

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE

50 376  
1999  
419

N° d'ordre : 2642

**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

*Emmanuelle DALLERY-PRUDHOMME*

**CLONAGE ET CARACTERISATION DU GENE *RHOH/TTF*, IMPLIQUE DANS DES  
TRANSLOCATIONS CHROMOSOMIQUES RECURRENTES DANS LES  
LYMPHOMES NON-HODGKINIENS.  
ETUDE PRELIMINAIRE DE LA PROTEINE RHOH, UNE PROTEINE FIXANT LE  
GTP.**

Soutenue le 15 décembre 1999 devant la Commission d'Examen :

Président :	Professeur J.P. BOHIN
Rapporteurs :	Docteur P. CHARDIN Docteur M.J. PEBUSQUE
Examineur :	Docteur P. CHAVRIER
Directeur de thèse :	Docteur S. ZOUITINA-GALIEGUE

Les protéines Rho représentent une famille de petites GTPases comprenant 14 membres. De par leur rôle dans la réorganisation du cytosquelette, la régulation de l'expression des gènes et la prolifération cellulaire, ces protéines sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires et dans la transformation.

Le gène *RhoH*, qui code une protéine de la famille Rho, a été cloné dans notre laboratoire dans une lignée cellulaire issue d'un lymphome non-Hodgkinien (LNH) et présentant une translocation chromosomique, t(3;4)(q27;p11-13). Notre étude a montré que le locus *RhoH*, étendu sur plus de 40 kb, comporte 3 exons et est localisé en 4p13. Son expression est spécifique des tissus et des cellules hématopoïétiques.

Nous avons également mis en évidence que le gène *RhoH* se trouve impliqué dans des anomalies chromosomiques récurrentes de la région 4p13, retrouvées dans certains cas de LNH folliculaires [t(3;4)] et dans un cas de myélome multiple [t(4;14)]. Des analyses moléculaires chez les patients tendent à suggérer que la translocation (3;4)(q27;p13), qui fusionne ce gène *RhoH* au gène *LAZ3/BCL6*, peut avoir pour conséquence une dérégulation de ces 2 gènes par échange de promoteurs. En effet, dans certains cas, nous observons la présence des 2 transcrits de fusion réciproques *RhoH-LAZ3* et *LAZ3-RhoH*. Ceci suggère un rôle possible de *RhoH* dans ce type de lymphome.

La localisation subcellulaire de la protéine RhoH a été déterminée dans différents types cellulaires, et afin d'étudier les fonctions biochimiques et biologiques de cette protéine, la production de protéines RhoH recombinantes et d'un anticorps spécifique a été entreprise.

Ce travail ouvre la voie sur l'étude de l'unique membre de la famille Rho dont le gène est impliqué dans une hémopathie maligne.

**MOTS CLES :** Translocation chromosomique, Lymphome non-Hodgkinien, Protéines Rho.

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE

N° d'ordre : 2642

**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

*Emmanuelle DALLERY-PRUDHOMME*

**CLONAGE ET CARACTERISATION DU GENE *RHOH/TTF*, IMPLIQUE DANS DES  
TRANSLOCATIONS CHROMOSOMIQUES RECURRENTES  
DANS LES LYMPHOMES NON-HODGKINIENS.  
ETUDE PRELIMINAIRE DE LA PROTEINE RHOH, UNE PROTEINE FIXANT LE  
GTP.**

Soutenue le 15 décembre 1999 devant la Commission d'Examen :

Président :	Professeur J.P. BOHIN
Rapporteurs :	Docteur P. CHARDIN Docteur M.J. PEBUSQUE
Examineur :	Docteur P. CHAVRIER
Directeur de thèse :	Docteur S. ZOUITINA-GALIEGUE

*A mes parents,  
A Georges,  
A Emma et Charles,  
A ma famille,  
en témoignage de mon affection.*

*Que Monsieur le Professeur J.P. Bohin, Messieurs et Madame les Docteurs P. Chardin, M.J. Pébusque et P. Chavier soient assurés de ma profonde reconnaissance pour avoir accepté de juger les travaux présentés dans ce mémoire.*

*Je remercie Sylvie Zouitina de m'avoir dirigée tout en encourageant mes initiatives. Je la remercie de sa confiance et de m'avoir soutenue tout au long de ce travail.*

