qui touchent de une à 8 bases (Migliazza *et al.*, 1995). Ces mutations sont présentes dans 73% des DLCL et 47% des FL mais ont été plus récemment observées dans le lymphome de Burkitt de forme sporadique ou endémique, le myélome multiple (34%) et la leucémie lymphocytaire chronique B (15%) (Migliazza *et al.*, 1997; Capello *et al.*, 1998). La présence des mutations est plutôt associée aux pathologies ayant un phénotype « centre germinatif » et la fréquence de ces mutations ($0,14$ à $1,6 \times 10^{-2}/\text{pb}$) est comparable à celle des régions variables des gènes d'Ig mais aussi à celle des gènes *MYC* et *BCL-2* quand ils sont transloqués à proximité des gènes d'Ig (Migliazza *et al.*, 1995). Ces mutations pourraient provenir du processus d'hypermutation somatique des régions variables des gènes d'Ig qui permet d'augmenter l'affinité des anticorps produits, processus qui a lieu dans les centres germinatifs. Des mutations somatiques ont déjà été observées pour le gène *BCL-2* où elles sont associées à la translocation t(14;18) et sont localisées dans la partie codante du gène modifiant la séquence en acides aminés de la protéine (Tanaka *et al.*, 1992). Dans le cas du gène *LAZ3*, ces mutations sont présentes indépendamment de l'existence de translocations du

gène *LAZ3* au niveau des gènes d'Ig (Migliazza *et al.*, 1995). Donc le fait que le gène *LAZ3* soit la cible du processus d'hypermutation somatique est moins évident à comprendre, d'autant plus qu'il n'est pas toujours fusionné avec des gènes d'Ig. Cependant des études ont montré que des séquences différentes des séquences des gènes d'Ig peuvent être mutées (Yelamos *et al.*, 1995) et le processus d'hypermutation au niveau de la chaîne κ nécessite la présence de l'intron κ et des séquences *enhancer* en 3' (Betz *et al.*, 1994). Il est probable que les mutations et les délétions du gène *LAZ3* sont sélectionnées pour leur rôle dans la progression tumorale en conférant un avantage sélectif de croissance ou de survie aux clones malins, comme cela a été montré pour le gène *BCL-2* dans le lymphome folliculaire (Matolcsy *et al.*, 1996). En effet, les mutations et délétions du gène *LAZ3* touchent des régions proches du promoteur et pourraient altérer des séquences impliquées dans la régulation de l'expression du gène, ou des séquences importantes pour l'épissage (mutations introniques qui modifieraient l'épissage), la maturation et la stabilité de l'ARN. La localisation de ces mutations rappelle celles qui touchent le gène *MYC* dans le lymphome de Burkitt où elles sont également concentrées à l'extrémité 3' du premier exon et l'extrémité 5' du premier intron (Zajac-Kaye *et al.*, 1988). Ces mutations empêchent la fixation d'un facteur impliqué dans le blocage de l'élongation des transcrits *MYC* (Zajac-Kaye *et al.*, 1988&1990). Dans la lignée Ly-1, porteuse d'une translocation t(3;14)(q27;q32), les deux copies du gène *LAZ3* présentent de multiples mutations dont une mutation dans un site conservé *LAZ3* dans le premier exon qui serait responsable de la surexpression de cet allèle par rapport à l'autre en transfection transitoire (Migliazza *et al.*, 1997). Des études complémentaires sont nécessaires afin d'étudier les effets des mutations sur la progression tumorale et sur l'expression du gène *LAZ3*.

II- Le MTC a-t-il un rôle sur la transcription?

Dans les lignées NIH3T3 et HeLa, le MTC est capable de réprimer faiblement la transcription. Dans la lignée NIH3T3, la présence des délétions dans le MTC du patient (GUI) augmente cette capacité répressive de 30 à 40% quand le fragment est orienté dans le sens de transcription. Les séquences délétées ont donc probablement un rôle activateur sur la transcription dans la lignée NIH3T3 (contrairement aux cellules HeLa). Dans les deux lignées, le fragment H/*BclI* est activateur de 2 à 3 fois, tandis que le fragment 1.9H/*BglII* n'a pas d'effet.

Les variations mesurées en CAT essai entre les différentes constructions testées sont peu significatives et ne mettent pas en évidence un rôle majeur des séquences du MTC sur la

transcription. Le fait de ne pas avoir observé de différences très significatives peut s'expliquer de différentes raisons:

1) Les résultats de CAT essai peuvent être différents selon la lignée cellulaire transfectée. Par exemple, dans la lignée Cos aucune variation d'activité n'a été observée. Il est très probable que les résultats auraient été différents dans d'autres lignées notamment dans les lignées B (difficilement transfectables) où l'expression du gène *LAZ3* est finement régulée. A noter, certaines protéines ubiquitaires fixent les séquences G22 et G25 en gel retard mais un complexe apparaît uniquement dans la lignée Raji (lignée B) avec la séquence G22.

2) Les expériences de transfection ont été réalisées sur de grands fragments d'ADN (plusieurs kb) donc ne permettant d'avoir qu'une vue globale de l'activité transcriptionnelle du MTC. En effet, cette région peut contenir à la fois des séquences activatrices et répressives dont l'activité peut se compenser et rester invisible par l'étude du fragment entier. D'ailleurs, le fragment 1.9H/*Bgl*III qui n'influence pas la transcription dans les deux lignées contient le fragment H/*Bcl*II qui seul est activateur de la transcription dans les deux lignées. L'étude plus précise du MTC par l'utilisation de fragments plus petits (quelques centaines de bases) ou par délétions successives pourrait permettre de mettre en évidence d'autres régions importantes dans la transcription.

3) Certaines séquences éloignées coopèrent dans la régulation de la transcription par la formation de boucles provenant de l'interaction de plusieurs facteurs impliqués dans la machinerie transcriptionnelle. Par exemple, le facteur Sp1 fixé à son ADN cible peut s'associer à un autre facteur Sp1 fixé à distance et permet ainsi de rapprocher des segments d'ADN distants et de faciliter leur fonction d'*enhancer* (Su *et al.*, 1991). La formation d'un complexe multiprotéique a été mis en évidence au niveau de l'*enhancer* du TCR α (Giese *et al.*, 1995). La formation de ce complexe est initiée par la fixation du facteur LEF-1 à l'ADN qui provoque une torsion au centre de l'*enhancer*. Cette conformation facilite l'interaction du complexe PEBP2 α /Ets-1 avec une protéine ATF/CREB fixée à un site non-adjacent et augmente l'affinité de PEBP2 α /Ets-1 pour sa cible (Giese *et al.*, 1995). D'autres séquences éloignées sont peut-être indispensables à la fonction des séquences du MTC sur la transcription. Ainsi, le promoteur et l'*enhancer* du premier intron du gène de la glutamine synthase agissent de concert pour contrôler l'expression de ce gène au cours de la différenciation des adipocytes (Hadden *et al.*, 1997). Si les séquences du MTC sont uniquement actives sur le promoteur du gène *LAZ3*, les expériences

réalisées ne permettent pas de mettre en évidence ce phénomène car les constructions ont été testées sur un promoteur hétérologue (tk).



D'un point de vue pratique, les deux techniques de transfection DOTAP et lipofectamine sont similaires : elles utilisent la formation de liposomes autour de l'ADN à transférer. Les résultats obtenus par les deux protocoles sont assez proches en moyenne, à l'exception de ceux concernant le MTC germlinal en sens de transcription dans les cellules HeLa et les constructions pMTC-GUI dans les NIH3T3. Cette différence pourrait provenir de la normalisation des extraits qui dans le cas de la transfection à la lipofectamine est effectuée en prenant pour référence l'activité du vecteur pSVLuc. Cette mesure est plus sensible et rigoureuse que celle de la quantité de protéines et permet d'évaluer l'efficacité de transfection des plasmides. D'autre part, la quantité de plasmide transférée est plus importante dans le cas de l'utilisation de DOTAP (5µg) comparée à celle de lipofectamine (2,5µg). Ceci pourrait révéler un effet dépendant de la dose des plasmides et expliquer les taux de répression plus importants pour les constructions du MTC dans les HeLa lors des transfections avec DOTAP (Figure 10A., p 68). Pourtant cet effet n'est pas observé dans la lignée NIH3T3 (Figure 10C, 70).

Concernant les expériences de transfection dans les NIH3T3, une diminution progressive des activités CAT est observée au cours des différentes séries. Elle provient probablement d'un effet de dosage des plasmides qui diminuerait au cours du temps. Pourtant les plasmides ont subi un dosage régulier au spectrophotomètre et sur gel d'agarose afin d'éviter tout risque de dégradation.

D'une manière plus générale, l'écart entre les valeurs d'activité pour une même construction peut s'expliquer par l'utilisation de différentes préparations de plasmide.

Enfin, quand ces expériences ont été réalisées nous pensions trouver des séquences régulatrices dans le MTC qui pourraient provoquer une dérégulation du gène après translocation. Or il a été montré peu de temps après qu'il était difficile d'établir une corrélation entre les réarrangements du gène *LAZ3* et son expression (Otsuki *et al.*, 1995).

III- Conservation des séquences du promoteur et du MTC du gène LAZ3/BCL6

Nous avons montré que la région promotrice du gène *LAZ3* est très conservée entre l'Homme et la Souris (79% d'homologie). Un taux d'homologie similaire a déjà été observé chez de nombreux gènes tels que les gènes *G3PDH*, *NF1* ou *HD* (Gwynn *et al.*, 1990; Hajra *et al.*,

1994; Lin *et al.*, 1995). Dans la région 5' du gène *HD* de la maladie de Huntington, une région de 150 pb montre une homologie de 75% entre l'homme et la souris (Lin *et al.*, 1994). Certains gènes présentent des homologies importantes sur la totalité de leur séquence. Par exemple, les loci très conservés du TCR α humain et murin présentent une homologie de 70% qui s'étend sur respectivement 98 et 95 Kb (Koop *et al.*, 1994).

La présence d'éléments de réponse très conservés dans la région promotrice du gène *LAZ3* suggère qu'ils jouent un rôle important dans la régulation, d'autant plus qu'ils sont situés dans une région montrée comme transcriptionnellement active (Ohashi *et al.*, 1995). Notamment, la *E-box* conservée en amont du site d'initiation de la transcription pourrait intervenir dans l'expression importante du gène *LAZ3* humain et murin dans le muscle (Kerckaert *et al.*, 1993; Fukuda *et al.*, 1994). Ce motif pourrait également intervenir dans la régulation du gène dans les lymphocytes où les facteurs bHLH comme E12 et E47 sont exprimés (Hagman et Grosschedl, 1994).

L'alignement des séquences du MTC du gène *LAZ3* humain et son équivalent chez la souris a mis en évidence des domaines très conservés dans cette région. Des régions non codantes peuvent montrer des taux élevés de conservation comme cela a déjà été observé pour plusieurs gènes (*IL13*, *PRPH*, *EPO*) (Galson *et al.*, 1993; McKenzie *et al.*, 1993; Foley *et al.*, 1994). Cependant un tel degré d'homologie (79%) est inhabituel sur une distance de plusieurs Kb. En comparaison, le premier intron du gène *BCL-2* murin est homologue à 75% à l'humain mais ne mesure que 220 pb (Negrini *et al.*, 1987). Le premier intron du gène humain de l'*IL13* contient un fragment de 716 pb homologue à 67% à celui de la souris (McKenzie *et al.*, 1993). Les régions conservées du MTC du gène *LAZ3* sont susceptibles de contenir des éléments régulateurs de la transcription. Un bloc de 240 pb en 5' du gène codant le TCR α présente 86% d'homologie entre l'Homme et la Souris et des protéines nucléaires de cellules T altèrent le niveau de transcription du gène par leur fixation à cette région (Koop *et al.*, 1994). Un élément de réponse négatif (NRE) de 1,3 Kb a été identifié dans la région 5' non traduite du gène *BCL-2* entre les deux promoteurs P1 et P2 (Young *et al.*, 1993). La présence d'éléments régulateurs dans les introns a été décrite notamment pour des gènes exprimés spécifiquement par les lymphocytes: Ig, TCR, *btk*, CD4, *c-fes*, IL4. L'intron 2 du gène murin de l'*IL-4* contient une séquence *enhancer* spécifique des basophiles et les sites Ets, PU1, GATA1 et GATA2 conservés entre l'homme et la souris sont nécessaires à la totalité de l'activité de cet *enhancer* (Henkel *et al.*, 1994). Une séquence conservée de l'intron J-C du gène κ murin des Ig est reconnue par des complexes protéiques différents selon le stade de différenciation des cellules, l'un de ces complexes est un élément régulateur du gène en réponse à l'IFN γ (LaVallée *et al.*, 1996).

Récemment, la substitution d'une seule base dans l'élément régulateur de l'intron 1 du gène *btk* a été identifiée comme la seule anomalie d'un patient atteint d'agammaglobulinémie liée à l'X (XLA) (Roher *et al.*, 1998). Cette mutation dans un site Sp1 est responsable d'une diminution d'expression de Btk aussi bien en ARN qu'en protéine (Roher *et al.*, 1998). D'autre part, un élément régulateur de 20 pb dans l'intron 1 du gène *MYC* porteur d'un point chaud de mutations dans le lymphome de Burkitt fixe une protéine de 138 kDa appelée MIF (Zajac-Kaye *et al.*, 1990). La caractérisation de cette protéine a révélé son identité avec RFX1, un régulateur des gènes du CMH de classe II (Alesse *et al.*, 1996). Cette mutation affecte la fixation de RFX1 sur sa séquence cible et diminue la régulation positive du promoteur du gène *MYC* en transfection transitoire (Alesse *et al.*, 1996). On peut envisager qu'un cas analogue puisse se produire pour le gène *LAZ3*.

Certaines séquences 5' ou 3' non traduites sont responsables de la stabilité ou au contraire de la labilité des transcrits (Sachs *et al.*, 1993). Les régions 5' non traduites du gène *LAZ3* pourraient former des structures secondaires impliquées dans la régulation de la transcription. Plusieurs exemples de ce type ont été observés : la terminaison prématurée de la transcription contrôlé par un élément du promoteur HIV1 et 2, le rôle des séquences 5' sur l'initiation et l'élongation de la transcription des gènes *MYC* et *MYB* et le *pausing* de l'ARN polymérase II (Spencer et Groudine, 1990). Le contrôle de l'élongation de la transcription du gène *MYB* s'effectue par une séquence de 1 kb dans le premier intron de ce gène (Dooley *et al.*, 1996). Cette séquence est conservée chez la souris où la régulation du gène *MYB* est similaire au gène humain (Dooley *et al.*, 1996). La fixation de facteurs nucléaires rend cet atténuateur actif dans les cellules B matures (Dooley *et al.*, 1996).

Le fait que certaines régions du MTC sont aussi fortement conservées que le promoteur lui-même ou l'exon1A et qu'en plus ces régions sont supprimées par translocation ou altérées par délétions et/ou mutations suggère qu'elles jouent un rôle important dans la régulation du gène *LAZ3*. Dans un premier temps, les altérations du gène *LAZ3* semblent similaires à celles déjà observées pour d'autres gènes impliqués dans les lymphomes (translocations à proximité de gènes d'Ig comme les gènes *BCL-2* et *MYC*, mutations dans le premier intron comme dans le cas de *MYC*). Mais si dans les autres gènes impliqués, la conséquence de ces altérations est une surexpression du gène, il n'en est pas de même pour le gène *LAZ3* puisqu'aucune corrélation n'a été établie de manière significative entre réarrangements et expression du gène tant au niveau de l'ARN que de la protéine (Otzuki *et al.*, 1995; Falini *et al.*, 1997). Pourtant, il est difficile de

trouver une autre conséquence aux réarrangements du gène *LAZ3* qu'une dérégulation de l'expression de son gène puisque celui-ci se trouve sous le contrôle de promoteurs hétérologues et/ou comporte des mutations dans le MTC.

Le profil d'expression de différents gènes partenaires de translocation du gène *LAZ3* a été étudié récemment au cours des différents stades de la différenciation des cellules B (Chen *et al.*, 1998). Contrairement au gène *LAZ3* dont l'expression est restreinte aux cellules B matures, les gènes *BOB1* et *H4* sont exprimés tout au long de la différenciation des lymphocytes B, *RHO H* est exprimé à tous les stades de différenciation à l'exception du stade pré-B, les gènes *IGH*, et *IGL* sont exprimés dans les stades pré-B et B mature mais également dans certaines lignées plasmocytaires (Chen *et al.*, 1998). Il est possible que des changements subtils de l'expression de ce gène puissent perturber son fonctionnement. A la suite des translocations, le gène *LAZ3* serait exprimé ou régulé de façon inappropriée dans les cellules B notamment au stade plasmocyte, la régulation de ses gènes cibles serait aussi modifiée, bloquant le processus de différenciation ou de mort cellulaire des cellules B et participant ainsi au développement tumoral. Une nouvelle recherche de corrélation entre les réarrangements du gène *LAZ3* et son expression serait peut-être utile, en tenant compte des altérations très précises du gène particulièrement les petites délétions et les mutations. D'autre part, le gène *LAZ3* a d'autres partenaires dans les translocations que les gènes d'Ig et ces gènes pourraient être dérégulés par leur mise sous contrôle du promoteur du gène *LAZ3* (exemple RHOH).

IV- Existence d'un deuxième promoteur et d'un autre exon non codant

L'existence de l'exon 1B n'a été identifié que par l'équipe japonaise (Miki *et al.*, 1995) et par la nôtre. Les études de protection aux ribonucléases et de RT-PCR montrent que cet exon 1B est bien présent. L'utilisation de cet exon est apparemment moins courante en regard du signal faible obtenu en RNase protection. Il est assez peu probable qu'il provienne d'un ARN mal épissé qui comporterait une séquence intronique (dans ce cas serait-il détecté par Rnase protection?). Les différentes bandes obtenues avec la sonde P516 suggèrent l'existence de plusieurs sites d'initiation de la transcription et donc d'un deuxième promoteur en amont de l'exon 1B. Dans les deux lignées Raji et K422, les deux promoteurs sont fonctionnels. Il est possible que ce deuxième promoteur ne soit fonctionnel que dans certaines cellules ou tissus. Les deux séquences non codantes en 5' étant différente, la stabilité et la traductibilité des transcrits sont probablement différentes.

Suite aux translocations, un changement de promoteur pourrait se produire au niveau du gène *LAZ3* et perturber son expression. En effet, ce phénomène a été observé dans le cas du gène *MYC*: dans la situation normale, 80 à 90% des transcrits sont initiés au niveau du promoteur P2, à la suite d'une «pause» de l'ARN polymérase au niveau du promoteur P1 (Strobl *et al.*, 1993). L'induction de la transcription de *MYC* est également corrélée au déplacement de deux nucléosomes (Albert *et al.*, 1997). Au contraire, quand le gène *MYC* est transloqué à proximité des gènes d'Ig, il est préférentiellement transcrit à partir du promoteur P1 (Polack *et al.*, 1993; Strobl *et al.*, 1993). Les séquences des Ig à proximité du gène *MYC*, sur l'allèle transloqué, ont un rôle clé dans ce phénomène puisque sur cet allèle le blocage de l'élongation à la jonction exon1/intron1 n'a plus lieu (Hörtnagel *et al.*, 1995). Une combinaison de divers enhanceurs et LCR (région contrôle du locus) des IgH et Igk sont responsables de l'activation du gène *MYC* transloqué (Madisen *et al.*, 1994; Hörtnagel *et al.*, 1995). Dans le cas de la lignée de lymphome de Burkitt KOB101, porteuse d'une translocation t(2;8) (à 250 Kb en 3' du gène *MYC*), l'allèle transloqué est également porteur de multiples mutations ponctuelles dans l'intron 1 (Tachibana *et al.*, 1993). Le taux de transcription de cet allèle est 3 à 5 fois supérieur à celui observé dans des lignées B non malignes et l'allèle non transloqué reste silencieux. Dans ce cas, l'activation de *MYC* résulte à la fois de la proximité d'action de l'enhancer des Igk et de la suppression par les mutations d'une régulation négative de l'expression du gène (Tachibana *et al.*, 1993).

L'initiation de transcription d'un promoteur peut influencer l'expression de l'autre par un mécanisme d'interférence qui existe chez les procaryotes et les eucaryotes. Au niveau du gène *BCL2*, l'allèle transloqué est exprimé et l'allèle normal reste silencieux dans les cellules de lymphome, le transcrit de fusion avec les Ig pourraient réprimer par rétrocontrôle la transcription de l'autre allèle (Séité *et al.*, 1988). Dans la lignée K231, seul le transcrit de fusion *BOB1/LAZ3* est détecté, confirmant le cas de la lignée Ly-1 dans laquelle seul l'allèle transloqué et juxtaposé aux séquences promotrices des Ig s'exprime sous forme d'un transcrit de fusion *IGHG3-LAZ3*, tandis que l'autre allèle reste silencieux (Ye *et al.*, en 1995). Qu'en est-il pour les translocations avec les autres gènes? Existe-t-il un processus d'exclusion allélique comme dans le cas des Ig?

Dans la lignée (VAL) il n'a pas été possible de déterminer quel allèle est exprimé mais l'exon 1A n'étant pas détecté, il semble que le promoteur «majeur» du gène *LAZ3* ne soit pas fonctionnel. La délétion de 2,45 Kb de l'allèle non transloqué pourrait jouer un rôle dans ce phénomène.

V - Echec de la technique du simple hybride:

D'autres équipes ont également rencontré quelques difficultés avec cette technique (Kim *et al.*, 1997). En utilisant le gène rapporteur *HIS3*, la plupart des clones positifs étaient de faux positifs donc le phénotype *HIS+* observé ne dépendait pas de la fixation d'une protéine de la banque au promoteur (Kim *et al.*, 1997). Les mêmes auteurs ont aussi utilisé un rapporteur *HIS3* plus sensible (pRS315HIS) mais sa faible activité de base ne permet pas la pousse en milieu sans histidine. Au lieu d'insérer les vecteurs rapporteurs *HIS* et *LacZ* par recombinaison homologue, ils ont utilisé le plasmide centromérique pSK1 comportant le rapporteur *HIS* ainsi que le marqueur de sélection LEU et le vecteur épisomal pYC7 (capable de s'autorépliquer) comportant le gène rapporteur *LacZ* et le marqueur URA. La sélection de la souche rapporteur a donc pu être effectuée sur milieu LEU-, URA-. En revanche, le criblage de la banque a été effectué sur milieu LEU-, URA-, *HIS*-, TRP-. Les clones obtenus ont ensuite été testés par test β gal pour éliminer les faux positifs. Dans notre expérience, le vecteur rapporteur *HIS* utilisé possède une activité basale normalement suffisante pour sélectionner les transformants et ce bruit de fond est ensuite éliminé par l'ajout de 3AT lors du criblage de la banque.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'absence de clones positifs:

- Il est possible que le vecteur pHISi ne se soit pas intégré dans le génome de la levure. Dans ce cas comment expliquer que des colonies soient capables de pousser sur milieu sans histidine? Il est plus probable que les clones obtenus au final soient des faux positifs chez lesquels l'expression de *HIS3* ne dépende pas de l'activation du promoteur par une protéine de la banque.

- Lors du criblage, il est possible que les protéines hybrides GAL4 interagissant avec les séquences d'ADN cible soient toxiques pour la croissance des levures.

- D'autres protéines sont peut-être nécessaires à leur interaction avec l'ADN chez les mammifères et n'existent pas chez la levure.

Il apparaît nécessaire d'utiliser un deuxième marqueur de sélection (URA3) et d'un deuxième gène rapporteur (*LacZ*) afin d'éviter les clones faux positifs *HIS+*.

CONCLUSION-PERSPECTIVES

Nous avons décrit deux cas de réarrangements bialléliques du gène *LAZ3* par délétion dans le MTC. L'un chez un patient (GUI) porteur d'une monosomie 3 et de trois microdélétions de 22, 25 et 101 pb ; l'autre dans une lignée cellulaire (VAL) porteuse d'une translocation t(3;4)(q27;p13) et d'une délétion de 2450 pb sur l'autre allèle du gène *LAZ3*.

L'identification dans cette région très souvent remaniée ainsi que dans le promoteur de ce gène de séquences non codantes conservées entre l'Homme et la Souris, permet d'émettre plusieurs hypothèses quant à leur rôle. Ces séquences pourraient avoir plusieurs fonctions:

(i) agir comme *enhancers* ou *silencers* et être impliquées dans l'expression tissu-spécifique et/ou temporelle du gène *LAZ3*,

(ii) intervenir dans la régulation de l'expression du gène au niveau de la stabilité ou de l'épissage de l'ARN.

De façon très intéressante, les deux séquences de 22 et 25 pb délétées chez le patient (GUI) sont homologues respectivement à 100% et 92% à celles de la souris. Ces deux séquences sont reconnues spécifiquement par des protéines d'extraits de cellules B et pourraient donc être impliquées dans la pathologie. Nous ne pouvons évaluer les conséquences des délétions du patient (GUI) sur l'expression du gène *LAZ3* car nous ne disposons pas de matériel pour réaliser une lignée cellulaire à partir de ce patient ou d'autres cas. Mais l'identification des protéines se fixant sur ces séquences permettrait peut-être d'apporter des réponses quant aux conséquences de leur délétion dans le cas (GUI). Pour cela: des expériences de gel retard avec des séquences G22 et G25 mutées pourraient être effectuées pour déterminer les bases nécessaires à l'interaction. Des transfections de ces séquences suivies de test CAT dans les lignées testées en gel retard permettraient peut-être de mettre en évidence un rôle de ces séquences sur la transcription. Ces expériences étaient initialement prévues après le clonage par simple-hybride des protéines reconnaissant ces séquences afin de vérifier l'interaction des protéines clonées et des séquences G22 et G25 dans un contexte différent (cellules de mammifère). Une technique de biochimie aurait pu être utilisée pour la purification des protéines se fixant sur les séquences G22 et G25: le passage dans des colonnes contenant les oligos G22 ou G25 ou par la technique appelée « phage display ».

Concernant le simple-hybride, l'utilisation des deux gènes rapporteurs *LacZ* et *HIS* devrait permettre d'éviter les faux-positifs. Une autre solution consisterait à utiliser d'autres vecteurs (Kim *et al.*, 1997).

L'étude de l'ensemble des séquences du promoteur et du MTC pourraient être envisagées par la construction d'un minigène *LAZ3* (vecteur épisomal) et la mesure de l'expression en ARN et en protéine dans les cellules transfectées.

L'utilisation de la technique de l'hypersensibilité à la DNase I pour étudier la structure de la chromatine de ces fragments permettrait de localiser très précisément les régions correspondant à des éléments régulateurs potentiels. Ces expériences pourraient être réalisées *in vitro* ou *in vivo* avec des lignées cellulaires de diverse origine et exprimant ou non le gène *LAZ3*. Ces expériences pourraient être menées plus particulièrement dans les lignées B établies à partir de cellules des centres germinatifs. Dans ces cellules, elles pourraient mettre en évidence des séquences responsables de la régulation négative de l'expression de *LAZ3* au cours de la différenciation terminale de ces cellules en cellules productrices d'anticorps et en cellules B mémoire.

L'étude de l'expression des allèles du gène *LAZ3* et l'utilisation de ses deux premiers exons non codants alternatifs dans les lignées réarrangées dont nous disposons, montrent dans le cas de la lignée Karpas 231, porteuse d'une translocation t(3;11), que seul l'allèle transloqué s'exprime sous forme d'un transcrite de fusion, l'allèle non transloqué restant silencieux. En ce qui concerne la lignée (VAL), l'allèle transloqué s'exprime, mais il n'est pas possible de conclure sur l'expression de l'allèle porteur de la délétion. Il serait intéressant de pouvoir tester d'autres cas de réarrangements pour connaître leur influence éventuelle sur l'utilisation des deux exons 1A et 1B du gène *LAZ3* et l'expression de ses allèles. L'existence d'un deuxième promoteur laisse supposer qu'une régulation «normale» de *LAZ3* est toujours possible, à moins que les altérations au niveau du MTC puissent affecter son fonctionnement. Une étude approfondie de ce promoteur permettrait de mieux comprendre la régulation de l'expression du gène *LAZ3*.

Enfin pour étudier les conséquences des délétions du patient (GUI) sur le gène *LAZ3* et leur éventuelle conséquence sur le développement du LNH ou sa progression, il est possible de reconstituer ces délétions chez la souris par *knock-in*. La même technique pourrait être utilisée pour reconstituer *in vivo* les réarrangements du gène *LAZ3* (translocations, délétions et/ou mutations) afin de déterminer s'ils sont impliqués directement dans le développement de LNH.

MATERIEL ET METHODES

I - Extraction et purification des acides nucléiques

I.1 Extraction d'ARN

Les ARNs des différentes lignées cellulaires ont été extraits selon la méthode isothiocyanate de guanidine (GT)/ chlorure de césium (CsCl): brièvement, après un lavage au PBS* 1X (*: voir composition des tampons p ?), les cellules sont passées dans un dounce contenant du tampon GT* auquel on ajoute ensuite 2g de CsCl. Le mélange est passé sur une seringue puis déposé sur coussin de CsCl* et centrifugé une nuit à 250 000 g sur un rotor à godets oscillants SW41 (Beckman). Les culots sont repris dans du tampon TE 1X; 0,1% SDS. Après une extraction volume/volume par un mélange chloroforme/butanol (4/1), l'ARN est précipité par 2,5 volumes d'éthanol absolu et 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3M et par une centrifugation à 12000 g de 30 min, à 4°C. Les culots sont lavés à l'éthanol à 70° et séchés puis, solubilisés dans de l'eau distillée traitée au DEPC (diéthylpyrocarbonate) 0,1%. Le dosage des ARNs s'effectue par une spectrophotométrie UV à 260 nm.

I.2 Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN des lignées cellulaires est effectuée après un lavage des cellules dans du tampon PBS 1X. Les culots cellulaires sont remis en suspension dans du tampon STE* 1X en présence de protéinase K (50µg/ml) et de sarcosyl 0,5%, puis agités doucement une nuit à 42°C. Après une purification par extraction volume/volume au phénol, au phénol/chloroforme (1/1) et au chloroforme, l'ADN est précipité par 2 volumes d'éthanol absolu et 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3M. Après une centrifugation à 12000 g de 30 min, à 4°C, le culot est lavé à l'éthanol à 70°, séché et repris dans du TE 1X. L'ADN est dosé par spectrophotométrie UV à 260 nm.

I.3 Analyse par Southern blot

L'ADN est digéré pendant la nuit par des enzymes de restriction appropriées à raison de 10U /µg d'ADN à la température et dans le tampon indiqué par le fournisseur (Boehringer). Les fragments d'ADN sont précipités à l'éthanol, repris par 20µl de TE 1X et séparés par une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% dans un tampon phosphate* 1X à 30V à 4°C pendant 16 à

20 heures. Le gel est ensuite traité par un tampon dénaturant (NaOH 0,5 N; NaCl 1,5 M) (2 fois 30 min) puis par un tampon neutralisant (Tris-HCl 0,5M pH 6,5; 3M NaCl) (2 fois 30 min). L'ADN est transféré par capillarité sur une membrane de nitronylon (Hybond C extra, Amersham) par un flux de SSC 6X pendant une nuit. L'ADN est ensuite fixé sur la membrane par un chauffage de 2h à 80°C. La membrane est préhybridée 1 à 2h à 42°C dans 10 ml de tampon SSPE*, 0,1% SDS puis mise en contact avec 2 à 3x10⁷ cpm de sonde marquée au α ³²P-dCTP (cf paragraphe II.1) pendant 12h à 42°C, sous agitation. L'hybridation non spécifique est éliminée par lavages successifs dans du SSC2X à température ambiante, dans une solution SSC 0,1X; SDS 0,1 % à température ambiante puis à 50°C. Les signaux d'hybridation sont visualisés par une autoradiographie sur film (Kodak) en utilisant des cassettes à écrans intensifiants.

II - Marquage des sondes

II.1 Marquage de sonde d'ADN double brin

Le marquage des sondes d'ADN double brin est effectué par la technique de multiamorçage au hasard en utilisant le kit *rediprime DNA labelling system* (Amersham) et du α ³²P-dCTP selon les instructions du fournisseur. La sonde est ensuite purifiée par un gel filtration sur colonnes Sephadex G50 et dénaturée par la soude.

II.2 Marquage de sonde oligonucléotidique

II.2.1 *Pour le retard en gel*

Les oligonucléotides simple brin complémentaires (G22 ou G25) sont mis en contact à raison de 1 μ g/ μ l dans une solution de NaCl 0,1M; TE 1X, hybridés par une incubation de 3 min à 100°C et refroidis progressivement à température ambiante. Le marquage des sondes oligonucléotidiques s'effectue par une addition d'un groupement phosphate en 5' de l'oligonucléotide grâce à la Polynucléotide Kinase. La réaction s'effectue sur 200 ng d'oligonucléotide par une incubation d'une heure à 37°C en présence de 30 μ Ci de γ ³²P-ATP (Amersham) et 10 U d'enzyme, dans un volume réactionnel de 20 μ l (10 mM Tris-acétate; 10 mM Acétate de Magnésium; 50 mM Acétate de Potassium). La Polynucléotide Kinase est inactivée par une incubation de 10 min à 75°C.

La purification de la sonde s'effectue par une électrophorèse en gel d'acrylamide 8% non dénaturant. Après quelques minutes d'autoradiographie sur film, la bande correspondant à la sonde double brin marquée est découpée très finement et placée dans 1 ml de TE 1X. L'éluion de l'ADN s'effectue par une incubation de 3h à 37°C, par une agitation au vortex pendant la nuit à température ambiante, suivi d'une centrifugation à 12000 g de 30 min. Le surnageant est prélevé et l'activité de la sonde est mesurée par scintillation liquide (Compteur Hewlett-Packard).

II.2.2 *Pour le criblage d'une banque d'expression*

Le marquage des extrémités 3' du fragment double brin contenant 3 copies de la séquence G22 digéré EcoRI/XbaI a été effectué par le fragment Klenow de l'ADN polymérase d'*E. Coli* (Boehringer). La réaction a lieu 30 min à température ambiante en présence des désoxynucléotides $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP, $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10 à 20 μCi , Amersham) et dTTP(0,2 mM), de 2U d'enzyme, dans un volume final de 50 μl de tampon H 1X (Boehringer). La sonde est ensuite purifiée par un gel filtration sur colonnes Sephadex G25 (Boehringer). L'activité de la sonde est mesurée sur un aliquot par scintillation liquide (Compteur Hewlett-Packard).

II.3 Marquage de sonde ARN

Le plasmide contenant la sonde d'intérêt est linéarisé par une enzyme de restriction dont le choix dépend du type de sonde désiré (sens ou antisens). Le plasmide linéarisé est précipité à l'éthanol absolu (2 volumes) et à l'acétate de sodium 3M (1/10^{ème} volume), lavé à l'éthanol à 70°, séché et resuspendu dans de l'eau DEPC de façon à obtenir une concentration de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Dans notre cas, les sondes utilisées pour les expériences de protection aux ribonucléases sont clonées dans le vecteur pKS bluescript qui comporte les promoteurs T3 et T7 utilisés par les ARNpolymérases correspondantes. Les sondes sont complémentaires à l'ARNm (antisens) et sont synthétisées par incorporation de ribonucléotides (rATP, rCTP, rGTP, rUTP) par l'enzyme T3 ou T7 RNA Polymérase (Boehringer). La réaction s'effectue sur 0,5 μg de plasmide linéaire par une incubation d'une heure à 37°C en présence de 30 μCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -rUTP (Amersham), 0,4 mM de chaque ribonucléotide non marqué (Boehringer) et 20U d'enzyme, dans un volume réactionnel de 25 μl contenant du Tampon polymérase 1X (Boehringer), 1 μl d'inhibiteur de RNase (Boehringer), DTT (Dithiothréitol) 20mM, BSA 0,1 mg/ml. Après une incubation de 10 min à 37°C en présence de 0,4mM de rUTP non marqué, la matrice d'ADN est digérée par 20U

de Dnase I, sans RNase (Boehringer) dans un volume final de 30 μ l (tampon de l'enzyme 1X), par une incubation de 15 min à 37°C.

La sonde est purifiée par extraction volume/volume au phénol/chloroforme puis au chloroforme. Le dosage est effectué par comptage à scintillation liquide. La sonde est conservée à -80°C.

III - Criblage des banques génomiques et caractérisation des clones

Le clonage des bandes réarrangées de la lignée VAL a été effectué par criblage d'une banque génomique préparée à partir de l'ADN de la lignée (VAL) : après la digestion enzymatique partielle par *Sau3A*, les fragments d'ADN de taille comprise entre 15 et 20 Kb sont fractionnés sur gradient de sucrose puis ligués dans le phage λ EMBL3 (kit *Gigapack II plus* Stratagène). Cette banque a été criblée avec la sonde F372 et les clones positifs ont été analysés par cartographie de restriction et séquençage.

Le clonage de la bande réarrangée du MTC du patient GUI a été effectué par criblage d'une banque génomique partielle préparée (par S. Quief) à partir de l'ADN de ce patient, après une digestion enzymatique, une migration électrophorétique, une sélection et une purification des fragments d'ADN de taille comprise entre 2 et 4 Kb.

Les séquences du MTC et du promoteur humain du gène *LAZ3* proviennent du sous-clonage du phage recombinant λ GG1 isolé précédemment d'une banque d'ADN normal humain, clonée dans le vecteur EMBL4 (Stratagène) (Deweindt *et al.*, 1993).

Le clonage des séquences équivalentes chez la souris a été effectué par un criblage d'une banque génomique préparée à partir de l'ADN de la lignée NIH3T3 dans le vecteur λ DASH II (Stratagène) (Don de A. Bègue, Institut Pasteur de Lille).

III.1 Titration des banques

1ml d'une préculture de bactéries hôtes *E. Coli* LE392 estensemencé dans 20ml de milieu LB* additionné de maltose 0,2% et MgSO₄ 10 mM. Les bactéries sont mises en culture à 37°C sous agitation jusqu'à ce qu'elles soient en phase de croissance exponentielle. Elles sont conservées à +4°C jusqu'au moment de l'infection.

Un aliquot de la banque est dilué au 1/100, 1/1000, 1/10 000 dans du tampon TMG*. 10 ou 100 μ l de chaque dilution sont ajoutés à 200 μ l de bactéries. L'adsorption des phages sur les bactéries est effectuée à 37°C pendant 15 min. 3 ml de top agarose 0.8%, conservé à 55°C sont ajoutés à la

suspension et étalés sur boîte de Pétri (100 mm) contenant du LB agar 1,5%. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C. Le comptage des plages de lyse permet le calcul du titre de la banque.

III.2 Criblage des banques

Le criblage est réalisé sur 30 à 40 boîtes de Pétri de 100 mm. Environ 20 000 phages sont étalés par boîte. Une empreinte des plages de lyse est réalisée par un transfert sur filtre de nitrocellulose (Biotrace NT Gelman Sciences). Les filtres sont numérotés et des repères sont effectués à l'aide d'une aiguille. L'ADN transféré est traité par un bain de 2 min dans une solution dénaturante (NaCl 1.5M, NaOH 0.2mM), puis il est traité pendant 4 min dans une solution neutralisante (Tris 0.5M, pH 7.5, NaCl 1.5M). Les filtres sont séchés puis fixés par cuisson à 70°C pendant 2h ou sous 5 min de rayonnement UV.

Les filtres sont préhybridés pendant une heure à 42°C dans le tampon d'hybridation choisi (pour une hybridation plus ou moins stringente ou pour le criblage avec un oligonucléotide marqué). L'hybridation a lieu sous agitation pendant la nuit dans 10 à 15 ml de tampon auquel a été ajoutée la sonde marquée au ^{32}P (environ 1.10^6cpm/filtre). Après lavages (cf paragraphe I-2.3), les filtres sont séchés et mis en autoradiographie une nuit. Les plages positives sont repérées sur la boîte de Pétri grâce aux repères effectués lors du transfert. Ces phages sont repiqués à l'aide d'un cure-dent et dilués dans 1 ml de tampon TMG*. Plusieurs dilutions sont étalées de façon à obtenir des plages bien isolées. Un second tour de sélection est effectué par une nouvelle hybridation des répliques pendant 3 à 4 heures puis une autoradiographie. Les clones positifs sont amplifiés et leur ADN est extrait selon la technique au CsCl de Sambrook *et al.*, 1989. A chaque étape, après la lyse et la précipitation des bactéries, un stock de phages est conservé à +4°C, additionné de quelques gouttes de chloroforme.

III.3 Cartographie des phages et sous-clonage des fragments d'intérêt dans un plasmide

Les clones sont cartographiés par simple et double digestion enzymatique. Après une électrophorèse en gel d'agarose 0,8%, les fragments d'ADN sont transférés sur une membrane de nitronylon et hybridés avec la sonde utilisée pour le criblage de la banque. Les bandes s'hybridant avec la sonde sont prélevées, l'ADN est purifié par adsorption sur billes de silice (QUIAEX II, Quiagen) puis ligué dans le plasmide pKSBluescript (Stratagene). Le site de clonage de ce vecteur est situé dans le gène codant le peptide α de la β -galactosidase de l'opéron

lactose, sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). La bactérie XL1 utilisée est délétée de ce fragment (génotype: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (tet')*]). La sélection des recombinants s'effectue sur milieu LB Amp contenant de l'IPTG et le substrat de la β -galactosidase, le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside). Le dérivé métabolisé du X-gal étant de couleur bleue, seules les colonies recombinantes, incapables de métaboliser le X-gal, resteront blanches.