*Je remercie également Monsieur J.P. Kerckaert de m'avoir accueillie dans son groupe et d'avoir encouragé la réalisation de ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent également à Madame M.H. Loucheux pour m'avoir accueillie au sein de son unité.*

*Je souhaite exprimer mes plus vifs remerciements à Rodolphe Vereecque pour ses aides techniques mais surtout pour les nombreuses discussions, souvent scientifiques, parfois pratiques et généralement « colériques ». Ses conseils ont beaucoup contribué à l'avancement de cette étude.*

*Je tiens également à remercier Marie-Paule Hildebrand pour sa bonne humeur, son soutien moral. Ce mémoire est pour moi l'occasion de la remercier, ainsi que Claude Denis et Christophe Roumier, pour leur aide.*

*Un grand merci à ma P'tite Sœur à qui je dois presque tout.*

*Merci à Maud Collyn pour sa disponibilité, sa générosité et sa bonne humeur.*

*Merci également à Marie-Christine Copin pour sa patience et son enthousiasme, à Marie-Claire Duvieuxbourg pour les travaux de photographie qu'elle a effectuée avec gentillesse et patience.*

*Je remercie également India Leclercq, Franck Mortreux, Marie-Hélène Cordonnier, Malika Hamdane et les autres, pour les moments de détente partagés lors des pauses café, ainsi que tout le personnel de l'U524 et de l'IRCL pour leur accueil.*

## SOMMAIRE

<b>INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX</b>	9
<b>LEXIQUE</b>	11
<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>GENERALITES</b>	18
<b>A. LES PROTEINES RHO</b>	19
<b>I. Présentation</b>	19
<b>I.1 La super-famille Ras</b>	19
<i>I.1.a Comparaison des séquences des protéines Ras</i>	19
<i>I.1.b Arbre phylogénétique</i>	22
<b>I.2 La famille Rho</b>	22
<i>I.2.a Mise en évidence des membres de la famille Rho</i>	23
<i>I.2.b Régulation de l'activité des protéines Rho</i>	23
<b>I.3 Outils et méthodes d'étude des protéines Rho</b>	26
<i>I.3.a L'exoenzyme C3</i>	26
<i>I.3.b La microinjection de protéines recombinantes de type sauvage ou mutées</i>	26
<i>I.3.c La transfection de vecteurs d'expression codant des protéines de type sauvage ou mutées</i>	27
<b>II. Rôle des protéines Rho dans l'organisation du cytosquelette d'actine</b>	29
<b>II.1 Implication des protéines Rho dans l'organisation du cytosquelette des fibroblastes et des cellules épithéliales</b>	29
<i>II.1.a Les observations</i>	29
<i>II.1.b Mécanisme de régulation de l'organisation du cytosquelette par les protéines Rho</i>	32
<b>II.2 Implication des protéines Rho dans l'organisation du cytosquelette dans les cellules hématopoïétiques</b>	36
<i>II.2.a Migration et activation des leucocytes</i>	37
<i>II.2.b Implication des protéines Rho dans la phagocytose</i>	40
<b>B. LES PROTEINES RHO ET LA TRANSFORMATION CELLULAIRE</b>	42
<b>I. Implication indirecte des protéines Rho dans la transformation cellulaire</b>	42
<b>I.1 Implication des protéines Rho dans la régulation de l'expression des gènes</b>	42
<i>I.1.a Les observations</i>	43
<i>I.1.b Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes par les protéines Rho</i>	45
<b>I.2 Implication des protéines Rho dans la régulation de la prolifération cellulaire</b>	46
<i>I.2.a Les observations</i>	46
<i>I.2.b Le mécanisme de régulation de la prolifération cellulaire par les protéines Rho</i>	47
<b>II. Implication directe des protéines Rho dans la transformation cellulaire</b>	47
<b>II.1 Les propriétés transformantes des protéines Rho</b>	47
<i>II.1.a La transformation cellulaire par les protéines Rho</i>	47
<i>II.1.b Implication des protéines Rho dans la transformation par Ras</i>	48
<i>II.1.c Implication des oncoprotéines Dbl dans la transformation par Rho</i>	51
<b>II.2 Implication des protéines Rho dans l'invasion et la formation des métastases</b>	53