III.3.1 Préparation du vecteur

4 μ g de plasmide sont digérés par 20U d'enzyme de restriction (Boehringer) pendant deux heures à 37°C dans un volume réactionnel de 30 μ l. Le vecteur est ensuite déphosphorylé par 20U de Phosphatase alcaline (Boehringer) pendant une incubation d'une heure à 37°C. L'ADN est purifié par extraction au phénol/chloroforme et précipité. Le culot est repris et dosé par une électrophorèse en comparant son intensité à une gamme de concentration d'un plasmide témoin.

III.3.2 Ligation

Les fragments d'intérêt sont ligués à 100 ng de vecteur dans un volume réactionnel de 20 μ l (tampon de ligation 1X, 0.5mM ATP) en présence de 4U de Ligase (kit de ligation Proméga). La réaction s'effectue une nuit à 16°C.

III.3.3 Transformation bactérienne

La préparation de bactéries compétentes est effectuée selon la méthode de Chung et Miller, 1988. Une préculture de bactéries estensemencée au 1/20^{ème} dans du milieu LB. Lorsque les bactéries sont en phase de croissance exponentielle ($DO_{600nm} = 0,3-0,6$), elles sont centrifugées à 1000 g pendant 10 min, à 4°C. Le culot de bactéries est remis en suspension dans 1/10^{ème} du volume de culture dans du tampon TSB* conservé à 4°C. Après une incubation de 10 à 20 min dans la glace, les bactéries peuvent être conservées à -70°C, aliquotées par 100 μ l sous congélation instantanée dans un mélange carboglace/éthanol.

Pour la transformation proprement dite, 3 μ l de ligation (ou 100 pg de plasmide) sont dilués dans 10 μ l d'eau et mis en contact avec 100 μ l de bactéries compétentes. Le mélange est

incubé 10 à 30 min dans la glace puis additionné de 0,3 à 0,9 ml de milieu TSB glucosé (20 mM). Après une incubation une heure à 37°C sous agitation (225 rpm), 20 à 200 µl de bactéries sont étalés sur boîtes LB Amp contenant 0,1 mM d'IPTG et 0,05 mM d'X-gal. Après une incubation d'une nuit à 37°C, les colonies blanches sont repiquées en milieu liquide (LB Amp) et l'ADN plasmidique est extrait par lyse alcaline. Après un contrôle de digestion enzymatique sur gel d'agarose, l'amplification du clone bactérien d'intérêt est effectuée dans 150 ml de LB Amp. L'ADN plasmidique est extrait selon le protocole Quiagen.

IV - Séquençage

2 à 3 µg d'ADN plasmidique sont utilisés par réaction de séquence. Celle-ci s'effectue selon la méthode de Sanger en utilisant de l' α ^{35}S -dATP dans les conditions décrites dans le kit Sequenase version 2.0 (United States Biochemical).

V - Criblage d'une banque d'expression

La banque criblée est une banque de lymphocytes humains 5' *stretch* Clontech, clonée dans le phage λ gt11.

La titration s'effectue comme précédemment décrit au paragraphe II.1 mais en utilisant le tampon de dilution Lambda 1X (Clontech) et la bactérie Y1090r⁻ dont le génotype est : *araD139 hsdR* (r_k^- , m_k^+) *mcrA^- rspL supF trpC22::Tn10 Δ lacU169 Δ lon* (pMC9). Les boîtes ne sont incubées que pendant 6-7 heures à 37°C.

Le criblage s'effectue sur 20 à 40 boîtes de 100 mm contenant chacune environ 10 000 à 20 000 plages de lyse. Les boîtes sont mises en incubation pendant 3h30 à 42°C. Les filtres de nitrocellulose sont préalablement saturés par un bain de 10 min dans de l'IPTG 10 mM puis séchés avant d'être déposés sur les boîtes. Les boîtes sont remises en incubation pendant 6h à 37°C. Avant d'enlever les filtres, des repères sont effectués et les boîtes sont mises à 4°C pendant 10 à 15 min. Les filtres sont ensuite immédiatement placés dans un bain de BLOTTO* (20 ml par filtre). Après une incubation de 60 min à température ambiante sous légère agitation, les filtres sont lavés deux fois 10 min dans 20 ml de TNE-50*. A cette étape, les filtres peuvent être utilisés directement pour le criblage ou stockés à 4°C pendant 12 à 24 h dans du TNE-50.

Lors du criblage, les filtres sont incubés pendant une heure sous faible agitation dans du TNE-50 en présence de 1 à 2×10^6 cpm/ml de sonde oligonucléotidique marquée au ^{32}P (cf paragraphe II) et 10 $\mu\text{g/ml}$ de Poly(dI-dC) (cette préparation peut servir successivement pour 5 filtres). Les filtres sont ensuite lavés quatre fois 10 min dans du TNE-50, séchés et mis en autoradiographie. Les clones positifs sont réisolés par la même procédure et l'ADN phagique est extrait à partir d'un lysat effectué en milieu liquide.

VI - Electrophorèses

VI.1 Electrophorèse en gel d'agarose

Les fragments d'ADN digérés à analyser sont dilués dans une solution de Bleu de bromophénol (3/10 v/v) et déposés sur un gel d'agarose (0,8% à 2% agarose; 0,5X TBE*, BET 0,5 $\mu\text{g/ml}$). La migration s'effectue le plus souvent à 100V pendant 30 min. L'analyse se fait sous lampe UV (254 nm). Les marqueurs de taille utilisés sont le 1 Kb ou le 100 bp (Pharmacia).

VI.2 Electrophorèse en gel d'acrylamide

VI.2.1 Electrophorèse en gel d'acrylamide dénaturant

Pour le séquençage ou la protection aux ribonucléases, les électrophorèses sont réalisées dans un gel dénaturant (6% Acrylamide/bis acrylamide (19/1); Urée 8M; TBE 1X). Le gel est polymérisé par addition de TEMED 1% et de persulfate d'ammonium 1% (concentrations finales). Les tampons de dépôt sont dénaturants et la séparation des produits de séquençage ou de protection aux ribonucléases s'effectue à 85W dans un tampon TBE 1X. Après séchage, les gels sont autoradiographiés en utilisant les films X-OMAT Kodak ou sur Phosphorimager.

VI.2.2 Electrophorèse en gel d'acrylamide non dénaturant

Pour la purification des sondes oligonucléotidiques, un gel non dénaturant (8% acrylamide, TBE 1X) est utilisé. La migration s'effectue à température ambiante pendant 2h30 à 150V constant.

Pour les expériences de retard en gel, les complexes ADN/protéines sont séparés dans un gel non dénaturant (5% polyacrylamide; TBE 0,5X), également polymérisé par addition de

TEMED 1% et persulfate d'ammonium 1%. La migration s'effectue à température ambiante pendant environ 2 h à 150V constant dans du tampon TBE 0,5X.

VII - Culture des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires utilisées, qui sont référencées sur le catalogue ATCC (Rockville, MD, USA), sont les suivantes:

HeLa CCL2, NIH 3T3 CRL 1658, Raji CCL 86, K562 CCL 243, HSB2 CCL 120.1, COS-1 CRL 1650.

La lignée HT29 a été mise à notre disposition par le Dr Zweibaum.

Les lignées B K231 et K422 ont déjà été décrites (Nacheva *et al.*, 1993) et ont été mises à disposition par le Dr. A. Karpas, Université de Cambridge, UK.

La lignée VAL a été établie et mise à notre disposition par le Dr. C. Bastard.

Les lignées cellulaires Raji, VAL, K231, K422, K562 sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Gibco BRL) enrichi à 10% de sérum de veau foetal décomplémenté et filtré (Boehringer), à 37°C dans une atmosphère humide à teneur en CO₂ de 5%.

Les lignées cellulaires COS-1, HT29 et HSB2 sont cultivées dans un milieu DMEM enrichi à 10% de sérum de veau foetal.

Les lignées HeLa et NIH3T3 sont cultivées dans le même milieu mais enrichi à 10% en sérum de veau nouveau-né.

VIII - Transfection cellulaire et CAT essai

La transfection s'effectue dans des boîtes de 60 mm quand les cellules sont à 30 à 50% de confluence.

VIII.1 Transfection par DOTAP (Transfection reagent) (Boehringer)

Pour chaque transfection, 5 µg d'ADN plasmidique sont dilués dans un tampon HBS (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM; pH 7,4) dans un volume final de 100 µl. D'autre part, 30 µl de réactif (DOTAP) sont ajoutés à 70 µl de tampon HBS. Les deux solutions sont mélangées et mises en incubation à température ambiante pendant 30 min. Après addition de 5,8 ml de milieu de culture au mélange, celui-ci est versé sur les cellules dont le milieu a été préalablement aspiré.

Les cellules sont incubées à 37°C pendant 18 à 20 h au bout desquelles le milieu des cellules est renouvelé. L'incubation des cellules se poursuit pendant 24h.

VIII.2 Transfection par lipofectamine (GIBCO-BRL)

Pour chaque transfection, 3 µg d'ADN plasmidique (dont 0,5 µg de vecteur pSVLuc) sont dilués dans 100 µl de milieu dans sérum (Opti-MEM, GIBCO-BRL). En parallèle, 2 à 25 µl de lipofectamine sont dilués dans 100 µl d'Opti-MEM. Pour les cellules HeLa, la quantité de lipofectamine optimale est 2 µl/µg d'ADN; pour les NIH 3T3, elle est de 6 µl/µg. Les deux solutions sont mélangées et mises en incubation à température ambiante pendant 15 à 45 min. Après addition de 3,2 ml d'Opti-MEM, le mélange est versé sur les cellules préalablement rincées avec ce même milieu. Les cellules sont incubées pendant 6 à 20 h à 37°C, le milieu des cellules est ensuite remplacé par 5 ml de leur milieu de culture habituel contenant du sérum. Les cellules sont incubées de nouveau à 37°C pendant 24h.

VIII.3 Préparation des lysats cellulaires

VIII.3.1 *Méthode des chocs thermiques*

(utilisée lors des transfections utilisant le réactif DOTAP)

Les cellules sont lavées au PBS 1X et centrifugées 5 min à 1500 rpm. Les culots sont remis en suspension dans 100 µl de Tris 0,25 M pH 7,7 et la lyse des cellules s'effectue par une succession de chocs thermiques (10 min à -80°C, 10 min à 37°C, 3 cycles) puis un passage aux ultrasons de 20 s. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 10 000 g de 10 min. Le dosage des protéines des extraits est effectué sur un volume de 10 µl dilués dans 1 ml d'eau distillée par spectrophotométrie à 280 nm.

VIII.3.2 *Utilisation d'un tampon de lyse (Reporter lysis buffer, Promega)*

(lors des transfections par lipofectamine)

Les cellules sont lavées de la même façon que précédemment. Les culots cellulaires sont repris par 300 µl de tampon de lyse 1X puis sont incubés sur glace pendant une heure avec 3-4 homogénéisations au vortex pendant 1 min. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 12000 g d'une minute.

VIII.3.3 *Dosage de l'activité Luciférase.*

Lors des transfections par Lipofectamine, l'efficacité de transfection a été évaluée par la mesure de l'activité de la Luciférase, enzyme codée par le plasmide pSVLuc. Pour cela, l'activité enzymatique de 80 à 100 µl de lysat cellulaire est déterminée par un luminomètre (Bertold) dans 200µl de tampon Luc* auquel est ajouté extemporanément de la luciférine 0,125 mM final (Proméga) et de l'ATP 1 mM final (Pharmacia).

VIII.4 Dosage de l'activité chloramphénicol acétyle-transférase (CAT)

La réaction s'effectue avec un volume variable de lysat cellulaire, après une correction en fonction de l'efficacité de transfection, déterminée par le dosage de la luciférase ou, en fonction du dosage protéique. Ce volume est ramené à 100 µl par addition de tampon de lyse et incubé pendant 1h 30 à 37°C en présence de 20 µl d'acétyl coenzyme A 4mM (Boehringer) (0,5 mM final), 35 µl d'eau distillée, 0,5 µl de ¹⁴C-dichloroacétyl 1,2 chloramphénicol (Amersham) à 0,1 mCi /ml. La réaction est arrêtée par l'addition de 0,6 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange est homogénéisé par 30 s de vortex puis centrifugé 5 min à 12 000g. La phase organique est prélevée et séchée sous vide. Le culot est remis en suspension par 20µl d'acétate d'éthyle et chromatographié sur une couche mince de gel de silice (20x20 cm Polygramm). La séparation des formes acétylées et non acétylées du substrat est réalisée pendant 45 min en tampon chloroforme/méthanol (95/5). Les couches minces sont ensuite mises en autoradiographie une nuit au minimum.

Le pourcentage d'acétylation est déterminé par la mesure du taux de radioactivité des formes acétylées par rapport aux formes non-acétylées. Ce pourcentage a été évalué pour la quasi-totalité des expériences par comptage en scintillation liquide des taches découpées à partir du gel de silice. Pour les dernières expériences, il a été mesuré par Phosphorimager (Molecular Dynamics).

IX - Retard en gel

La préparation des extraits nucléaires a été effectuée selon la méthode de Andrews et Faller, 1991. De 5×10^5 à 10^7 cellules sont lavés dans 1,5 ml de PBS 1X puis centrifugées à 10 000g pendant 10 s. Le culot est resuspendu dans 400 µl de tampon A*. Après une incubation de

10 min sur la glace, et 10 min de vortex, les cellules sont centrifugées à 10 000g pendant 10 s. Le culot est repris par 20 à 100 μ l de tampon C* et incubé sur glace pendant 20 min. Les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation à 10 000g de 2 min, à 4°C. Le surnageant, contenant les protéines nucléaires, est prélevé et conservé à -70°C. Le rendement est généralement de 50 à 75 μ g de protéines par 10^6 cellules.

La réaction d'interaction ADN/protéines s'effectue avec environ 15 μ g d'extraits nucléaires, 1 μ l (20 000 cpm) d'oligonucléotide double brin marqué en 5' (cf paragraphe II-2), 1 μ l de poly-dIdC (2 mg/ml, Pharmacia), 1 μ l de BSA (5 mg/ml) et un tampon de fixation (NaCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; β mercapto-éthanol 10 mM; glycérol 15%) afin d'obtenir un volume final de 10 μ l. Pour les expériences de compétitions, l'incubation a lieu en présence d'un excès de 100 fois d'oligonucléotide double brin non marqué. La réaction d'incubation s'effectue à 32°C pendant 30 min. Les complexes ADN/protéines sont séparés de la sonde libre par électrophorèse en gel d'acrylamide 5% non dénaturant.

X - Protection aux ribonucléases

20 μ g d'ARN totaux ou 5 μ g d'ARNt d'*E.Coli* sont mis en contact avec 5×10^5 cpm de sonde ARNc (cf paragraphe II-3) dans un 30 μ l de tampon d'hybridation (80% formamide, NaCl 400 mM, EDTA 1mM, PIPES pH 6,5 40mM). Le mélange est dénaturé 5 min à 85°C et incubé pendant 4h à 37°C puis 10 à 12h à 30°C. Après une hybridation, les ARNs simple brin non hybridés sont éliminés par l'addition de 300 μ l de tampon de digestion (NaCl 300mM, EDTA 5mM, Tris-HCl pH 7,5 10 mM) contenant 30 μ g/ml de RNase A et 2 μ g/ml de RNase T1 (Boehringer). La réaction d'incubation s'effectue pendant 30 min à 30°C. Les nucléases sont inactivées par digestion à la protéinase K (50 μ g/ml), 0,1% SDS pendant 15 min à 37°C. La purification des ARNs hybridés s'effectue par extraction volume/volume au phénol/chloroforme (1/1) puis au chloroforme, suivie d'une précipitation à l'éthanol absolu en présence de 5 μ g d'ARNt. Les fragments protégés sont analysés par une électrophorèse en gel d'acrylamide 4 à 6% selon les tailles attendues. La taille des fragments protégés est évaluée par comparaison au marqueur de taille X (Boehringer). Ce marqueur est déposé sur un gel après un marquage radioactif par la Polynucléotide kinase (cf paragraphe II-4).

XI - Criblage d'une banque d'expression par la technique de Simple-hybride *in vivo* chez la levure.

Ce système permet d'isoler de nouveaux gènes codant des protéines se fixant sur une séquence d'ADN cible. Il peut également être utilisé pour cartographier un domaine de fixation à l'ADN d'une protéine connue. Cette technique est basée sur le même principe que le double-hybride: une protéine, fusionnée au domaine transactivateur du facteur de transcription GAL4, reconnaît sa séquence cible d'ADN, clonée en amont d'un gène rapporteur. L'interaction protéine-GAL4/ADN active alors la transcription du gène rapporteur. Un schéma récapitulatif des différentes étapes est présenté page 83.

XI.1 Préparation des vecteurs rapporteurs contenant la séquence d'ADN cible

Chaque vecteur doit comporter trois copies en tandem de la séquence d'ADN cible d'intérêt. Afin d'obtenir les concatémères des séquences G22 et G25, les sites de restriction *Bam*HI et *Bgl*II (sites compatibles) ont été choisis pour cloner la séquence cible dans le site *Bam*HI des vecteurs pKS et pTL1 (intermédiaires de clonage). Ces constructions ont ensuite été digérées respectivement par *Eco*RI/ *Xba*I et *Eco*RI/ *Xho*I pour cloner les multimères en amont des promoteurs des gènes rapporteurs des vecteurs pHISi et pHISi-1 d'une part, et du vecteur pLacZ d'autre part (figure 21, page suivante). Les plasmides ont été amplifiés dans la souche bactérienne DH5 α .

XI.2 Intégration du vecteur rapporteur dans le génome de la levure

La souche de levure utilisée est YM4271. Son génotype est le suivant: *MATa*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *leu2-3, 112*, *trp1-903*, *tyr1-501*.

L'intégration dans son génome des vecteurs porteurs des gènes *HIS3* ou *URA3* permettra à la nouvelle souche de croître sur milieu sans histidine ou sans uracile.

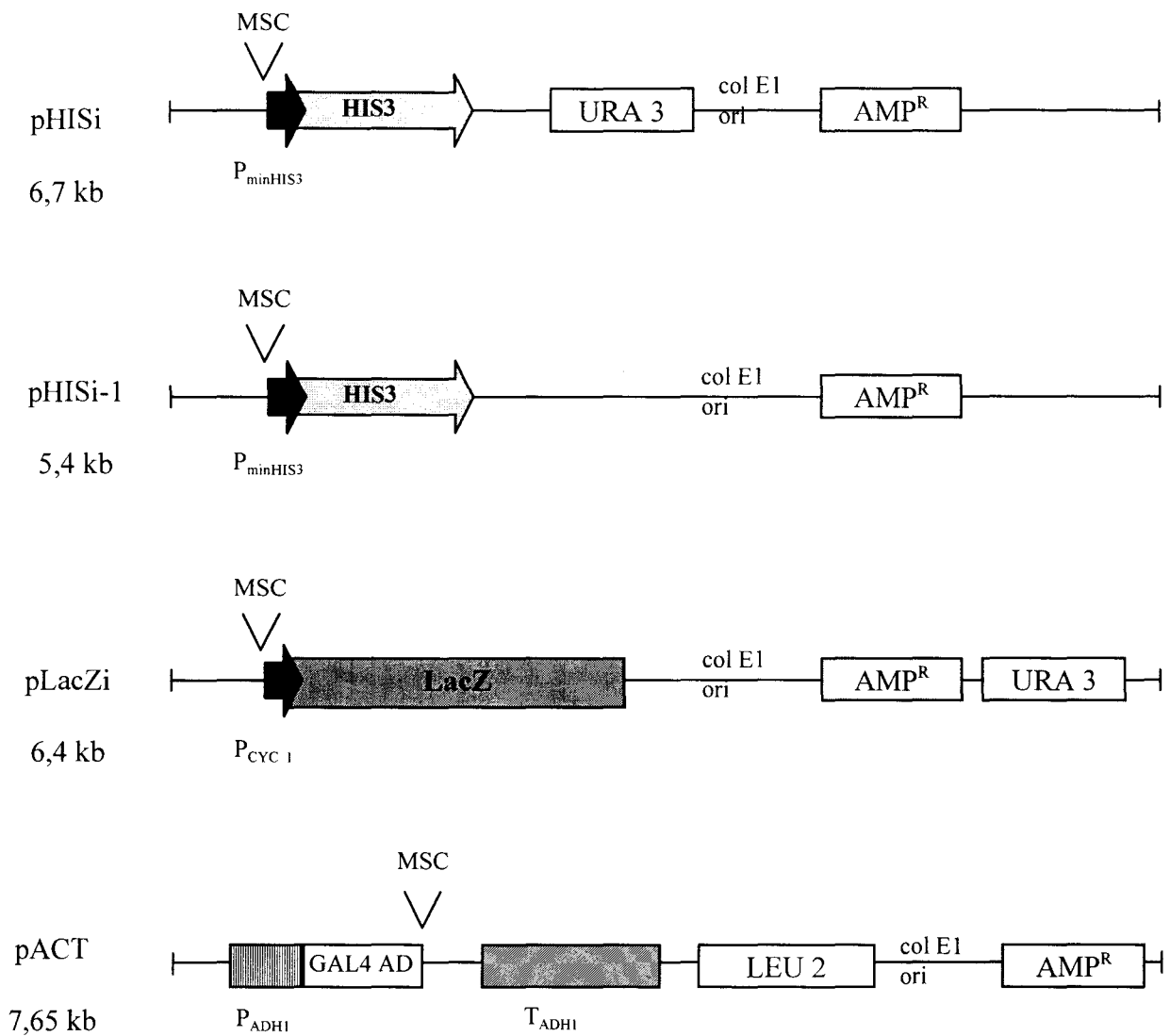


Figure 21: Schémas des différents vecteurs utilisés en simple-hybride.