<b>C. LES TRANSLOCATIONS CHROMOSOMIQUES</b>	56
<b>I. Les translocations impliquant les séquences régulatrices des gènes d'Ig ou de TCR</b>	57
<b>I.1 Le gène <i>MYC</i></b>	57
<b>I.2 Le gène <i>BCL2</i></b>	59
<b>I.3 Le gène <i>BCL1/PRAD1</i></b>	59
<b>I.4 Les gènes <i>TAL1, 2 et LYL1</i></b>	60
<b>I.5 Le gène <i>HOX11</i></b>	60
<b>II. Les translocations générant la fusion de gènes</b>	61
<b>II.1 Les fusions de gènes provoquant la formation de protéine de fusion</b>	61
<b>II.1.a Les gènes <i>BCR</i> et <i>ABL</i></b>	61
<b>II.1.b Le gène <i>MLL</i> et ses partenaires</b>	64
<b>II.1.c Les gènes <i>RAR<math>\alpha</math></i>, <i>PML</i> et <i>PLZF</i></b>	65
<b>II.2 Les fusions de gènes ne provoquant pas la formation d'une protéine de fusion</b>	67
<b>OBJECTIFS</b>	70
<b>RESULTATS</b>	74
<b>A. LE GENE <i>TTF</i></b>	75
<b>I. Caractérisation de <i>TTF</i>, une nouvelle unité transcriptionnelle en 4p11-13</b>	75
<b>I.1 Isolement des transcrits <i>TTF</i></b>	75
<b>I.2 Le gène <i>TTF</i> code une protéine homologue aux protéines Ras</b>	77
<b>I.3 <i>TTF</i> appartient à la famille Rho</b>	78
<b>I.4 <i>TTF</i> forme un nouveau groupe à l'intérieur de la famille Rho</b>	80
<b>I.5 Expression spécifique de tissu de <i>TTF</i></b>	82
<b>II. Etude structurale du gène <i>TTF</i></b>	86
<b>II.1 Localisation chromosomique du gène <i>RhoH</i></b>	86
<b>II.2 Caractérisation complète du locus <i>RhoH</i> et de la translocation :clonage de la région 4p13 germinale et de la jonction 4p13-3q27 du der 4</b>	87
<b>II.2.a Sondes génomiques</b>	87
<b>II.2.b Sonde exonique</b>	89
<b>II.3 Organisation génomique de <i>RhoH</i></b>	92
<b>B. RECURRENCE DES ANOMALIES EN 4p13 IMPLIQUANT LE GENE <i>RHOH</i> DANS LE LNH ET LE MYELOME MULTIPLE</b>	98
<b>I. Etude de la récurrence des anomalies en 4p13 par la technique FISH</b>	98
<b>I.1. Réalisation de la technique FISH sur les patients présentant une t(3;4)(q27;p13)</b>	98
<b>I.2. Réalisation de la technique FISH sur les patients présentant une t(4;14)(p13;q32)</b>	99
<b>II. Etude de la fusion des gènes <i>RhoH</i> et <i>LAZ3</i> par Northern Blot et RT-PCR</b>	99
<b>C. LA PROTEINE RhoH</b>	104
<b>I. Localisation subcellulaire</b>	104
<b>II. Production de la protéine RhoH</b>	105
<b>III. Production d'un anticorps spécifique de la protéine RhoH</b>	110
<b>III.1. Le choix du peptide</b>	110
<b>III.2 Analyse de la production d'anticorps</b>	111