MSC : multiples sites de clonage. *HIS3* : gène de levure codant l'histidine, *URA3* : gène de levure codant l'uracile, *LEU2* : gène de levure codant la leucine, *LacZ* : gène bactérien du peptide α de la β -galactosidase, Amp^R : gène bactérien de résistance à l'ampicilline, *colE1 ori* : origine de répliation d'*E. Coli*. $P_{minHIS3}$: promoteur minimal du locus *HIS3*, P_{CYC1} : promoteur minimal du gène de la cycline de levure, *GAL4 AD* : domaine activateur du facteur de transcription *GAL4*.

XI.2.1 Linéarisation des vecteurs rapporteurs

La linéarisation du vecteur favorise la recombinaison homologue avec la séquence équivalente dans le génome de la levure.

1 µg de plasmide est digéré dans un volume de 20 µl soit par *XhoI* pour les vecteurs pHISi et pHISi-1 (site dans le gène *HIS3*), soit par *NcoI* pour le vecteur pLacZ (site dans le gène *URA3*). Les mêmes vecteurs non digérés serviront de témoins négatifs de transformation.

XI.2.2 Préparation de levures compétentes

Quelques colonies de YM4271 sont resuspendues dans 1 ml de milieu YPD*. La suspension de levures est transférée dans 20 ml de YPD et incubée à 30°C sous agitation modérée (250 rpm) pendant 16 à 18 h. Un volume de cette culture est dilué dans 300 ml de YPD de façon à obtenir une DO_{600} de 0,2-0,3. Les levures sont mises en incubation à 30°C pendant 2 à 4 h jusqu'à obtenir une DO_{600} comprise entre 0,4 et 0,6 (phase exponentielle de croissance). Les levures sont centrifugées dans des tubes de 50 ml pendant 5 min à 1000 g à température ambiante. Les culots sont resuspendus dans du TE1X stérile et sont rassemblés dans un volume d'environ 25 ml. Après une centrifugation à 1000g de 5 min, le culot est repris dans 1ml de tampon TE/LiAc* 1X.

XI.2.3 Transformation des levures compétentes

100µg de carrier (ADN de sperme de saumon 10 mg/ml) sont ajoutés à chaque plasmide digéré, puis 100µl de levures compétentes sont additionnés et mélangés par retournement. Dans chaque tube, 600µl de tampon PEG/LiAc* sont ajoutés et mélangés délicatement. Après une incubation de 30 min à 30°C, sous faible agitation (200 rpm), 70 µl de DMSO sont ajoutés. Les tubes sont placés pendant 15 min dans un bain-marie à 42°C et mélangés une fois par retournement. Après un choc thermique de 10 s dans un mélange eau/glacé, les tubes sont centrifugés à 10000 g pendant 10 s et les culots sont repris dans 200 à 300 µl d'eau stérile. 30 µl minimum de ce volume sont étalés sur des boîtes sélectives SD*/-His ou SD/-Ura. Les boîtes sont incubées 4 à 6 jours à 30°C (la taille des colonies doit atteindre 2-3 mm). Les transformations réalisées avec les plasmides non coupés ne donnent que quelques colonies. Les

transformants sont repiqués sur boîtes sélectives et de nouveau mis en incubation. Ces boîtes peuvent être conservées 3 à 4 semaines à 4°C sous parafilm.

XI.2.4 Test de l'expression de base des nouvelles souches rapporteurs.

Chaque colonie HIS⁺ est resuspendue dans 1 ml de TE 1X ou d'eau stérile. 5µl de cette suspension sont étalés sur des boîtes SD/-HIS + 0, 15, 30, 45, 60, 100 mM de 3-aminotriazol. Le 3AT est un inhibiteur compétiteur de la protéine HIS 3 de levure. Il est utilisé pour inhiber les faibles taux de protéine HIS3 produite par les vecteurs rapporteurs intégrés dans les levures. La souche rapporteur qui a le plus faible bruit de fond pour l'expression de HIS3 sera utilisée pour le criblage de la banque. Ce test permet de comparer aussi les rapporteurs pHISi et pHISi-1. Les souches utilisées par la suite sont les souches pHISi qui ne poussaient plus sur boîte SD/-HIS+ 15 mM 3AT. C'est donc cette concentration de 3AT qui a été utilisé lors du criblage.

Pour les souches rapporteurs LacZ, les colonies sont transférées sur filtre et soumises au test β-galactosidase. Si les colonies deviennent bleues en plus de 15 min, l'expression de LacZ est faible et elles peuvent être utilisées pour un criblage comme double transformants (après transformation avec un vecteur pHIS). Cette possibilité n'a pas été testée.

XI - 3 Criblage de la banque d'expression pour cloner le(s) gène(s) de protéine(s) fixant la séquence cible.

XI.3.1 Amplification de la banque

La banque utilisée ici est une banque de lymphocytes humains clonée en fusion avec le domaine transactivateur GAL4 de levure dans le vecteur pACT porteur du gène de résistance à l'ampicilline et du gène codant la leucine. Afin d'obtenir suffisamment de plasmide pour transformer les souches de levures rapporteurs, la banque a été amplifiée selon le protocole du fournisseur (*Matchmaker cDNA library* Clontech). La bactérie hôte est *E. Coli* BNN 132. Son génotype est le suivant: *endA1 gyr96 hsdR17 relA1 supE44 thi Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB⁺ lacI^qZ ΔM15] λKC (kan-cre)*. Brièvement, après titration de la banque, environ 20 000 colonies sont étalées par boîte. 150 boîtes LB Amp de 150 mm ont été nécessaires afin d'obtenir plus de 2 à 3 fois le nombre de clones indépendants présents dans la banque. La croissance des bactéries s'effectue à 30°C en raison de la présence du répresseur thermosensible λ dans le vecteur pACT. Les colonies sont grattées et remises en suspension dans 2 l de LB + Amp puis

mises en incubation à 30°C sous agitation pendant 3 à 4 h. La purification de l'ADN plasmidique est effectuée par centrifugation en gradient de CsCl (Sambrook *et al.*, 1989).

XI.3.2 Transformation des levures

La souche rapporteur choisie (G22pHISi ou G25pHISi) est rendue compétente selon la technique décrite précédemment. Les levures sont resuspendues dans 1,5 ml de tampon TE/LiAc et ajoutées à 300 µg d'ADN de la banque et 100 µg de carrier. Après 5 min à température ambiante, le mélange ADN/levures est repris dans 17 ml de PEG/LiAc, transféré dans un Erlen-Meyer et mis en incubation à 30°C pendant 30 min sous agitation (200 rpm). Après addition de 2 ml de DMSO, le flacon est incubé 15 min à 42°C en agitant de temps en temps puis est placé quelques secondes dans un mélange eau/glace. Après centrifugation 5 min à 1000 g à température ambiante, le culot de cellules est remis en suspension dans un volume à déterminer de TE1X stérile (selon la quantité de boîtes à étaler, compter 200µl par boîte environ). Les levures sont étalées sur 100 boîtes de 150mm SD/-Leu/-His contenant 15 mM de 3AT et mise en incubation à 30°C pendant 4 à 6 jours. Les plus grosses colonies sont repiquées sur milieu sélectif.

XI.3.3 Isolement du (des) plasmide(s) de la levure

Chaque clone candidat est inoculé dans 5 ml de SD liquide /-Leu/-His/+3AT pour maintenir la pression de sélection. Les levures sont mises en incubation à 30°C sous agitation (250 rpm) pendant 20h environ (jusqu'à saturation de la culture). Après centrifugation à 1000 g de 5 min à température ambiante, le culot est resuspendu dans 200µl de tampon de lyse (Triton X100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). Pour lyser complètement les levures et purifier le plasmide, 200 µl de microbilles de verre (Sigma) sont ajoutées ainsi que 200µl d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). Les tubes sont passés au vortex pendant 2 min puis centrifugés à 14 000 g pendant 10 min. Le surnageant est prélevé et l'ADN est précipité par 2,5 volumes d'éthanol absolu et 1/10ème de volume d'acétate de sodium 3M. Après 30 min à -70°C, les tubes sont centrifugés à 14 000 g pendant 10 min. Les culots sont lavés à l'éthanol à 70°, séché sous vide et resuspendu dans 20 µl de TE 1X.

Cette préparation n'est pas utilisable pour un séquençage direct ou des digestions enzymatiques car le nombre de copies d'ADN est généralement trop faible chez la levure pour une détection sur gel d'agarose. Une étape de transformation chez *E. Coli* est nécessaire pour

amplifier le plasmide. Les méthodes standards de transformation bactérienne ont été utilisées (Sambrook *et al.*, 1989) tout d'abord dans la souche XL1 puis dans la souche HB101 (*hsdS20(r^B- m^B-) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rspL20 xyl-5 mtl-1 recA13 mcrB mrr*) qui permet une complémentation de sa mutation *leuB* et la résistance à l'ampicilline portées par le plasmide pACT. La sélection s'effectue sur milieu minimum M9 (Sambrook *et al.*, 1989) supplémenté avec une solution de *dropout* -Leu.

Devant l'échec de ces procédures, une autre technique d'extraction de plasmide à partir d'une colonie de levures et une transformation chez *E. Coli* a été utilisée sans succès (Kaiser and Auer, 1993).

La technique de PCR peut aussi être utilisée pour amplifier les inserts portés par le plasmide pACT (*Matchmaker AD LD -Insert screening amplimer* Clontech). Cette technique a été employée sans succès sur les préparations de plasmides précédentes mais aussi directement sur colonies tel que l'ont décrit Schenck *et al.*, 1996.

COMPOSITION DES TAMPONS

Bleu de bromophénol: saccharose 40%; 20 mM EDTA; bleu de bromophénol 0,05%

BLOTTO: Tris HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, 5% de poudre de lait)

Milieu LB: bactotryptone 10g/l, extrait de levure 5g/l, NaCl 5g/l, pH 7.2)

Milieu YPD: peptone (Difco) 20g/l; extrait de levure 10g/l; agar 20 g/l (uniquement pour les boîtes) pH 5,8. Après autoclavage, ajouter du glucose pour une concentration finale de 2%.

Milieu SD (*synthetic dropout*): base azotée sans acide aminé (Difco) 6,7 g/l; agar 20g/l (pour les boîtes) pH 5,8. Glucose 2%, solution dropout 1X.

PBS 1X: NaCl 136 mM; Na₂HPO₄ 4,3 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM (pH 7,3)

Solution de chlorure de Césium: CsCl 5,7 M; EDTA 0,1 M pH 7,5; DEPC 0,1%.

Solution Dropout 10X: L-isoleucine 300 mg/l; L-Valine 1500 mg/ml; L-Adénine (sels hémisulfatés) 200 mg/l; L-Arginine, HCl 200 mg/l; L-Histidine, HCl 200 mg/l; L-Leucine 1 g/l; L-Lysine, HCl 300 mg/l; L-Méthionine 200 mg/l; L-Phénylalanine 500 mg/l; L-Thréonine 2 g/l; L-Tryptophane 200 mg/l; L-Tyrosine 300 mg/l; L-Uracile 200 mg/l. Autoclaver et conserver à 4°C.

SSC 20X : NaCl 3M; Citrate Trisodique 0,3 M.

STE 1X: NaCl 100 mM; Tris 10 mM pH 8; EDTA 1mM.

Tampon A (extraits nucléaires): HEPES-KOH 10 mM, pH 7,9 à 4°C; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,2 mM.

Tampon C (extraits nucléaires): HEPES-KOH 20 mM, pH 7,9; glycérol 25%; NaCl 420 mM; MgCl₂ 1,5 mM; EDTA 0,2 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,2mM.

Tampon GT: isothiocyanate de guanidium 40 mM; citrate trisodique 5 mM; β mercaptoéthanol 0,7 %; sarcosyl 0,5 %; DEPC 0,1%.

Tampon d'hybridation SSPE: NaH₂PO₄, H₂O 50 mM pH 7,2; NaCl 750 mM; EDTA 5 mM; Denhardt's 5X; formamide 50%; ADN de sperme de saumon dénaturé 20 µg/ml; SDS 0,1%.

Tampon d'hybridation 7,5X: formamide 50%, EDTA 1,5 mM, Denhardt's 1X; HEPES 50 mM pH 7; SSC 7,5X, ADN sp 25 µg/ml.

Tampon d'hybridation pour oligonucléotides: SSC 6X; Denhardt's 5X; SDS 0,2%.

Tampon LUC: Tris, HCl pH 8, 25 mM; MgCl₂ 8 mM; DTT 1 mM; Triton X100 1%; glycérol 15%

Tampon de lyse (levure): Triton X100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH 8,
EDTA 1 mM

Tampon PEG/LiAc: PEG 4000 40%, TE/LiAc 1X.

Tampon phosphate 100X: Na_2HPO_4 6,8 mM; NaH_2PO_4 3,2 mM

Tampon TMG: Tris 50 mM pH 7,5. NaCl 0,1 M; MgSO_4 10 mM, gélatine 0,01%.

Tampon TSB: LB pH 6,1; PEG 10%; DMSO 5%; MgCl_2 10mM; MgSO_4 10 mM)

TBE 10X: Tris 0,089M; Acide borique 0,089M; EDTA 0,02M (pH8).

TE 1X: Tris 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM.

TE/LiAc 1X: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; acétate de Lithium 100 mM (Sigma), pH 7,5.

TNE-50: Tris Hcl pH 7,5 10 mM; NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM).

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed R. and Gray D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*, 272: 54-59.
- Akasaka T., Miura I, Takahashi N., Akasaka H., Yonetani N., Ohno H., Fukuhara S. and Okuma M. (1997). A recurring translocation, t(3;6)(q27;p21), in non-Hodgkin's lymphoma results in replacement of the 5' regulatory region of *BCL6* with a novel *H4* histone gene. *Cancer Res.*, 57: 7-12.
- Albagli O., Dhordain P., Deweindt C., Lecocq G., and Leprince D. (1995). The BTB/POZ domain : a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth & Diff.*, 6: 1193-1198.
- Albagli O., Dhordain P., Bernardin F., Quief S., Kerckaert J.P. and Leprince D. (1996) Multiple domains participate in distance-independent LAZ3/BCL6 mediate transcriptional repression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 220: 911-915.
- Albert T., Mautner J., Funk J.O., Hörtnagel K., Pullner A. and Eick D. (1997). Nucleosomal structures of the *c-myc* promoters with transcriptionally engaged RNA Polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 4363-4371.
- Allman D., Jain A., Dent A., Maile R.R., Selvaggi T., Kehry M.R. and Staudt L.M. (1996) BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood*, 87: 5257-5268.
- Anderson D.G., and Kowalczykowski. S.C. (1997). The translocating RecBCD enzyme stimulates recombination by directing RecA protein onto ssDNA in a χ -regulated manner. *Cell*, 90: 77-86.
- Aoki K., Nakahara K., Ikegawa C., Seto M., Takahashi T., Minowada J., Strominger J.L., Marziazar R.T. and Kasai M. (1994). Nuclear proteins binding to a novel target sequence within the recombination hotspot regions of Bcl-2 and the immunoglobulin D_H gene family. *Oncogene*, 9: 1109-1115.
- Aoki K., Suzuki K., Sugano T., Tasaka T., Nakahara K., Kuge O., Omori A. and Kasai M. (1995). A novel gene, *Translin*, encodes a recombination hotspot binding protein associated with chromosomal translocations. *Nature Genet.*, 10: 167-174.
- Aplan P.D., Chervinsky D.S., Stanulla M. and Burhans W.C. (1996). Site-specific DNA cleavage within the *MLL* breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors. *Blood*, 7: 2649-2658.
- Arnold A., Kim H.G., Gaz R.D., Eddy R.L., Fukushima Y., Byers M.B., Shows T.B. and Kronenberg H.M. (1989). Molecular cloning and mapping of DNA rearranged with the parathyroid hormone gene in a parathyroid adenoma. *J. Clin. Invest.*, 83: 2034-2039.
- Bajalica-Lagerkrantz S., Piehl F., Lagerkrantz J., Lindahl J., Weber G., Kerclaert J.P., Porwit-McDonald A. and Nordenskjold M. (1997). Expression of LAZ3/BCL6 in follicular center (FC) B cells of reactive lymph nodes and FC-derived non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia*, 11: 594-598.
- Bardwell V.J. and Treisman R. (1994). The POZ domain : a conserved protein-protein interaction domain. *Genes Dev.*, 8: 1664-1667.
- Barlow C., Hirotsune S., Paylor R., Liyanage M., Eckhaus M., Collins F., Shiloh Y., Crawley J.N., Ried T. and Tagle D. (1996). ATM-deficient mice: a paradigm of Ataxia Telangectasia. *Cell*, 86: 159-171.
- Baron B.W., Nucifora G., McCabe N., Espinosa R.III, Le Beau M.M., and McKeithan T.W. (1993). Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B-cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5262-5266.
- Baron B.W., Stanger R.R., Hume E., Sadhu A., Mick R., Kerckaert J.P., Deweindt C., Bastard C., Nucifora G., Zeleznik-Le N., and McKeithan T.W. (1995). *BCL6* encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Genes Chromosom. Cancer*, 13: 221-224.

- Baron B.W., Desai M., Baber L.J., Paras L., Zhang Q., Sadhu A., Duguay S., Nucifora G., Mc Keithan T.W. and Zeleznik-Le N. (1997). BCL6 can repress transcription from the human immunodeficiency virus type I promoter/enhancer region. *Genes Chromosom. Cancer*, 19: 14-21.
- Bastard C., Tilly H., Lenormand B., Bigorgne C., Boulet D., Kunlin A., Monconduit M. and Piguet H. (1992). Translocations involving band 3q27 and Ig gene regions in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 79: 2527-2531.
- Bastard C., Deweindt C., Kerckaert J.P., Lenormand B., Rossi A., Pezella F., Fruchart C., Duval C., Monconduit M. and Tilly H. (1994). *LAZ3* rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype and clinical outcome in 217 patients. *Blood*, 83: 2423-2427.
- Bernardin F., Collyn-d'Hooghe M., Quief S., Bastard C., Leprince D. and Kerckaert J.P. (1997). Small deletions occur in highly conserved regions of the *LAZ3/BCL6* Major Translocation Cluster in one case of non-Hodgkin's lymphoma without 3q27 translocation. *Oncogene*, 14: 849-855.
- Betz A.G., Milstein C., Gonzalez-Fernandez A., Pannell R., Larson T., Neuberger M.S. (1994). Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell*, 77: 239-248.
- Biedermann K.A., Sun J., Jaccia J., Tosto L.M. and Brown J.M. (1991). *Scid* mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double strand repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 1394-1397.
- Bianco P.R. and Kowalczykowski S.C. (1997). The recombination hotspot Chi is recognized by the translocating RecBCD enzyme as the single strand of DNA containing the sequence 5'-GCTGGTGG-3'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 6706-6711.
- Blunt T., Finnie N.J., Taccioli G.E., Smith G.C.M., Demengeot J., Gottlieb T.M., Mizuta R., Varghese A.J., Alt F.W., Jeggo P.A. and Jackson S.P. (1995). Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine *scid* mutation. *Cell*, 80: 813-823.
- Bouffler S., Silver A. and Cox R. (1993). The role of DNA repeats and associated secondary structures in genomic instability and neoplasia. *Bioessay*, 15: 409-412.
- Brown L., Cheng J.T., Chen Q., Siciliano M.J., Crist W., Buchanan G. and Baer R. (1990). Site-specific recombination of the *tal-1* gene is a common occurrence in human T-cell leukemia. *EMBO J.*, 10: 3343-3351.
- Butler M., Lida S., Rao P., Louie D., Houldsworth, Chaganti R.S.K. and Dalla-Favera R. (1997). Identification of an alternative chromosomal breakpoint site 5' to the BCL-6 locus in diffuse large cell lymphoma. *Blood*, 90 (supl.1), 316a.
- Capello D., Carbone A., Pastore C., Gloghini A., Saglio G. and Gaidano G. (1997). Point mutations of the BCL-6 gene in Burkitt's lymphoma. *Brit. J. Haematol.*, 99: 168-170.
- Cattoretti G., Chang C.-C., Cechova K., Zhang J., Ye H.B., Falini B., Louie C.D., Offit K., Chaganti R.S.K. & Dalla-Favera R. (1995). BCL-6 protein is expressed in germinal center B cells. *Blood*, 86: 45-53.
- Cattoretti G., Zhang J., Cleary A.M., Lederman S., Gaidano G., Carbone A., Chaganti R.S.K. & Dalla-Favera R. (1997). Down-regulation of the BCL-6 gene expression by CD40 and EBV latent membrane protein-1 (LMP-1) and its block in lymphoma carrying BCL-6 rearrangements. *Blood*, 90 (supl.1), 175 a.
- Carbone A., Gaidano G., Gloghini A., Pastore C., Saglio G., Tirelli U., Dalla-Favera and Falini B. (1997). BCL-6 protein expression in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: inverse relationship with Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 expression. *Am. J. Pathol.*, 150: 155-165.

- Chalk J.G., Barr F.G. and Mitchell C.D. (1997). Translin recognition site sequences flank chromosome translocation breakpoints in alveolar rhabdomyosarcoma cell lines. *Oncogene*, 15: 1199-1205.
- Chang C.C., Ye B.H., Chaganti R.S. and Dalla Favera R. (1996). BCL6, a POZ-Zinc finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6947-6952.
- Chardin P., Courtois G., Mattei M.G. and Gisellbrecht S. (1991). The *KUP* gene, located on human chromosome, encodes a conserved protein with two distinct zinc fingers. *Nucleic Acids Res.*, 19: 1434-1436.
- Chen D.J., Umesono K. and Evans R.M. (1996). SMRT isoforms mediate repression and anti-repression of nuclear heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 7567-7571.
- Chen S.J., Chen Z., d'Auriol L., Le Coniat M., Grausz D. and Berger R. (1989). Ph1⁺bcr⁻ acute leukemias: implication of Alu sequences in a chromosomal translocation occurring in the new cluster region within the BCR gene. *Oncogene*, 4: 195-202.
- Chen W., Lida S., Louie D.C., Dalla-Favera R. and Chaganti R.S. (1998). Heterologous promoters fused to BCL6 by chromosomal translocations affecting band 3q27 cause its deregulated expression during B-cell differentiation. *Blood*, 91: 603-607.
- Chen Z., Brand N.J., Chen A., Chen S.J., Tong J.H., Wang Z.Y., Waxman S. and Zelent A. (1993). Fusion between a novel Krüppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor- α locus due to a variant t(11;17) translocation associated with promyelocytic leukemia. *EMBO J.*, 12: 1161-1167.
- Coffman R.L., Leberman D.A. and Rothman P. (1993). Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv. Immunol.*, 54: 229-270.
- Croce C.M. (1991). Molecular biology of leukemias and lymphomas. *Origins of human cancer: a comprehensive review*, (CSH Laboratory Press), 527-542.
- Dallery E., Galiègue-Zouitina S., Collyn-d'Hooghe M., Quief S., Denis C., Hildebrand M.P., Lantoine D., Deweindt C., Tilly H., Bastard C. and Kerckaert J.P. (1995). TTF, a gene encoding a novel small G protein, fuses to the lymphoma-associated *LAZ3* gene by t(3;4) chromosomal translocation. *Oncogene*, 10: 2171-2178.
- Dallery-Prudhomme E., Roumier C., Denis C., Preudhomme C., Kerckaert J.P. and Galiègue-Zouitina S. (1997). Genomic structure and assignment of the *RhoH/TTF* small GTPase gene (*ARHH*) to 4p13 by *in situ* hybridization. *Genomics*, 43:89-94.
- Danska J.S and Guidos C.J. (1997). Essential and perilous V(D)J recombination and DNA damage checkpoints in lymphocyte precursors. *Seminars in immunology*, 9: 199-206.
- Davis J.M., Kabarowski J.H.S., Hawe N., Morriss-Kaye G.M., Dhordain P., LePrince D. and Zelent A. (1997). A novel BTB/POZ domain zinc-finger protein, a potential target of the *LAZ3/BCL6* oncogene. *Blood*, 90 (supl.1), 175 a.
- Dent A.L., Schaffer A.L., Yu X., Allman D. and Staudt L.M. (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science*, 276: 589-592.
- Desiderio S., Lin W.C., and Li Z. (1996). The cell cycle and V(D)J recombination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 217: 45-59.
- Devesa S.S. and Fears T. (1992). Non-Hodgkin's lymphoma time trends : United States and international data. *Cancer Res.*, 52, 5432-5440.
- Deweindt C., Albagli O., Bernardin F., Dhordain P., Quief S., Lantoine D., Kerckaert J.P. and LePrince D. (1995). The *LAZ3/BCL6* oncogene encodes a sequence-specific transcriptional inhibitor: a novel function for the BTB/POZ domain as an autonomous repressing domain. *Cell Growth & Diff.*, 6: 1495-1503.
- Deweindt C., Kerckaert J.P., Tilly H., Quief S., Nguyen V.C. and Bastard C. (1993). Cloning of the breakpoint cluster region at band 3q27 involved in human non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Chromosom. Cancer*, 8: 149-154.

- Dhordain P., Albagli O., Ansieau S., Koken M.H.M., Deweindt C., Quief S., Lantoine D., Leutz A., Kerckaert J.P. and Leprince D. (1995). The BTB/POZ domain targets the LAZ3/BCL6 oncoprotein to nuclear dots and mediates homomerization *in vivo*. *Oncogene*, 11: 2689-2697.
- Dhordain P., Albagli O., Lin R.J., Ansieau S., Quief S., Leutz A., Kerckaert J.P., Evans R.M. and Leprince D. (1997). Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10762-10767.
- Di Bello P.R., Withers D.A., Bayer C.A., Fristrom J.W. and Guild G.M. (1991). The *Drosophila Broad-Complex* encodes a family of related proteins containing zinc fingers. *Genetics*, 129: 385-397.
- Dong S., Zhu J., Reid A., Strutt P., Guidez F., Zhong H.J., Wang Z.Y., Licht J., Waxman S., Chomienne C. *et al.*, (1996). Amino-terminal protein-protein interaction motif (POZ domain) is responsible for activities of the promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor- α fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 3624-3629.
- Dooley S., Seib T., Welter C. and Blin N. C-myb intron I protein binding and association with transcriptional activity in leukemic cells. (1996) *Leukemia Research*, 20: 429-439.
- El-Deiry W.S., Harper J.W., PM O.C., Velculescu V.E., Canman C.E., Jackman J., Pietenpol J.A., Burrell M., Hill D.E., Wang Y. *et al.* (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53 mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.*, 54: 1169-1174.
- Elledge S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, 274: 1164-1171.
- Falini B., Fizzoti M., Pileri S., Liso A., Pasqualucci L. and Flenghi L. (1997). BCL-6 protein expression in normal and neoplastic lymphoid tissues. *Annals of Oncology*, 8 (sup 2), 101-104.
- Felix C.A., Lange B.J., Hosler M.R., Fertala J. and Bjornsti M.A. (1995). Chromosome band 11q23 translocation breakpoints are DNA topoisomerase II cleavage sites. *Cancer Res*, 55: 4287-4292.
- Flenghi L., Ye B.H., Fizzoti M., Bigerna B., Cattoretti G., Venturi S., Pacini R., Pileri S., Lo Coco F., Pescarmona E., Pelicci P-G., Dalla-Favera R. and Falini B. (1995). A specific monoclonal antibody (PG-B6) detects expression of the BCL-6 protein in germinal center B cells. *Am. J. Pathol.*, 147: 405-411.
- Foley J., Ley C.A. and Parysek L.M. (1994). The structure of the human peripherin gene (PRPH) and identification of potential regulatory elements. *Genomics*, 22: 456-461.
- Friedberg E.C., Walker G.C. and Siede W. (1995). *DNA repair and mutagenesis* (Washington, D.C.). American Society for Microbiology.
- Fukuda T., Miki T., Yoshida T, Hatano M., Ohashi K., Hirosawa S. and Tokuhisa T. (1995). The murine *BCL6* gene is induced in activated lymphocytes as an immediate early gene. *Oncogene*, 11: 1657-1663.
- Fukuda T., Yoshida T, Okada S., Hatano M., Miki T., Ishibashi K., Okabe S., Koseki H., Hirosawa S. and Taniguchi M. (1997). Disruption of the *BCL6* gene results in an unpaired germinal center formation. *J. Exp. Med.*, 186: 439-448.
- Fukusawa K., Choi T., Kuriyama R., Rulong S. and Van De Woude G.F. (1996). Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*, 271: 1744-1747.
- Gaidano G., Lo Coco F., Ye B.H., Shibata D., Levine A.M., Knowles D.M. and Dalla-Favera R. (1994). Rearrangements of the *BCL-6* gene in acquired immunodeficiency syndrome-associated non-Hodgkin's lymphoma : association with diffuse large-cell subtype. *Blood*, 83: 397-402.
- Gaidano G., Carbone A., Pastore C., Capello D., Migliazza A., Gloghini A., Roncella S., Ferrarini M., Saglio G. and Dalla-Favera. (1997). Frequent mutations of the 5' non coding

- region of the *BCL-6* gene in acquired immuno deficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*, 89: 3755-3762.
- Galiègue-Zouitina S., Quief S., Hildebrandt M.P., Denis C., Lecocq G., Collyn-d'Hooghe M., Bastard C., Yuille M., Dyer J.S. and Kerckaert J.P. (1996). The B cell transcriptional co-activator *BOB1/OBF1* gene fuses to the *LAZ3/BCL6* gene by t(3;11)(q27;q23.1) chromosomal translocation in a B cell leukemia line (Karpas 231). *Leukemia* 10, 579-587.
- Galson D.L., Tan C.C., Ratcliffe P.J. and Bunn H.F. (1993). Comparison of the human and mouse erythropoietin genes shows extensive homology in the flanking regions. *Blood*, 82: 3321-3326.
- Gellert M. (1997). Recent advances in understanding V(D)J recombination. *Adv. Immunol.*, 64: 39-64.
- Giese K., Kingsley C., Kirshner R. and Grosschedl R. (1995). Assembly and function of a TCR α enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes & Dev.*, 9: 995-1008.
- Gstaiger M., Knoepfel L., Georgiev O., Schaffner W. and Hovens C.M. (1995). A B-cell coactivator of octamer-binding transcription factor. *Nature*, 373: 360-362.
- Guidos C., Williams C., Grandal I., Knowless G., Huang M.T. and Denska J. (1996). V(D)J recombination activates a p53-dependent DNA-damage checkpoint in *scid* lymphocyte precursors. *Genes & Dev.*, 10: 2038-2054.
- Gwynn B., Lyford K.A. and Birkenmeier E.H. (1990). Sequence conservation and structural organization of the Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase promoter in mice and humans. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 5244-5256.
- Hadden TJ, Ryou C, Miller RE (1997). Elements in the distal 5'-flanking sequence and the first intron function cooperatively to regulate glutamine synthetase transcription during adipocyte differentiation. *Nucleic Acids Res*, 25 (19) :3930-3936.
- Hagman J. and Grosschedl R. (1994). Regulation of gene expression at early stages of B-cell differentiation. *Current Biology*, 6: 222-230.
- Hajra A., Martin-Gallardo A., Tarley S.A., Freedman M., Wilson-Gunn S., Bernards A. and Colins F.S. (1994). DNA sequences in the promoter region of the NF1 gene are highly conserved between human and mouse. *Genomics*, 21: 649-652.
- Hall M. and Peters G. (1996). Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv. Cancer Res.*, 68: 67-108.
- Harriman W., Volk H., Defranoux N., and Wabl M. (1993). Immunoglobulin class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.*, 11: 361-384.
- Harris N.L., Jaffe E.S., Stein H., Banks P.M., Chan J.K., Cleary M.L., Delsol G., De Wolf-Peeters C., Fallini B and Gatter K.C. (1994). A revised European American Classification of lymphoid neoplasms: a proposal for the international study. *Blood*, 84: 1361-1392.
- Harrison S.D. and Travers A.A. (1990). The tramtrack gene encodes a Drosophila finger protein that interacts with the ftz transcriptional regulatory region and shows a novel embryonic expression pattern. *EMBO J*, 9:207-216
- Hendrickson E.A., Qin X.Q., Bump E.A., Schatz D.J., Oettinger M. and Weaver D.T. (1991). A link between double strand break related repair and V(D)J recombination: the *Scid* mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4061-4065.
- Henriksson M. and Lüscher B. (1996). MYC proteins: essential regulators of cell growth. *Adv. Cancer Res.*, 68: 110-169.
- Henkel G. and Brown M.A. (1994). PU.1 and GATA: components of a mast-cell specific interleukin 4 intronic enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7737-7741.
- Hiddemann W., Longo D.L., Coiffier B., Fisher R.I., Cabannillas F., Cavalli F., Nadler L.M., De Vita V.T., Lister T.A. and Armitage J.O. (1996). Lymphoma classification: the gap between biology and clinical management is closing. *Blood*, 88:4085-4089.

- Hunter T. and Pines J. (1994). Cyclins and Cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of ages. *Cell*, 79: 573-582.
- Hunter T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell*, 88: 333-346.
- Hörtnagel K, Mautner J, Strobl LJ, Wolf DA, Christoph B, Geltinger C, Polack A (1995). The role of immunoglobulin kappa elements in c-myc activation. *Oncogene*, 10: 1393-1401.
- Jaeger U., Purtscher B., Karth G.D., Knapp S., Mannhalter C., and Lechner K. (1993). Mechanism of the chromosomal translocation t(14;18) in lymphoma: detection of the 45 Kd breakpoint binding protein. *Blood*, 81: 1833-1840.
- Johansson B., Mertens F. and Mitelman F. (1995). Cytogenetic evolution patterns in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 86: 3905-3914.
- Joos S., Folk M.H., Lichter P., Haluska F.G., Henglein B., Lenoir G.M. and Bornkamm G.W. (1992). Variable breakpoints in Burkitt Lymphoma cells with chromosomal t(8;14) translocation separate c-myc and the IgH locus up to several hundred Kb. *Hum. Mol. Genet.*, 1: 625-632.
- Kaiser P. and Auer B. (1993). Rapid shuttle plasmid preparation from yeast cells by transfert to *E. Coli*. *Biotechnics*, 14: 552.
- Kasai M., Matsuzaki T., Katayanagi K., Omori A., Maziarz R.T., Strominger J.L., Aoki K. and Suzuki K. (1997) The Translin ring specifically recognize DNA ends at recombination hot spots in the human genome. *J. Biol. Chem.*, 272: 11402-11407.
- Kawabe T., Naka T., Yoshida K. Tanaka T., Fujiwara H., Suematsu S., Yoshida N., Kishimoto T. and Kikutani H. (1994). The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*, 1: 167-178.
- Kawamata N., Miki T., Fukuda T., Hirosawa S. and Aoki N. (1994a). The organization of the *BCL6* gene. *Leukemia*, 8: 1327-1330.
- Kawamata N., Miki T., Ohashi K., Suzuki K., Fukuda T., Hirosawa S. and Aoki N. (1994b). Recognition DNA sequence of a novel putative transcription factor BCL6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204, 366-374.
- Kelsoe G. (1995). *In situ* studies of the germinal center reaction. *Advances in Immunol.*, 60: 267-288.
- Kerckaert J.P., Deweindt C., Tilly H., Quief S., Lecocq G. and Bastard C. (1993). *LAZ3*, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphoma. *Nature Genet.*, 5, 66-70.
- Kim S.Y., Chung H.J. and Thomas T.L. (1997). Isolation of a novel class of bZIP transcription factor that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast-one hybrid system. *Plant Journal*, 11: 1237-1251.
- Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1997). Gatekeepers and gatetakers. *Nature*, 386: 761-762.
- Kirsch I.R. and Lista F. (1997). Lymphocyte-specific genomic instability and risk of lymphoid malignancy. *Seminars Immunology*, 9: 207-215.
- Kluin P.M., Han J., van Krieken J.M. (1997). Malignant lymphomas stem from different B cell populations. *Human B cell populations*, *Chem. Immunol.* (Basel, Karger), Editions Ferrarini et Caligaris-Cappio, vol 67: 70-84.
- Knapp S., Karth G.D., Friedl J., Purtscher B., Mitterbauer G., Domer P.H. and Jaeger U. (1994). Guanine-rich (GGNNGG) elements at chromosomal breakpoints interact with a loop-forming, single-stranded DNA binding protein. *Oncogene*, 9: 1501-1505.
- Knudson A.G. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10914-10921.
- Ko L.J. and Prives C. (1996). P53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.*, 10: 1054-1072.
- Koken M.H.M., Reid A., Quignon F., Chelbi-Alix N.K., Davies J.M., Kabarowski J.H.S., Zhu J., Dong S., Chen S.J., Chen Z. *et al.*, (1997). Leukemia-associated retinoic acid receptor-a

- fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10255-10260.
- Komatsu H., Lida S., Yamamoto K., Mikuni C., Nitta M., Takahashi T., Ueda R., Seto M. (1994). A variant chromosome translocation at 11q23 identifying PRAD1/cyclinD1 as the BCL-1 gene. *Blood*, 84: 1226-1231.
- Koonin E.V., Senkevich T.G. and Cherenos V.I. (1992). A family of DNA virus gene that consists of fused portions of unrelated cellular genes. *Trends Biochem. Sci.*, 17: 213-214.
- Koop B.F., Rowen L., Wang K., Kuo C.L., Seto D., Lenstra J.A., Howard S., Shan W., Deshpande P. and Hood L. (1994). The human T-cell receptor TCRAC/TCRDC (C α /C δ) region: organization, sequence, and evolution of 97.6 kb of DNA. *Genomics*, 19: 478-793.
- Korsmeyer S. (1992). BCL-2 initiates a new category of oncogenes : regulators of cell death. *Blood*, 80 : 879-886.
- Küppers R., Zhao M., Hansmann M.L. and Rajewsky K. (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J.*, 12: 4955-4967.
- Küppers R., Rajewsky K. and Hansmann M.L. (1997). Diffuse large cell lymphomas are derived from mature B cells carrying V region genes with a high load of somatic mutation and evidence of selection for antibody expression. *Eur. J. Immunol.*, 27 : 1398-1405.
- LaVallee TM, Morrison SL (1996). Identification and functional characterization of a highly conserved sequence in the intron of the kappa light chain gene. *Mol. Immunol.*, 33: 973-988.
- Levine A.J. (1997). P53: the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88: 323-331.
- Lewis S.M., Agard E., Suh S. and Czyzyk L. (1997). Cryptic signals and the fidelity of the V(D)J joining. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 3125-3136.
- Li J. and Herskowitz I. (1993). Isolation of *ORC6*, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science*, 262: 1870-1873.
- Li X. and Nicklas R.B. (1995). Mitotic forces control a cell cycle checkpoint. *Nature*, 373: 630-632.
- Li Z., Otevrel T., Gao Y., Cheng H.L., Seed B., Stamato T.D., Taccioli G.E. and Alt F.W. (1995). The *XRCC4* gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell*, 83: 1079-1089.
- Li M.J., Peakman M.C., Golub E.I., Reddy G., Ward D.C., Radding M.C. and Maizels N. (1996). RAD51 expression and localization in B cells carrying out class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 1222-1227.
- Licht J.D., Shakhovich R., English M.A., Melnick A., Li J.Y., Reddy J.C., Dong S., Chen S.J., Zelent A. and Waxman S. (1996). Reduced and altered DNA-binding and transcriptional properties of the PLZF-retinoic acid receptor- α chimera generated in t(11;17)-associated acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 12: 323-336.
- Limpens J., Stad R., Vos C., de Vlaam C., de Jong D., van Ommen G.J., schuurung E. and Kluin P.M. (1995). Lymphoma associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood*, 85: 2528-2536.
- Lin B., Nasir J., Kalchman M.A., McDonald H., Zeisler J., Goldberg Y.P. and Hayden M.R. (1994). Structural analysis of the 5' region of mouse and human Huntington disease genes reveals conservation of putative promoter region and di-and trinucleotide polymorphisms. *Genomics*, 25: 707-715.
- Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH Jr, Evans RM. (1998). Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature*, 391 :811-814.
- Litz C.E., Vos J.A. and Copenhaver C.M. (1996). Aberrant methylation of the major translocation cluster region in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 88: 2241-2249.