<b>DISCUSSION</b>	113
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	124
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	127
<b>A. MATERIELS</b>	128
<b>I. Les cellules eucaryotes</b>	128
<b>II. Les échantillons de patients</b>	128
<b>III. Les bactéries</b>	129
<b>IV. Les banques</b>	129
<b>V. Les vecteurs</b>	131
<b>VI. Les anticorps</b>	133
<b>B. METHODES</b>	133
<b>I. Techniques d'analyse et de purification de l'ADN plasmidique</b>	133
<b>I.1 Electrophorèse en gel d'agarose</b>	133
<b>I.2 Southern Blot</b>	134
<i>I.2.a Transfert</i>	134
<i>I.2.b Marquage des sondes</i>	134
<i>I.2.c Hybridation</i>	134
<b>I.3 Clonage des fragments d'ADN</b>	135
<b>I.3.1 Purification et ligation des fragments d'ADN</b>	135
<i>I.3.1.a Préparation des fragments à cloner</i>	135
<i>I.3.1.b Préparation du vecteur</i>	135
<i>I.3.1.c Ligation</i>	136
<b>I.3.2 Transformation bactérienne</b>	136
<b>I.3.3 Identification des clones recombinants</b>	136
<b>I.4 Séquençage nucléotidique</b>	137
<b>I.5 Les réactions de polymérisation en chaîne</b>	137
<i>I.5.a PCR « classique »</i>	137
<i>I.5.b Long-distance PCR</i>	138
<b>II. Techniques d'analyse et de purification de l'ADN de phages</b>	138
<b>II.1 Criblage des banques d'ADN</b>	138
<b>II.2 Analyse des clones</b>	140
<i>II.2.a Purification de l'ADN des phages</i>	140
<i>II.2b c Cartes de restriction</i>	140
<b>III. Technique d'hybridation <i>in situ</i> par sondes fluorescentes ou FISH</b>	141
<b>III.1 Préparation des sondes</b>	141
<b>III.2 Préparation des lames</b>	142
<b>IV. Techniques de purification et d'analyse des ARN cellulaires totaux</b>	142
<b>IV.1.Extraction des ARN Totaux</b>	142
<b>IV.2 Northern Blot</b>	143
<b>IV.3. Les réactions de RT-PCR</b>	143
<b>V Expression des protéines RhoH dans les cellules d'insectes SF9</b>	144
<b>V.1 Obtention des virus recombinants</b>	146
<b>V.2 Purification des protéines K-VSVG-RhoH (-Wt, -N18 ou-L62)</b>	146
<b>VI Techniques immunologiques</b>	147
<b>VI.1 Production d'un anticorps spécifique de RhoH</b>	147
<b>VI.2 Réactions d'immunofluorescence indirecte</b>	147

<b>VI.3 Technique de Western</b>	148
<i>VI.2.a Electrophorèse de protéines en gel dénaturant</i>	148
<i>VI.2.b Transfert et révélation des protéines par réactions immunologiques</i>	149

<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	150
----------------------	-----

**ANNEXE I**

**ANNEXE II**

## INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

### GENERALITES

<b>Figure G1</b> : Représentation schématique des différents domaines dans les protéines Ras.	21
<b>Figure G2</b> : Représentation schématique du cycle de régulation des protéines Rho.	24
<b>Figure G3</b> : Représentation schématique de la cascade des protéines Rho et Ras impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine.	30
<b>Figure G4</b> : Représentation schématique d'un mécanisme de régulation de l'organisation du cytosquelette par les protéines Rho.	34
<b>Figure G5</b> : Représentation schématique de la migration des leucocytes à travers la paroi des vaisseaux.	37
<b>Figure G6</b> : Représentation schématique de l'implication des protéines Rho dans la régulation des cascades de kinases.	44
<b>Figure G7</b> : Représentation schématique des conséquences de la sur-expression de MYC suite à la translocation t(8;14) sur l'activité transcriptionnelle de la protéine MAX.	58
<b>Figure G8</b> : Représentation schématique des protéines BCR, ABL et BCR/ABL.	62
<b>Figure G9</b> : Représentation schématique des protéines RAR $\alpha$ , PML et des protéines de fusion PML/RAR $\alpha$ et RAR $\alpha$ /PML.	66
<b>Figure G10</b> : Représentation schématique des protéines RAR $\alpha$ , PLZF et des protéines de fusion PLZF/RAR $\alpha$ et RAR $\alpha$ /PLZF.	68
<b>Tableau G1</b> : Mutations dans les protéines Ras et Rho.	28
<b>Tableau G2</b> : Les facteurs d'échange des protéines Rho.	52

### OBJECTIFS

<b>Figure O1</b> : Mise en évidence d'une unité transcriptionnelle en 4p11-13.	72
--	----

### RESULTATS

<b>Figure R1</b> : Séquences nucléotidique et protéique du clone d'ADNc Ka.	76
<b>Figure R2</b> : Schéma de l'alignement des clones d'ADNc <i>TTF</i> .	77
<b>Figure R3</b> : Séquence en acides aminés de la protéine TTF.	79
<b>Figure R4</b> : Alignement des séquences protéiques de Ras et des membres de la famille Rho d'eucaryotes supérieurs.	81
<b>Figure R5</b> : Arbre phylogénétique des protéines Rho.	83
<b>Figure R6</b> : Expression du gène <i>TTF</i> .	84
<b>Figure R7</b> : Localisation chromosomique du gène <i>RhoH</i> par la technique FISH.	88
<b>Figure R8</b> : Clonage du gène <i>RhoH</i> .	90
<b>Figure R9</b> : Point de cassure de la translocation t(3;4)(q27;p13).	91
<b>Figure R10</b> : Organisation génomique partielle du gène <i>RhoH</i> .	95
<b>Figure R11</b> : Séquences des jonctions exon-intron du gène <i>RhoH</i> .	97
<b>Figure R12</b> : FISH sur métaphase des patients présentant une t(3;4) et une t(4;14)	100
<b>Figure R13</b> : Analyse par RT-PCR de la t(3;4).	102
<b>Figure R14</b> : Analyse par <i>Northern Blot</i> de la t(3;4).	103
<b>Figure R15</b> : Localisation subcellulaire de la protéine VSVG-RhoH dans les cellules	

épithéliales BHK.	106
<b>Figure R16</b> : Localisation subcellulaire de la protéine VSVG-RhoH dans les cellules RBL-2H3	107
<b>Figure R17</b> : Expression de protéines recombinantes dans les cellules d'insectes SF9.	109
<b>Figure R18</b> : Analyse de la production d'anticorps	112
<b>Tableau R1</b> : Récapitulatif de l'expression de TTF dans des lignées cellulaires testées au laboratoire	85
<b>Tableau R2</b> : Organisation génomique du gène <i>RhoH</i>	94

## MATERIELS ET METHODES

<b>Figure M1</b> : Représentation schématiques des vecteurs de clonage	132
<b>Tableau M1</b> : Caractéristiques cliniques et cytogénétiques des patients 1 à 5.	131
<b>Tableau M2</b> : Amorces utilisées pour l'analyse des transcrits de fusion chez les patients.	145

## LEXIQUE

### *Unités*

$\mu\text{F}$ :	microfarade
$\mu\text{g}$ :	microgramme
$\mu\text{l}$ :	microlitre
$\mu\text{m}$ :	micromètre
Ci :	curie
g :	accélération de la pesanteur
g/l :	gramme par litre
h :	heure
kb :	kilobase
kDa :	kilodalton
M :	mole par litre
mA :	milliampère
min :	minute
ml :	millilitre
mM :	millimole par litre
ng :	nanogramme
nm :	nanomètre
p/v :	poids/volume
pb :	paire de bases
V :	Volt
v/v :	volume/volume

### *Réactifs*

BrEt :	Bromure d’Ethidium
CsCl :	Chlorure de Césium
DEPC :	Diéthyl pyrocarbonate
DMSO :	Dimethylsulfoxyde
DTT :	Dithiothréitol
EDTA :	Acide éthylène-dinitro-tétra acétique

EGTA :	Ethylene Glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl Ether)
IPTG :	Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside
LB :	milieu Luria-Bertani
MOPS :	Acide 3-[N-morpholino] propane-sulfonique
PMSF :	fluorure de phénylméthylsulfonyle
SDS :	Dodécyl sulfate de sodium
TEMED :	N,N,N',N'-tétraméthyl éthylène diamine
TRIS :	Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane
X-GAL :	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D-galactopyranoside

*Autres*

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ATP :	Adénosine triphosphate
ddATP :	Didésoxyadénosine triphosphate
ddCTP :	Didésoxycytosine triphosphate
ddTTP :	Didésoxythymidine triphosphate
dNTP :	Désoxynucléotides triphosphates
GDP :	Guanosine diphosphate
GTP :	Guanosine triphosphate
Ig :	Immunoglobulines
U :	Unités enzymatiques
UV :	ultra violet

# **INTRODUCTION**

Cette étude a fait l'objet des publications et des communications suivantes :

## PUBLICATIONS

**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. *TTF*, a gene encoding a novel small G protein, fuses to the lymphoma-associated *LAZ3* gene by t(3;4) chromosomal translocation. *ONCOGENE*. (1995). 10, 2171-2178.

**Dallery E.**, Quief S, Ben Jilany K.E., Kerckaert J-P. and Hagège D. Molecular cloning and structural analysis of cDNAs that encode 3 small GTP-binding proteins from sugar beet. *C. R. ACAD. SCI. PARIS, Sciences de la vie*. (1996). 319, 91-97.