- Liu J., Nau M.M., Zucman-Rossi J., Powell J.I., Allegra C.J. and Wright J.J. (1997) LINE-1 element insertion at the t(11;22) translocation breakpoint of a desmoplastic small round cell tumor. *Genes Chromosom. Cancer*, 18: 232-239.
- Liu P., Tarle S.A., Hajra A., Claxton D.F., Marlton P., Freedman M., Siciliano M.J., and Collins F.S. (1993). Fusion between transcription factor CBF β /PEBP2 β and myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science*, 261: 1041-1044.
- Liu Y.J., Johnson G.D., Gordon J. and Mc Lennan I.C.M. (1992). Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. *Immunology Today*, 13: 17-21.
- Lo Coco F., Ye B.H., Lista F., Corradini P., Offit K., Knowles D.M., Chaganti R.S.K. and Dalla-Favera R. (1994). Rearrangements of the *BCL6* gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma *Blood*, 83, 1757-1759.
- Look A.T. (1995). Oncogenic role of « master » transcription factors in human leukemias and sarcomas: a developmental model. *Adv. in Cancer Res.*, 67: 25-57.
- Look A.T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*, 272: 1059-1064.
- Madisen L and Groudine M. (1994). Identification of a locus control region in the immunoglobulin heavy-chain locus that deregulates c-myc expression in plasmacytoma and Burkitt's lymphoma cells. *Genes Dev.*, 15: 2212-2226.
- Matolcsy A., Casali P., Warnke R.A. and Knowless M.D. (1996). Morphology transformation of follicular lymphoma ios associated with somatic mutation of the translocated BCL-2 gene. *Blood*, 88 : 3937-3944.
- McDonnell T.J., Deane N., Platte F.M., Nunez G., Jaeger U., McKearn J.P. and Korsmeyer S.J. (1989). BCL-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B-cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, 57 : 79-88.
- McKenzie A.N.J., Li X., Largaespada D.A., Sato A., Kaneda A., Zurawski S.M., Doyle E.L., Milatovich A., Francke U., Copeland N.G., Jenkins N.A. and Zurawski G. (1993). Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes. *J. Immunol.*, 150, 5436-5444.
- Mc Lennan I.C.M. (1994). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.*, 12: 117-139.
- Megonigal M.D., Rappaport E.F., Jones D.H., Kim C.S., Nowell P.C., Lange B.J. and Felix C.A. (1997). Panhandle PCR strategy to amplify MLL genomic breakpoints in treatment-related leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 11583-11588.
- Migliazza A., Martinotti S., Chen W., Fusco C., Ye B.H., Knowles D.M., Offit K., Chaganti R.S.K. and Dalla-Favera R. (1995). Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the *BCL6* gene in B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92: 12520-12524.
- Migliazza A., Ye B.H., Fracciola N., Neri A., Baldini L. Chaganti R.S.K. and Dalla-Favera R. (1997) Mutations of the 5' non-coding region of BCL-6 are common in B cell malignancies and can deregulate BCL-6 expression. *Blood*, 90 (supl. 1), 177a.
- Miki T., Kawamata N., Arai A., Ohashi K., Nakamura Y., Kato A., Hirosawa S. and Aoki N. (1994a). Molecular cloning of the breakpoint for 3q27 translocation in B-cell lymphomas and leukemias. *Blood*, 83: 217-222.
- Miki T., Kawamata N., Hirosawa S. and Aoki N. (1994b). Gene involved in the 3q27 translocation associated with B-cell lymphoma, BCL-5, encodes a Krüppel-like zinc-finger protein. *Blood*, 83: 26-32.
- Mombaerts P., Iacomini J., Johnson R.S., Herrup K., Tonegawa S. and Papaioannou V.E. (1992). RAG-1 -deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, 68: 869-877.
- Morgan S.E. and Kastan M.B (1997). P53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. *Adv. in Cancer Res.*, 71: 1-27.

- Moriyama M., Yamochi T., Semba K., Akiyama T. and Mori S. (1997). BCL-6 is phosphorylated at multiple sites in its serine-and proline-clustered regions by mitogen-activated protein kinase (MAPK) *in vivo*. *Oncogene*, 14: 2465-2474.
- Morse B., South V.J., Rothberg P.G. and Astrin S.M. (1989). Somatic mutation and transcriptional deregulation of MYC in endemic Burkitt's lymphoma disease : heptamer-namer recognition mistakes ? *Mol. Cell. Biol.*, 9 : 74-82.
- Motokura T., Bloom T., Kim H.G., Juppner H., Ruderman J.V., Kronenberg H.M. and Arnold A. (1991). A novel cyclin encoded by a bcl-1 linked candidate oncogene. *Nature*, 350: 512-514.
- Nacheva E., Dyer M.J.S., Fischer P., Stranks G., Heward J.N., Marcus R.E., Grace C., Karpas A. (1993). C-MYC translocations in *de novo* B cell lineage acute leukemias with t(14;18) (cell lines Karpas 231 et 353). *Blood*, 82: 231-240.
- Nakamura Y., Miki T., Kawamata N., Hirosawa S., Saito K., Enokihara H., Furusawa S. and Shishido H. (1995). Biallelic DNA rearrangements and deletions within the *BCL-6* gene in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Brit. J. Haematol.*, 90, 404-408.
- Nakamura Y., Miki T., Miura I., Hashimoto K., Miura A., Akimoto K., Hirosawa S., Saito K., Enokihara H., Furusawa S. and Shishido H. (1996). Internal DNA deletion within the *BCL-6* gene on untranslocated chromosome in non-Hodgkin's lymphoma with 3q27 abnormality. *Leukemia*, 10: 658-661.
- Negrini M., Sillini E., Kozak C., Tsujimoto Y. and Croce C.M. (1987). Molecular analysis of mbcl-2: structure and expression of the murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. *Cell*, 49: 455-463.
- Neri A., Barriga F., Knowless D.M., Magrath I.T. and Dalla-Favera R. (1988). Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt's lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85: 2748-2752.
- Niu H., Ye B.H., Chaganti R.S.K. and Dalla-Favera R. (1997). Antigen receptor-induced, MAP kinase-mediated signalling pathway leading to BCL-6 phosphorylation and degradation in B cells. *Blood*, 90 (supl 1), 387 a.
- Numoto M., Niwa O., Kaplan K.K., Wong K.K., Merell K., Kamiya K., Yanagihara K. and Calame K. (1993). Transcriptional repressor ZF5 identifies a new conserved domain in zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res.*, 21: 3767-3775.
- Offit K., Jhanwar S.C., Ebrahim S.A.D., Filippa D.A., Clarkson B.D. and Chaganti R.S. (1989). t(3;22)(q27;q11): a novel translocation associated with diffuse non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 74: 1876-1879.
- Offit K., Jhanwar S.C., Ladanyi M., Filippa D.A. and Chaganti R.S. (1991). Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: correlations between recurrent aberrations, histology and exposure to cytotoxic treatment. *Genes Chromosom. Cancer*, 3: 189-201.
- Offit K., Lo Coco F., Louie D.C., Parsa N.Z., Leung D., Portlock C., Ye B., Lista F., Filippa D.A., Rosenbaum A. *et al.*, (1994). Rearrangement of the *BCL-6* gene as a prognostic marker in diffuse large cell lymphoma. *New Eng. J. Med.*, 331: 74-80.
- Ohashi K., Miki T., Hirosawa S. and Aoki N. (1995). Characterization of the promoter region of human *BCL-6* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214: 461-467.
- Ohno H., Takimoto G. and Mc Keithan T.H. (1990). The candidate proto-oncogene *BCL-3* is related to gene implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell*, 60: 991-997.
- Onizuka T., Moriyama M., Yamochi T., Kuroda T., Kazama A., Kanazawa N., Sato K., Kato T., Ota H. and Mori S. (1995). BCL-6 gene product, a 92- to 98-kD nuclear phosphoprotein, is

- highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. *Blood*, 86: 28-37.
- Orr-Weaver T.L. and Weinberg R.A. (1998). A checkpoint on the road to cancer. *Nature*, 392: 223-224.
- Otsuki T., Yano T., Clark H.M., Bastard C., Kerckaert J.P., Jaffe E.S. and Raffeld M. (1995) Analysis of LAZ3(BCL-6) status in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences. *Blood*, 85: 2877-2884.
- Peukert K., Staller P., Schneider A., Carmichael C., Hänel F. and Eilers M. (1997). An alternative pathway for gene regulation by MYC. *EMBO J.*, 16 : 5672-5686.
- Pittaluga S., Ayoubi T.A., Wlodarska I. Stul M., Cassiman J.J., Mecucci C., Van Den Berghe H., Van De Ven W.J. and De Wolf-Peeters C. (1996). BCL-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol*, 179: 145-150.
- Polack A., Feederle R., Klobeck G. and Hörtnagel K. Regulatory elements in the immunoglobulin kappa locus induce *c-myc* activation and the promoter shift in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J.*, 12: 3913-3920.
- Ponticelli A.S., Schultz D.W., Taylor A.F. and Smith G.R. (1985). Chi-dependent DNA strand cleavage by RecBC enzyme. *Cell*, 41 : 145-151.
- Rabbitts T.H. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*, 372: 143-149.
- Raffeld M. and Jaffe E.S. (1991). BCL-1, t(11,14), and mantle-cell derived lymphomas. *Blood*, 78 : 259-263.
- Rajewsky K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381: 751-758.
- Ramsden D.A., Paull T.T. and Gellert M. (1997). Cell-free V(D)J recombination. *Nature*, 388: 488-491.
- Reed J.C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*, 387: 773-776.
- Reid A., Gould A., Brand N., Cook M., Strutt P., Li J., Licht J., Waxman S., Krumlauf R. and Zelent A. (1995). Leukemia translocation gene, *PLZF*, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood*, 86: 4544-4552.
- Rimokh R., Berger F., Bastard C., Ffrench M., Archimbaud E., Gadoux M., Duret L., Vuillaume M., Coiffier B., Bryon P.A. and Magaud J.P. (1994). Rearrangement of CCND1 3' untranslocated region in mantle cell lymphomas and t(11q13) associated leukemias. *Blood*, 83: 3689-3695.
- Rohrer Y. and Conley M.E. (1998). Transcriptional regulatory elements within the first intron of Bruton's Tyrosine Kinase. *Blood*, 91: 214-221.
- Roumier C., Zouitina S., Soenen V., Bastard C., Fenaux P., Copin M.C., Morschauser K., Lai J.L., Kerckaert J.P. and Preudhomme C. FISH analysis with a YAC probe on interphase and metaphase cells improves detection of LAZ3/BCL6 disruption in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 90 (supl. 1), 389 a.
- Sachs A.B. (1993). Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell*, 74: 413-421.
- Sambrook, J. Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, CSH.
- Sawada S., Scarborough J.D., Killeen N. and Littman D.R. (1994). A lineage-specific transcriptional silencer regulates CD4 gene expression during T lymphocyte development. *Cell*, 77: 917-929.
- Schendel S.L., Xie Z., Montal M.O., Matsuyama S., Montal M. and Reed J.C. (1997). Channel formation by anti-apoptotic protein BCL-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 : 5513-5518.
- Schenk J.A., Heymann S., Peters L.E. and Micheel B. (1996). Screening for recombinant plasmids in yeast colonies of the two-hybrid system using PCR. *Biotechnics*, 20: 812-816.

- Schichman S., Caligiuri M., Strout M., Gu Y., Canaani E., Bloomfield C. and Croce C. (1994). *All-1* tandem duplication in acute leukemia with a normal karyotype involves homologous recombination between *Alu* elements. *Cancer Res.*, 54 : 4277-4280.
- Schlissel M.S. and Stanhope-Baker P. (1997). Accessibility and the developmental regulation of V(D)J recombination. *Sem. Immunol.*, 9: 161-170.
- Schubart D.B., Rolink A., Kosco-Vilbois M.H., Botteri F. and Matthias P. (1996). B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal center formation. *Nature*, 383: 538-547.
- Schwarz E.M., Krimpenfort P., Berns A. and Verma I.M. (1997). Immunological defects in mice with a targeted disruption in *Bcl-3*. *Genes & Dev.*, 11: 187-197.
- Séité P., Hillion J., d'Agay M.F., Berger R. and Larsen J.C. (1993). BCL2 complex rearrangement in follicular lymphoma: translocation *mbr/J_H* and deletion in the *vcr* region of the same BCL2 allele. *Oncogene*, 8: 3073-3080.
- Seyfert V., Allman D., He Y. and Staudt L.M. (1996). Transcriptional repression by the proto-oncogene BCL-6. *Oncogene*, 12: 2331-2342.
- Seto M., Jaeger U., Hockett R.D., Graniger W., Bennett P.G., and Korsmeyer S.J. (1988). Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the *BLC-2-Ig* fusion gene in lymphoma. *EMBO J.*, 7: 123-131.
- Sherr C.J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, 79: 551-555.
- Shinkai Y., Rathbun G., Lam K.P., Oltz E.N., Stewart V., Mendelsohn M., Shaaron J., Datta M., Young F., Stall A.M. and Alt F.W. (1992). RAG-2 deficient mice lack mature lymphocyte owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, 68: 855-867.
- Singh H., LeBowitz J.H., Baldwin A.S.Jr. and Sharp P.A. (1988). Molecular cloning of an enhancer binding protein: isolation by screening of an expression library with recognition site DNA. *Cell*, 52: 415-423.
- Smider V. and Chu G. (1997). The end-joining reaction in V(D)J recombination. *Seminars in immunology*, 9: 189-197.
- Solomon E., Borrow J. and Goddard A.D. (1991). Chromosome aberrations and cancer. *Science*, 254: 1153-1159.
- Spencer C.A. and Groudine M. (1990). Transcriptional elongation and eukaryotic gene regulation. *Oncogene*, 5: 777-785.
- Stanhope-Baker P., Hudson K.M., Shaffer A.L., Constantinescu A. and Schlissel M.S. (1996). Cell type-specific chromatin structure determines the targeting of V(D)J recombinase activity in vitro. *Cell*, 85: 887-897.
- Stalunna M., Wang J., Chervinsky D.S., Thandla S. and Aplan P.D. (1997). DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region is a specific event which occurs as part of higher-order chromatin fragmentation during the initial apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4070-4079.
- Stewart A.K. and Schwartz R.S. (1994). Immunoglobulin V regions and the B cell. *Blood*, 83: 1717-1730.
- Stillman B. (1996). Cell cycle control of DNA replication. *Science*, 274: 1659-1664.
- Strobl L.J., Kohlhuber F., Mautner J., Polack A. and Eick D. Absence of a paused transcription complex from the *c-myc* P2 promoter of the translocation chromosome in Burkitt's lymphoma cells: implication for the *c-myc* P1/P2 promoter shift. *Oncogene*, 8: 1437-1447.
- Strubin M., Newell J.W. and Matthias P. (1995). OBF-1, a novel B-cell specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer-binding proteins. *Cell*, 80: 497-506.
- Stürbecher H.W., Donzelmann B., Henning W., Knippschild U. and Buchhop S. (1996). P53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J.*, 15: 1992-2002.

- Su W., Jackson S., Tjian R. and Echols H. (1991) DNA-looping between sites for transcriptional activation: cell-association of DNA-bound Sp1. *Genes & Dev.*, 5: 820-826.
- Tanaka S., Louie D.C., Kant J.A. and Reed J.C. (1992). Frequent incidence of somatic mutations in translocated BCL2 oncogenes of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*, 79 : 229-237.
- Tachibana K, Takayama N, Matsuo K, Kato S, Yamamoto K, Ohyama K, Umezawa A, Takano T. (1993). Allele-specific activation of the c-myc gene in an atypical Burkitt's lymphoma carrying the t(2;8) chromosomal translocation 250 kb downstream from c-myc. *Gene*, 28 :231-237.
- Tsujimoto Y., Finger L.R., Yunis J.J., Nowell P.C. and Croce C.M. (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B-cells with (14;18) translocation. *Science*, 226: 1097-1099.
- Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J., Jaffe E., Croce C.M. (1985). The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*, 229: 1390-1393.
- Tsujimoto Y., Jaffe E., Cossman J., Gorham J., Nowell P.C. and Croce C.M. (1985). Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasm with t(11;14) chromosome translocation. *Nature*, 315: 340.
- Tsiagbe V.K., Inghirami G. and Thorbecke G.J. (1996). The physiology of germinal centers. *Crit. Rev. Immunol.*, 16: 381-421.
- van Gent D., Hiom K., Paull T.T. and Gellert M. (1997). Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins. *EMBO J*, 16: 2665-2670.
- van Gent D., Ramsden T.A., and Gellert M. (1996). The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell*, 85: 107-113.
- van Lohuizen M, Frasch M, Wientjens E, Berns A (1991). Sequence similarity between the mammalian bmi-1 proto-oncogene and the Drosophila regulatory genes Psc and Su(z)2. *Nature* , 26 : 353-355.
- Wahbi K., Hayette S., Callanan M., Gadoux M., Charrin C., Magaud J.P. and Rimokh R. (1997). Involvement of a human endogenous retroviral sequence THE-7 in a t(7;14)(q21;q32) chromosomal translocation associated with a B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 11: 1214-1219.
- Wang M.M. and Reed R.R. (1993). Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature*, 364: 121-126.
- Whang Peng J., Knutsen T., Jaffe E.S., Steinberg S.M., Raffeld M., Zhao W.P. Duffey P., Condron K., Yano T. And Longo D.L. (1995). Sequential analysis of 43 patients with non-Hodgkin's lymphoma : clinical correlation with cytogenetic, cytologic, immunophenotyping, and molecular studies. *Blood*, 85 : 203-216.
- Weaver D.T. (1995). V(D)J recombination and double-strand break repair. *Adv. Immunol.*, 58: 29-85.
- Weinberg R.A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science*, 254: 1138-1145.
- Xiong W.C. and Montell C. (1993). Tramtrack is a transcriptional repressor required for cell determination in the *Drosophila* eye. *Genes & Dev.*, 7:1085-1096.
- Xu CF, Chambers J.A., Nicolai H., Brown M.A., Hujeirat Y., Mohammed S., Hodgson S., Kelsell D.P. , Spurr N.K., Bishop D.T. and Solomon E. (1997) Mutations and alternative splicing of the BRCA1 gene in UK breast/ovarian cancer families. *Genes Chromosomes Cancer*, 18: 102-110.
- Xu Y. and Baltimore D. (1996). Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. *Genes & Dev.*, 10: 2401-2410.
- Yamochi T., Kitabayashi A., Hirokawa M., Miura A.B., Onizuka T., Mori S. and Moriyama M. (1997). Regulation of BCL6 gene expression in human myeloid/monocytoid leukemic cells. *Leukemia*, 11: 694-700.

- Ye B.H., Lista F., Lo Coco F., Knowles D.M., Offit K., Chaganti R.S.K. and Dalla-Favera R. (1993a). Alterations of a zinc finger-encoding gene, *BCL-6*, in diffuse large-cell lymphoma. *Science*, 262: 747-750.
- Ye B.H., Rao P.H., Chaganti R.S.K. and Dalla-Favera R. (1993b). Cloning of *bcl-6*, the locus involved in chromosome translocation affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. *Cancer Res.*, 53: 2732-2735.
- Ye B.H., Chaganti S., Chang C.C., Niu H., Corradini P., Chaganti R.S.K. and Dalla-Favera R. (1995). Chromosomal translocations cause deregulated *BCL6* expression by promoter substitution in B cell lymphoma. *EMBO J.*, 14: 6209-6217.
- Ye B.H., Cattoretto G., Shen Q., Zhang J., Hawe N., De Waard R., Leung C., Nuri-Shirazi M., Orazi A., Chaganti R.S.K. *et al.*, (1997). The *BCL-6* proto-oncogene controls germinal center formation and Th2-type inflammation. *Nature genet.*, 16: 161-170.
- Yelamos J., Klix N., Goyenechea B, Lozano F., Chui Y.L., Gonzales Fernandez A., Pannell R., Neuberger M.S. and Milstein C. (1995). Targetting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. *Nature*, 376: 225-229.
- Yoshida T., Fukuda T., Okabe S., Hatano M., Miki T., Hirose S., Miyasaka N., Isono K. and Tokuhisa T. (1996). The *BCL6* gene is predominantly expressed in keratinocytes at their terminal differentiation stage. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 228: 216-220.
- Young R.L. and Korsmeyer S.J. (1993). A negative regulatory element in the *bcl-2* 5'-untranslated region inhibits expression from an upstream promoter. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 3686-3697.
- Zajac-Kaye M., Gelmann E.P. and Levens D. (1988). A point mutation in the *c-myc* locus of Burkitt's lymphoma abolishes binding of a nuclear protein. *Science*, 240: 1776-1779.
- Zajac-Kaye M. and Levens D. (1990). Phosphorylation-dependent binding of a 138 kDa myc intron factor to a regulatory element in the first intron *c-myc* gene. *J. Biol. Chem.*, 265 : 4547-4551.
- Zheng B., Xue W. and Kelsoe G. (1994). Locus-specific somatic hypermutation in germinal center T-cells. *Nature*, 372: 556-559.
- Zollman S., Godt D., Privé G.G., Couderc J.L. and Laski F.A. (1994). The BTB domain found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionary conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*.