**Dallery-Prudhomme E.**, Roumier C., Denis C., Preudhomme C., Kerckaert J-P. and Galiègue-Zouitina S. Genomic structure and assignment of the *RhoH/TTF* small GTPase gene (*ARHH*) to 4p13 by in situ hybridization. *GENOMICS*. (1997). 43, 89-94.

Preudhomme C., Roumier C., Hildebrand M-P., **Dallery-Prudhomme E.**, Lantoine D., Laï J-L., Daudignon A., Adenis C., Bauters F., Fenaux P., Kerckaert J-P. and Galiègue-Zouitina S. Nonrandom 4p13 rearrangements of the *RhoH/TTF* gene, encoding a Rho-GTPase, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *ONCOGENE*. (1999). En révision.

## COMUNICATIONS

**Dallery E.**, Galiègue-Zouitina S., Tilly H., Bastard C. and Kerckaert J-P. *TTF*, le gène d'une nouvelle petite protéine G, fusionne avec le gène *LAZ3* lors de la translocation t(3;4) associée aux LNH. Forum des Jeunes Chercheurs. Reims.(1994). Communication orale.

Galiègue-Zouitina S., **Dallery E.**, Collyn-d'Hooghe M., Deweindt C., Tilly H., Bastard C. and Kerckaert J-P. The *TTF* gene encoding a novel small G protein, fuses to the lymphoma-associated *LAZ3* gene by t(3;4) chromosomal translocation. EMBL Conference. Heidelberg. (1994). Poster.

Kerckaert J-P., Quief S., Deweindt C., **Dallery E.**, Galiègue-Zouitina S., Collyn-d'Hooghe M., Tilly H., and Bastard C. Lymphoma-associated 3q27 chromosomal translocations fuse 14q32 (*JH*), 4p11 (*TTF*) or 11q23 (*TOTE*) sequences to *LAZ3* mRNA transcripts. Fifth Meeting on the Molecular Basis of cancer. Frederik (Maryland). (1994). Poster.

Bastard C., Deweindt C., Quief S., **Dallery E.**, Galiègue-Zouitina S., Collyn-d'Hooghe M., Tilly H., and Kerckaert J-P. Mechanism of *LAZ3/BCL6* deregulation in non-hodgkin's lymphoma (NHL). American Society of Hematology. Nashville. (1994). Poster.

**Dallery E.**, Galiègue-Zouitina S., Collyn-d'Hooghe M., Tilly H., Bastard C. et Kerckaert J-P. *TTF*, le gène d'une nouvelle petite protéine G, fusionne avec le gène *LAZ3* lors de la translocation t(3;4) associée aux LNH. Société Française d'Hématologie. Paris. (1995). Communication orale.

**Dallery-Prudhomme E.**, Collyn-d'Hooghe M., Denis C., Kerckaert J-P., Chavrier P. and Galiègue-Zouitina S. *TTF*, a new member of the RHO subfamily : genomic organization, hematopoietic tissues restricted transcription and function in actin-cytoskeleton organization. Congrès J. Monod. Aussois. (1996). Poster.

**Dallery-Prudhomme E.**, Collyn-d'Hooghe M., Denis C., Lantoine D., Kerckaert J-P., Chavrier P. and Galiègue-Zouitina S. *TTF*, a new member of the RHO subfamily : genomic organization, hematopoietic tissues restricted transcription and function in actin-cytoskeleton organization. Journées franco-belges. Bruxelles. (1997). Poster.

Roumier C., **Dallery-Prudhomme E.**, Preudhomme C., Laï J-L., Bateurs F., Adenis C., Kerckaert J-P. et Galiègue-Zouitina S. Analyse par FISH de translocations chromosomiques en 4p11 impliquant le gène *TTF*. Société Française d'Hématologie. Paris. (1997). Communication orale.

**Dallery-Prudhomme E.**, Roumier C., Preudhomme C., Hildebrand M-P., Denis C., Laï J-L., Fenaux P., Chavrier P., Kerckaert J-P. et Galiègue-Zouitina S. Le gène *RhoH/TTF*, situé en 4p13 et codant une Rho-like GTPase : structure, expression, implication dans les hémopathies malignes, et rôle de la protéine. CHO. Arcachon. (1997). Communication orale.

Roumier C., Preudhomme C., **Dallery-Prudhomme E.**, Hildebrand M-P., Lai J-L., Fenaux P., Kerckaert J-P. and Galiègue-Zouitina S. Non-random chromosomal rearrangement, at 4p13, of the *RhoH/TTF* gene, encoding a small GTPase restrictively expressed in hematopoietic tissues, in non-Hogkin's lymphoma and multiple myeloma. American Society of Hematology. San Diego. (1997). Communication orale.