ANNEXE

Small deletions occur in highly conserved regions of the *LAZ3/BCL6* major translocation cluster in one case of non-Hodgkin's lymphoma without 3q27 translocation

Florence Bernardin¹, Maud Collyn-d'Hooghe¹, Sabine Quief¹, Christian Bastard², Dominique Leprince¹ and Jean-Pierre Kerckaert¹

¹U124 INSERM, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, Place de Verdun, 59045 LILLE Cedex, France; ²Département de Cytogénétique, Centre de Transfusion Sanguine, 76232 Bois-Guillaume Cedex, France

The *LAZ3/BCL6* gene encoding a Zinc-finger nuclear protein is altered in Non-Hodgkin's Lymphomas (NHLs) by translocations, mutations and/or deletions clustered in its 5' non coding region, in a 3.3 Kbp *EcoRI* fragment which thus defines the Major Translocation Cluster (MTC). In the present study, we describe at the molecular level the deletions found in the MTC of two (NHL) cases using, (i) DNA obtained from a patient (GUI) with a monosomy 3 and three microdeletions of 101, 22, 25 bp in its unique untranslocated 3q27 allele; (ii) a cell line derived from a patient (VAL) carrying a t(3;4) (q27;p11) translocation and a 2.4 Kbp deletion in the untranslocated allele. As the MTC is recurrently subject to alterations, we have cloned and sequenced the murine equivalent of the human MTC and promoter region in an attempt to identify sequences well conserved in mammals that may be thus important for the *LAZ3/BCL6* gene regulation. We show that the human and mouse 5' upstream regions of the *LAZ3/BCL6* gene although mainly intronic share a particularly high homology of 79% on the overall sequence. Strikingly, the small sequences which are deleted in patient (GUI) are highly conserved (81%, 100% and 92% respectively). Furthermore, they may play a role in the pathogenesis since proteins prepared from B cell lines and HeLa nuclear extracts bind to these sequences in gel retardation assays. Although a large part of this region is intronic, the high conservation of its sequence and the frequency of alterations in NHLs suggest that they are likely to be significant for the regulation of the *LAZ3/BCL6* gene.

Keywords: *LAZ3/BCL6*; lymphoma; major translocation cluster

Introduction

Chromosomal translocations involving the 3q27 band are recurrently found in non-Hodgkin's lymphomas (NHLs) especially in 30–40% of diffuse large B cell lymphomas (DLCLs) (Lo Cocco *et al.*, 1994; Bastard *et al.*, 1994). A cluster of breakpoints within the 3q27 region has been identified (Baron *et al.*, 1993; Deweindt *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 1993a; Miki *et al.*, 1994) and a candidate proto-oncogene *LAZ3* (Kerckaert *et al.*, 1993), also called *BCL6* (Ye *et al.*, 1993b) or *BCL5* (Miki *et al.*, 1994) affected by these translocations, was

cloned. The *LAZ3/BCL6* gene encodes for a protein containing six C terminal *Krüppel*-like zinc fingers (Kerckaert *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 1993b; Miki *et al.*, 1994) and a N terminal BTB/POZ domain (Bardwell *et al.*, 1994; Albagli *et al.*, 1995), suggesting that the *LAZ3/BCL6* protein may act as a transcriptional regulator. The *LAZ3/BCL6* coding sequence was found to be highly conserved since the murine *LAZ3/BCL6* protein shows 95% amino-acid identity with its human counterpart (Fukuda *et al.*, 1995). A *LAZ3/BCL6* recognition DNA sequence has been identified *in vitro* (Kawamata *et al.*, 1994; Baron *et al.*, 1995) and *LAZ3/BCL6* has recently been shown to be a transcriptional repressor through this sequence (Deweindt *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1996). This property relies mainly but not exclusively on the BTB/POZ domain which acts as an autonomous and transferable transcriptional repressing domain (Albagli *et al.*, 1996). Although clearly implicated in (DLCLs), the mechanisms underlying the *LAZ3/BCL6* oncogenic activation have not been fully elucidated yet. However, the *LAZ3/BCL6* gene seems to be implicated in B cell differentiation since its expression appears tightly regulated during this process (Cattoretti *et al.*, 1995). Indeed it is expressed in mature B cells within germinal centers but neither in immature B cells precursors nor in differentiated plasma cells (Cattoretti *et al.*, 1995; Flenghi *et al.*, 1995; Onizuka *et al.*, 1995). The human *LAZ3/BCL6* promoter has been recently characterized (Ohashi *et al.*, 1995) and the commonly accepted hypothesis is that chromosomal translocations alter *LAZ3/BCL6* expression in B cell lymphomas by promoter substitution (Ye *et al.*, 1995).

The majority of the 3q27 breakpoints are clustered within a 3.3 Kbp *EcoRI* fragment called MTC (Major Translocation Cluster), spanning the first non coding exon and the first intron of the *LAZ3/BCL6* gene (Kerckaert *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 1995) (Figure 1). Other deletions and even biallelic DNA rearrangements have been identified in the MTC (Nakamura *et al.*, 1995, 1996). In addition, 73% of DLCL and 47% of follicular lymphomas (FL) display alterations which are often biallelic including point mutations and/or small deletions in the same region. A sub-domain of the MTC, a 730 bp fragment starting ~100 bp of the 3' boundary of the first exon, has recently been identified by SSCP analysis as the Major cluster since it is altered by mutations in 28/29 cases (Migliozza *et al.*, 1995). This region will be referred to as the MMC for Major Mutations Cluster (see Figure 1b). We have previously reported the same kind of biallelic rearrangements in a B cell line established from a

patient (VAL) carrying a translocation t(3;4) (q27;p11) (Deweindt *et al.*, 1993; Dallery *et al.*, 1995).

Here, we precisely describe at the molecular level this case with a translocated allele and the other one carrying a 2.4 Kbp deletion in the MTC. In addition, we report another case of NHL, patient (GUI), presenting a monosomy three in absence of 3q27 translocation and three microdeletions of 22, 25 and 101 bp in the same region of its remaining LAZ3/BCL6 allele. Taken together, these data suggest an important role for the LAZ3/BCL6 MTC. In order to better define sequences that may be significant for the LAZ3/BCL6 gene regulation, we used a phylogenetic approach to define sequences in the MTC subjected to strong evolutionary constraints. We have determined the human LAZ3/BCL6 promoter and MTC genomic sequence and compared it to its murine counterpart. This study has highlighted well conserved sequences which include the microdeletions found as the only chromosomal abnormality in the NHL patient (GUI).

Results

Two other cases of LAZ3/BCL6 biallelic rearrangements in the MTC

In a previous study, we have described by Southern blot analysis a case of 3q27 biallelic rearrangement from a

patient (VAL) with DLCL (Deweindt *et al.*, 1993; Dallery *et al.*, 1995). To precise the length of the deletion in the untranslocated allele, we have cloned and sequenced the abnormal band and detected a 2.4 Kbp deletion covering most of the MTC region. Deletion boundaries are located ~100 bp downstream of the first exon and 300 bp of the EcoRI site at the MTC end (in the middle of the first intron) (Figures 1 and 2).

We also report the interesting case of a NLH patient (GUI) whose cytogenetic analysis has shown a monosomy of chromosome 3 in absence of any cytogenetically visible 3q27 chromosomal abnormalities. However, using Southern blot analysis of the MTC region, a small deletion of ~200 bp was suspected on his LAZ3/BCL6 unique allele (data not shown). Cloning and sequence analyses revealed the existence of three microdeletions of respectively 101, 22 and 25 bp located within the MTC (see Figures 1 and 2 for detailed location and sequence).

No sequences similar to the heptamer-nonamer Ig recombination signals were found at the boundaries of these deletions, thus excluding the participation of the Ig recombinase in their genesis.

Sequence alignment of the human and mouse 5' upstream region of the LAZ3/BCL6 gene

Several probes derived from the MTC region produced strong hybridization signal on a Zooblot suggesting that this region could be well conserved through

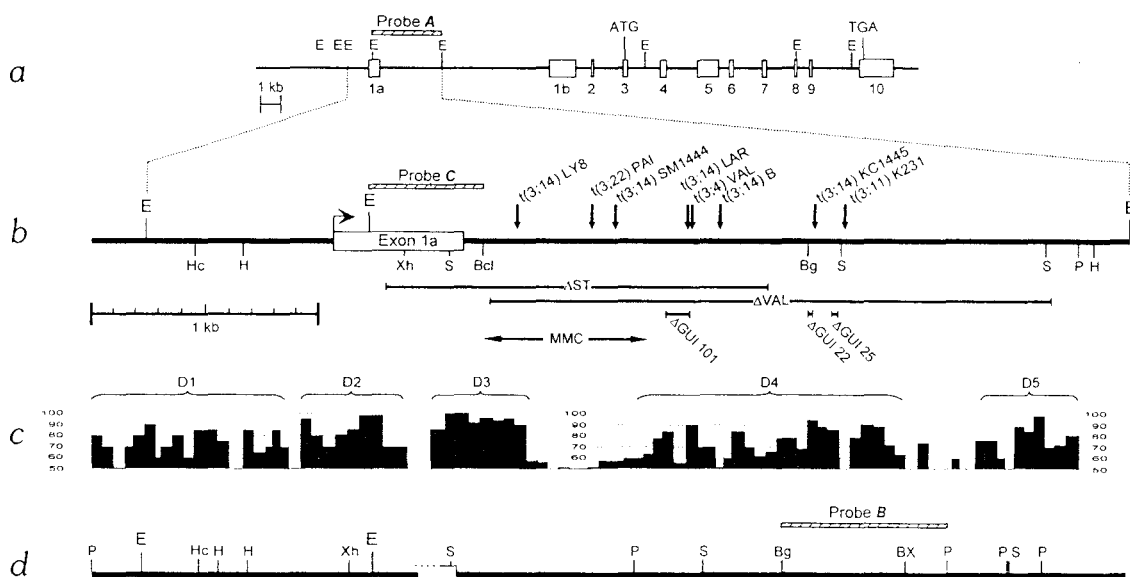


Figure 1 Restriction map of the human and murine LAZ3/BCL6 sequences analysed. (a) Human genomic organization of the LAZ3/BCL6 gene. Exons are indicated by numbered boxes, the coding sequence is delimited by ATG and TGA codons. Note the existence of two alternative first exons, 1a and 1b. (b) Human promoter and major translocation cluster (MTC) restriction map. Thick arrows indicate the position of the published chromosomal breakpoints: Ly8, SM1441, KC1445 breakpoints positions are derived from Ye *et al.* (1995); PAI, LAR, VAL and K231 breakpoints positions have been determined in our laboratory (Deweindt *et al.*, 1993; Galiégue-Zouitina *et al.*, 1996; Kerckaert *et al.*, unpublished results); B breakpoint is derived from Baron *et al.* (1993). The MMC (for Major Mutations Cluster) indicated the region described by Migliazza *et al.* (1995) where mutations are preferentially found. Δ ST is the deletion recently described by Nakamura *et al.* (1996). The (VAL) deletion is represented by the Δ VAL segment. The three microdeletions found in patient GUI are represented by small segments Δ GUI101, Δ GUI22, Δ GUI25 respectively. The putative major transcription start site identified by Ohashi *et al.* (1995) is represented by a thin arrow. Restriction enzyme abbreviations are B: BamHI, Bcl: BclI, Bg: BglII, E: EcoRI, H: HindIII, Hc: HindII, P: PstI, S: SacI, X: Xba, Xh: XhoI. (c) Histogram illustrating the homologies found between the human 5' non coding region shown in (b) and the mouse corresponding region (d). The percentage of homology was calculated with a window of 50 bp. Only percentages above 50% are represented. The different conserved domains defined (D1 to D5) are shown by brackets. (d) Restriction map of the mouse genomic sequence corresponding to the human sequence shown in (b). The murine sequence has been constructed from several overlapping clones (data not shown). The end of the first exon is shown by an open box and derived from Fukuda *et al.* (1995)



species (data not shown). To confirm this hypothesis, we cloned the murine genomic counterpart of the LAZ3/BCL6 promoter and MTC region, and compared its sequence to its human equivalent. The genomic sequence alignment shown in Figure 2

revealed the existence of highly conserved regions between the human and murine LAZ3/BCL6 region studied. A schematic drawing of this alignment is also presented in Figure 1c. The overall human sequence (ca. ~4310 bp) corresponding to the promoter and the

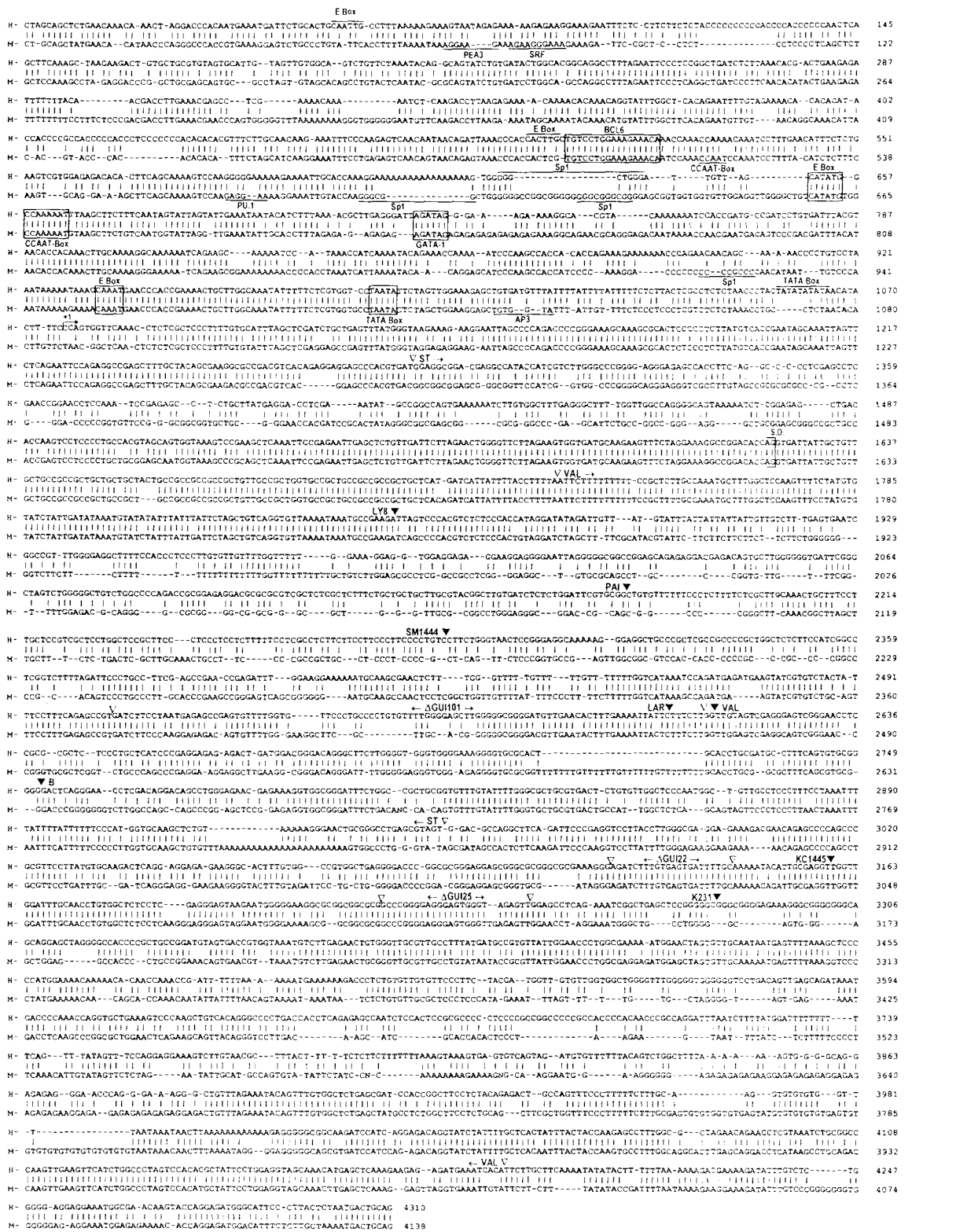


Figure 2 Alignment of promoter and MTC regions in the human and mouse LAZ3/BCL6 genes. EMBL nucleotide sequence data base accession numbers are Z79581 and Z79582 respectively. The sequences were aligned with the NALIGN PCGENE program using an open gap cost of one and a unit gap cost of five. Putative regulatory elements are underlined, those entirely conserved are included in boxes. The human transcription start site is indicated (+). V: deletions boundaries. ▼: translocation breakpoints. The 3' end of the first exon is indicated by S.D. (Splice donor)

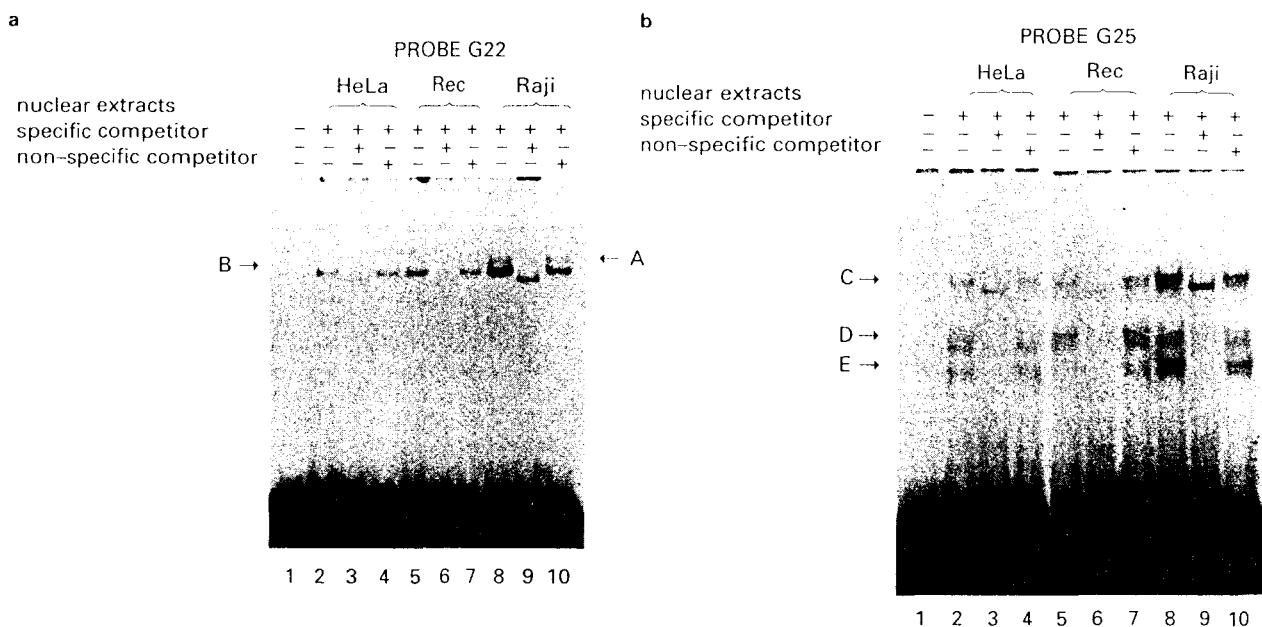


Figure 3 Mobility shift assay with probes corresponding to the two GUI microdeletions with nuclear extracts from Raji, Rec and HeLa cell lines. (a) Lane 1: G22 probe alone, lane 2: G22 plus HeLa extracts, lane 3: as lane 2 plus a 100-fold molar-excess of cold G22 oligonucleotide as specific competitor, lane 4: as lane 2 plus PU1 oligonucleotide as cold non-specific competitor, lanes 5, 6, 7: as lanes 2, 3, 4 but with Rec extracts, lanes 8, 9, 10: as lanes 2, 3, 4 but with Raji extracts (b) lane 1: probe G25 alone, lane 2: G25 plus HeLa extracts, lane 3: as lane 2 plus a 100-fold molar-excess of cold G25 oligonucleotide as specific competitor, lane 4: as lane 2 plus PU1 oligonucleotide as cold non-specific competitor, lanes 5, 6, 7: as lanes 2, 3, 4 but with Rec extracts, lanes 8, 9, 10: as lanes 2, 3, 4 but with Raji extracts

MTC shows 79% homology to its murine equivalent (ca. ~4138 bp).

Comparison of the human *LAZ3/BCL6* promoter sequence and its murine equivalent also shows 79% homology. The first conserved domain D1 spans the first 1 Kbp of the alignment and matches with the promoter region (Figure 1b).

Several responsive elements previously described (Ohashi *et al.*, 1995) are highly conserved in the mouse putative promoter region: two E-box, a *LAZ3/BCL6*, a Sp1 and a GATA-1 recognition sites are entirely conserved. One base differs from the human E-box in the murine sequence (position 482, Figure 2). Several putative responsive elements appear unique in the mouse sequence: there is a second potential Sp1 binding site (located at position 912, Figure 2), potential PEA3, SRF, PU1 and Ap3 binding sites are also indicated Figure 2. Two putative CCAAT boxes are located at positions 511 and 666, four potential TATA boxes are found (positions 60, 310, 1004 and 1118), one of which is entirely conserved (position 1004). Strikingly, this TATA box is different from the putative TATA box identified by Ohashi *et al.* (1995) in the human sequence. Furthermore, this TATA region (position 1060 in Figure 2) is absent in the mouse sequence.

The published murine cDNA begins 491 bp downstream of the human cDNA (Fukuda *et al.*, 1995). The initiation start site for the mouse *LAZ3/BCL6* gene is not known but is likely to be different from the human one. The region around the initiation start site of the human gene belongs to domain D2 and shows 83% homology. Surprisingly, a region within the human first exon is poorly conserved (Figures 1c and Figure 2 from position ~1343 to 1485).

The human MTC sequence (starting at position 1222 in Figure 2) shows 79% homology with its murine equivalent. Several sub-domains with strong homology

can also be defined: D3 (nt 1483 to nt 1891) which spans the 3' end of the first exon and the following 250 bp, D4 (nt 2373 to nt 3530) which contains the three GUI deletions and D5 (nt 3876 to nt 4310). Additional studies comparing the human and mouse sequence by using another alignment program (NMATPUS) confirmed the localization of the different domains (data not shown).

To study more precisely the *LAZ3/BCL6* MTC sequence, a search for repeated sequences known for their instability was undertaken. No direct or inverted repeats of more than 15 bp were found along the human sequence and three direct repeats were found in the murine sequence. Respectively five and four palindromic sequences were found along the human and murine sequences (data not shown). Interestingly one of them (position 3137–3146) is 100% identical and is precisely superposed to the 22 bp GUI microdeletion (see Figure 2). Transcription factors consensus binding sites were found neither along these palindromic sequences, except the human TATA box, nor along the (GUI) 22 and 25 bp microdeletions.

The D3 domain shows 94% homology with its mouse counterpart. This high degree of homology does not only result from the presence of the human exon 1 since excluding exonic sequences, known to be well conserved, yields an homology score of ~90%.

Downstream of D3 domain, from position ~1891 to 2373, the percentage of homology is weaker between the human and the mouse sequence. In striking contrast, the sequences deleted in the GUI case are located in the D4 domain, in small blocks with higher homology (92%). Del GUI 101 is included in a conserved block from positions 2445 to 2722 (Figure 2), the two GUI microdeletions, 22 and 25 bp, belong to a very conserved fragment from nt 3113 to 3268. These deleted sequences are very well conserved since the sequence

corresponding to del GUI 22 bp is 100% identical to its murine counterpart and the del GUI 25 bp equivalent is 92% homologous but this is only due to the presence of two additional bases in the murine sequence. The 101 bp fragment also deleted in GUI is a little less well conserved in the middle, however the percentage of homology remains rather high (81%).

A fifth conserved region can be defined at the MTC end: the D5 domain which shows 83% homology. Noteworthy, the 3' end of the VAL deletion is found in this domain.

Proteins from B cells and HeLa nuclear extracts bind to the most conserved sequences which are deleted in GUI DNA

Although the two highly conserved sequences representing the GUI microdeletions do not contain known transcription factor binding sites, we looked for the presence of sequence-specific DNA-binding proteins on these sequences. We thus performed gel mobility shift assays with the two sequences corresponding to the 22 and 25 bp GUI microdeletions and nuclear extracts prepared from the Raji cell line, known to express high levels of *LAZ3/BCL6* mRNAs; (Otsuki *et al.*, 1995; Onizuka *et al.*, 1995). The same experiments were also performed using nuclear extracts from another B cell line, Rec, which does not express *LAZ3/BCL6* mRNAs (unpublished results) and nuclear extracts from the HeLa cell line, expressing very low levels of *LAZ3/BCL6* mRNAs. The results illustrated in Figure 3 show the presence of several specific proteins/DNA complexes in these three cell lines since complexes A, B, C, D, E are competed by a specific unlabelled probe and are not competed by a non-specific unlabelled probe. Remarkably, one retarded band (A) only appears with the GUI22 probe in the Raji cell line.

Discussion

In the present study, we described two cases of rearrangement of the *LAZ3/BCL6* gene by deletion within the MTC. The first one (VAL) carrying a t(3;4) (q27;p11) translocation and a 2.4 Kbp deletion in the untranslocated allele; the second one (GUI) carrying three microdeletions of 101, 22 and 25 bp in its unique *LAZ3/BCL6* allele. Since these deletions are the only chromosomal abnormality observed in this patient, they could contribute to the transformation of the affected cells and to the NHL development. Nakamura *et al.* (1995) have found 7/35 NHLs cases in which the 3q27 locus was rearranged on both alleles. They have thus suggested that dual rearrangements in the *LAZ3/BCL6* MTC may lead to stronger transforming activity in lymphoma cells and may serve as an unfavourable prognostic marker. They recently reported a biallelic rearrangement occurring in a patient with a t(3;22) translocation and a 1.5 Kbp deletion on the other chromosome 3 allele (Nakumara *et al.*, 1996). This deletion also occurs in the previously described MTC of the *LAZ3/BCL6* gene (see Figure 1).

The mechanisms producing the deletions described are unknown and probably differ from errors of the Ig recombinase since no heptamer-nonamer sequences were found around the deletions boundaries.

The results presented here also show conservation between the human *LAZ3/BCL6* promoter region and its mouse putative counterpart. Remarkably, the E box located upstream of the transcription start site are entirely conserved on line with the high expression of the *LAZ3/BCL6* in human and murine muscle (Kerckaert *et al.*, 1993; Fukuda *et al.*, 1995). A putative *LAZ3/BCL6* binding site is entirely conserved. However, in Luciferase assay experiments this site has not been implicated in the regulation of the gene (Ohashi *et al.*, 1995). The presence of highly conserved responsive elements in this region suggests that they may play a critical role in regulating the *LAZ3/BCL6* gene expression since they are located in the transcriptionally active region reported by Ohashi *et al.* (1995). The promoter region is highly homologous between human and mouse as already observed in the 5' upstream region of other genes such as G3PDH (Gwynn *et al.*, 1990), NF1 (Hajra *et al.*, 1994), HD (Lin *et al.*, 1995) for example.

The sequence alignment shown in Figure 2 defines particularly well conserved domains within the MTC of this gene. Similar levels of homology in noncoding elements have been seen in other genes sequenced both in human and mouse, among them the IL13, PRPH and EPO genes (McKenzie *et al.*, 1993; Foley *et al.*, 1994; Galson *et al.*, 1993). Noteworthy, such a high conservation is unusual for a so long intronic region. For example, intron 1 of the IL13 gene contains a 716 bp fragment of 67% homology with the murine IL13 gene (McKenzie *et al.*, 1993). In fact the MTC region is as much conserved as the promoter region and is even more conserved than some of exon 1a sequences. Thus other regulatory sequences different from the promoter by itself are removed by translocations and/or deletions and are probably implicated in the pathogenesis.

At first sight, the alteration of the *LAZ3/BCL6* gene appears to be similar to other genes implicated in B cell lymphomas since it arises from several mechanisms as: (1) translocations resulting in the juxtaposition of immunoglobulin regulatory sequences (Ye *et al.*, 1995) like *c-myc*, *bcl-2* or *bcl-1* genes (Rabbitts, 1994) or of heterologous promoters (Dallery *et al.*, 1995; Galiègue-Zouitina *et al.*, 1996); (2) the clustering of somatic mutations and/or deletions in the 3' region of exon 1 and the 5' region of intron 1 which may disrupted regulatory elements as it was shown for *c-myc* (Zajac-Kaye *et al.*, 1988; Migliazza *et al.*, 1995). However, no significant variation was established between *LAZ3/BCL6* expression in NHLs with or without rearrangements (Otsuki *et al.*, 1995). Nevertheless, there are growing evidence to suggest that some BTB/POZ proteins as the drosophila GAGA and E(var) 3-93D proteins are transcriptional regulators acting on the structure and condensation of the chromatin. Like other BTB/POZ proteins, subtle changes in the *LAZ3/BCL6* expression may disturb its function on target genes (Albagli *et al.*, 1995). Moreover, the *LAZ3/BCL6* expression is tightly regulated during B cell differentiation since its expression increases in mature B cells and then decreases during their differentiation into plasma cells (Cattoretto *et al.*, 1995; Flenghi *et al.*, 1995). Thus, any inappropriate expression of *LAZ3/BCL6* gene may lead to repression of genes implicated in the terminal

differentiation or in apoptosis of B cells, leading to the neoplastic process. In a NHL case carrying a t(3:14) (q27;q32) translocation, only the translocated allele juxtaposed to the IgH promoter is expressed whereas the «normal» allele remains silent (Ye *et al.*, 1995). Another possibility is deregulation arising from the mutations and/or deletions located in the MTC region. As Migliazza *et al.* (1995) have reported, the particularly high frequency of mutations in the 730 bp region that we called Major Mutations Cluster (MMC in Figure 1) probably reflects the importance of this region in the normal regulation of *LAZ3/BCL6*. Strikingly, this region is only well conserved in the first 200 bp (position ~1700 to 1900 in Figure 2). According to the percentage of homology and the position of the published deletions, our results suggest that some of the *LAZ3/BCL6* putative regulatory sequences are not restricted to the MMC defined by Migliazza *et al.* (1995), but also extend outside, notably downstream where we have found the GUI deletions, maybe upstream in the D3 domain and also downstream in the D5 conserved region. The frequency of mutations and/or deletions in the MTC supports the idea that these alterations could modify protein binding sequences as it was shown for c-myc (Yu *et al.*, 1993). Especially, the sequences of the three deletions carried by GUI DNA are highly homologous between human and mouse. Several proteins from B cell (Raji and Rec) and from HeLa nuclear extracts, specifically bind to the two most conserved of them (G22 and G25). Interestingly, with the GUI22 probe, one of these protein/DNA complexes appears specific for the Raji cell line. For the other proteins/DNA complexes, they are observed in the three cell lines independently of the status of *LAZ3/BCL6* expression and of the nature of these cells suggesting that these proteins are not restricted to B cells (and are probably ubiquitously expressed). As Allman *et al.* (1996) have suggested, *LAZ3/BCL6* expression could be modified by post-transcriptional mechanisms since, for similar mRNA levels, *LAZ3/BCL6* protein expression is higher in germinal center B cells than in resting B cells. On line with these results, we previously observed that in Raji cell line which contains high levels of *LAZ3/BCL6* mRNAs, we were unable to detect the *LAZ3/BCL6* protein with our polyclonal antibodies (Dhordain *et al.*, 1995, our unpublished results). Thus, in these cells, this post-transcriptional regulation could be due to proteins binding to *LAZ3/BCL6* untranslated MTC region such as the proteins detected in gel shift assays with the GUI microdeleted sequences, especially the G22 sequence. Unfortunately, the role of the GUI deletions on *LAZ3/BCL6* expression could not be achieved since no cell line derived from this patient are available. These data strongly suggest that these deletions may play a role in the pathogenesis. Using the yeast one-hybrid system, experiments are in progress for further identification of these proteins.

The identification in the MTC of non coding highly conserved elements provides a starting point for experiments to elucidate the mechanisms of transcriptional regulation of the *LAZ3/BCL6* gene. We propose two not mutually exclusive hypotheses: they may (i) act as silencers or enhancers and be involved in tissue specific expression of the *LAZ3/BCL6* gene (ii) be

important in the processing or in regulating the stability and translation efficiency of the mRNA.

Materials and methods

DNA cloning and sequencing

The human *LAZ3/BCL6* MTC and promoter sequences are derived from subclones of the previously described λ GG1 recombinant, isolated from an EMBL4-normal human DNA library (Deweindt *et al.*, 1993).

A genomic library from patient GUI DNA, was prepared and screened with the F372 probe as previously described (Deweindt *et al.*, 1993). The three microdeletions found in GUI DNA were precisely defined after subcloning and sequence analysis of the corresponding MTC *Eco*RI fragment.

All probes were labelled by the 32 P random priming method. The mouse sequence is derived from several clones (data not shown) isolated from mouse genomic DNA libraries. One mouse clone was isolated in non-stringent hybridization conditions with the 3.3 Kbp *Eco*RI restriction fragment (probe A) corresponding to the human *LAZ3/BCL6* MTC (Figure 1a). A 3.1 Kbp *Eco*RI fragment from this murine clone strongly hybridizing with the human MTC probe, was subcloned in the pBluescript KS vector for further sequence analyses. Using a 0.7 Kbp *Bgl*III/*Pst*I subfragment derived from its 5' extremity as a probe (probe B, Figure 1d), two overlapping genomic clones were obtained. The hybridizing fragments were subcloned and sequenced. In order to obtain the sequence corresponding to the 5' portion of the human *LAZ3/BCL6* first intron, the human *Eco*RI/*Bcl*I fragment (probe C, Figure 1b), containing most part of the first exon was used as a probe. The dideoxy chain termination method and the sequenase 2.1 kit (USB) were used for sequence analyses. The different sequences obtained were then aligned using the NALIGN PCGENE program.

Gel mobility shift assay

Nuclear extracts were prepared as previously described (Andrews and Faller, 1991). The two oligonucleotide probes used G22 and G25 correspond exactly to the microdeletions Δ GUI22 and Δ GUI25 (see Figure 2 for detailed sequence). Mobility shift assays were performed as follows: the binding reaction was set up in a total volume of 10 μ l with 1 μ l of double-stranded, end-labeled oligonucleotide probe, 1 μ l of poly-dIdC (2 mg/ml), 1 μ l BSA (5 mg/ml), 1 μ l of crude nuclear extracts (~15 μ g) qsp 10 μ l binding buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 10 mM β mercapto-ethanol, 15% glycerol). The reaction mixture was incubated 30 min at 32°C, protein/DNA complexes were resolved by a 5% polyacrylamide/TBE 0.5 \times gel electrophoresed for 120 min at 150 V constant in TBE 0.5 \times buffer at room temperature. For competition experiments, incubations were performed with a 100 fold-excess of unlabeled oligonucleotide. The sequence of the non-specific competitor (PU 1) was: 5'-GAATTCCAGAGGAAGAGCTTT-3'.

Acknowledgements

We thank A Begue, Pasteur Institut, Lille for the kind gift of the mouse genomic library. We thank Dr C Bailly for his advice on gel shift assay. The photographic work of M-C Duvieuxbourg was greatly appreciated. This work was supported by funds from INSERM, Association pour la Recherche contre le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer, comité du Nord, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille and Region Nord-Pas-de-Calais.

References

- Albagli O, Dhordain P, Deweindt C, Lecocq G and Leprince D. (1995). *Cell Growth & Diff.*, **6**, 1193–1198.
- Albagli O, Dhordain P, Bernardin F, Quief S, Kerckaert JP and Leprince D. (1996). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **220**, 911–915.
- Allman D, Jain A, Dent A, Maile RR, Selvaggi T, Kehry MR and Staudt LM. (1996). *Blood*, **12**, 5257–5268.
- Andrews NC and Faller DV. (1991). *Nucleic acid Res.*, **19**, 2499.
- Bardwell VJ and Treisman R. (1994). *Genes Dev.*, **8**, 1664–1667.
- Baron BW, Nucifora G, McCabe N, Espinosa R III, Le Beau MM and McKeithan TW. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5262–5266.
- Baron BW, Stanger RR, Hume E, Sadhu A, Mick R, Kerckaert JP, Deweindt C, Bastard C, Nucifora G, Zeleznik-Le N and McKeithan TW. (1995). *Genes Chromosom. Cancer*, **13**, 221–224.
- Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezella F, Fruchart C, Duval C, Monconduit M and Tilly H. (1994). *Blood*, **83**, 2423–2427.
- Cattoretti G, Chang C-C, Cechova K, Zhang J, Ye HB, Falini B, Louie CD, Offit K, Chaganti RSK and Dalla-Favera R. (1995). *Blood*, **85**, 45–53.
- Chang C-C, Ye HB, Chaganti RSK and Dalla-Favera R. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6947–6952.
- Dallery E, Galiègue-Zouitina S, Collyn-d'Hooghe M, Quief S, Denis C, Hildebrand MP, Lantoine D, Deweindt C, Tilly H, Bastard C and Kerckaert JP. (1995). *Oncogene*, **10**, 2171–2178.
- Deweindt C, Albagli O, Bernardin F, Dhordain P, Quief S, Lantoine D, Kerckaert JP and Leprince D. (1995). *Cell Growth & Diff.*, **6**, 1495–1503.
- Deweindt C, Kerckaert JP, Tilly H, Quief S, Nguyen VC and Bastard C. (1993). *Genes Chromosom. Cancer*, **8**, 149–154.
- Dhordain P, Albagli O, Ansieau S, Koken MHK, Deweindt C, Quief S, Lantoine D, Leutz A, Kerckaert JP and Leprince D. (1995). *Oncogene*, **11**, 2689–2697.
- Flenghi L, Ye BH, Fizzoti M, Bigerna B, Cattoretti G, Venturi S, Pacini R, Pileri S, Lo Coco F, Pescarmona E, Pelicci P-G, Dalla-Favera R and Falini B. (1995). *Am. J. Pathol.*, **147**, 405–411.
- Foley J, Ley CA and Parysek LM. (1994). *Genomics*, **22**, 456–461.
- Fukuda T, Miki T, Yoshida T, Hatano M, Ohashi K, Hirosawa S and Tokuhisa T. (1995). *Oncogene*, **11**, 1657–1663.
- Galiègue-Zouitina S, Quief S, Hildebrandt MP, Denis C, Lecocq G, Collyn-d'Hooghe M, Bastard C, Yuille M, Dyer JS and Kerckaert JP. (1996). *Leukemia*, **10**, 579–587.
- Galson DL, Tan CC, Rateliff PJ and Bunn HR. (1993). *Blood*, **82**, 3321–3326.
- Gwynn B, Lyford KA and Birkenmeier EH. (1990). *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 5244–5256.
- Hajra A, Martin-Gallardo A, Tarlé SA, Freedman M, Wilson-Gunn S, Bernards A and Collins FS. (1994). *Genomics*, **21**, 649–652.
- Kawamata N, Miki T, Ohashi K, Suzuki K, Fukuda T, Hirosawa S and Aoki N. (1994). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 366–374.
- Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H, Quief S, Lecocq G and Bastard C. (1993). *Nature Genet.*, **5**, 66–70.
- Lin B, Nasir J, Kalchan MA, McDonald H, Zeisler J, Goldberg PY and Hayden MR. (1995). *Genomics*, **25**, 707–715.
- Lo Coco F, Ye BH, Lista F, Corradini P, Offit K, Knowles DM, Chaganti RSK and Dalla-Favera R. (1994). *Blood*, **83**, 1757–1759.
- McKenzie ANJ, Li X, Largaespada DA, Sato A, Kaneda A, Zurawski SM, Doyle EL, Miltavich A, Francke U, Copeland NG, Jenkins NA and Zurawski G. (1993). *J. Immunol.*, **150**, 5436–5444.
- Migliazza A, Martinotti S, Chen W, Fusco C, Ye BH, Knowles DM, Offit K, Chaganti RSK and Dalla-Favera R. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 12520–12524.
- Miki T, Kawamata N, Hirosawa S and Aoki N. (1994). *Blood*, **83**, 26–32.
- Nakamura Y, Miki T, Kawamata N, Hirosawa S, Saito K, Enokihara H, Furusawa S and Shishido H. (1995). *Brit. J. Haematol.*, **90**, 404–408.
- Nakamura Y, Miki T, Miura I, Hashimoto K, Miura A, Akimoto K, Hirosawa S, Saito K, Enokihara H, Furusawa S and Shishido H. (1996). *Leukemia*, **10**, 658–661.
- Ohashi K, Miki T, Hirosawa S and Aoki N. (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 461–467.
- Onizuka T, Moriyama M, Yamochi T, Kuroda T, Kazama A, Kanazawa N, Sato K, Kato T, Ota H and Mori S. (1995). *Blood*, **86**, 28–37.
- Otsuki T, Yano T, Clark HM, Bastard C, Kerckaert JP, Jaffe SE and Raffeld M. (1995). *Blood*, **85**, 2877–2884.
- Rabbitts TH. (1994). *Nature*, **372**, 143–149.
- Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RSK and Dalla-Favera R. (1993a). *Science*, **262**, 747–750.
- Ye BH, Rao PH, Chaganti RSK and Dalla-Favera R. (1993b). *Cancer Res.*, **53**, 2732–2735.
- Ye BH, Chaganti S, Chang CC, Niu H, Corradini P, Chaganti RSK and Dalla-Favera R. (1995). *EMBO J.*, **14**, 6209–6217.
- Yu BW, Ichinose I, Bonham MA and Zajac-Kaye M. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 19586–19592.
- Zajac-Kaye M, Gelmann EP and Levens D. (1988). *Science*, **240**, 1776–1779.