**Dallery-Prudhomme E.**, Verecque R., Hildebrand M-P., Copin M-C., Kerckaert J-P. et Galiègue-Zouitina S. Le gène *RhoH/TTF*, réarrangé de façon récurrente dans les Lymphomes non-Hodgkiniens folliculaires : mise en évidence du pouvoir transformant de la protéine *in vitro* et *in vivo*. CHO. La Grande Motte. (1999). Communication orale.

## **GENERALITES**

## A. LES PROTEINES RHO

### I. Présentation

Les protéines Rho se caractérisent par leur capacité à fixer et à hydrolyser le GTP, elles sont donc membres de la famille des GTPases encore appelées les protéines G. Dans les cellules eucaryotes, il existe un très grand nombre de GTPases classées en 6 super-familles : Tubuline ; Sous-unité  $\alpha$  des protéines G hétérotrimériques ; Facteur d'élongation de la synthèse protéique ; Récepteur SRP (pour l'anglais : « *signal reconnaissance particle* ») ; Facteur d'ADP ribosylation ; Ras.

Il nous a paru important de faire le point sur les protéines de la super-famille Ras avec lesquelles les protéines Rho possèdent le plus haut degré d'identité (30 %).

#### I.1 La super-famille Ras

Les premiers gènes de la super-famille Ras (H-ras, K-ras, et N-ras) sont découverts dans le début des années 80 de par leur présence dans de nombreuses tumeurs chez l'homme et l'animal (Reddy *et al.*, 1982 ; voir pour revue : Bos, 1989). Le gène *Ypt* de *Saccharomyces cerevisiae* est isolé en 1983. Les auteurs montrent alors que ce gène code une protéine possédant 30 % d'identité avec les protéines Ras humaines (Gallwitz *et al.*, 1983). Ensuite, les gènes codant les protéines Rho, possédant elles aussi 30 % d'identité avec Ras et Ypt, sont découverts chez *Aplysia* puis chez l'homme (Madaule and Axel, 1985). Ces découvertes sont le point de départ de la définition de la super-famille Ras. En effet, la mise en évidence de protéines possédant un taux d'identité relativement faible avec les protéines Ras, suggère qu'il existe de nombreuses protéines apparentées. Des approches biochimiques et de génétique moléculaire permettront d'isoler ensuite de nombreux gènes codant pour des protéines de la super-famille Ras et aujourd'hui, plus de 80 séquences sont publiées.

##### *I.1.a Comparaison des séquences des protéines Ras*

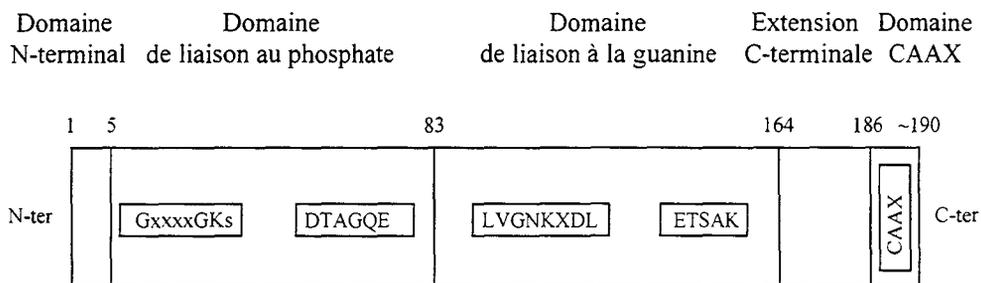
A partir de la comparaison des séquences primaires de toutes ces protéines et de la structure tridimensionnelle de H-Ras déterminée par les équipes de Milburn, Pai et

Schlichting, différents domaines sont définis (Valencia *et al.*, 1991). Un rôle pour chacun de ces domaines est également suggéré.

Ainsi, la séquence primaire de chaque protéine Ras peut être divisée en 5 parties (Valencia *et al.*, 1991) (Fig. G1):

- (i) la partie N terminale comprise entre la Méthionine en position 1 et la Lysine en position 5. Cette partie est variable en séquence et en longueur. Elle peut comporter de 4 (dans les protéines Ras, Rap1 et Cdc42) à 30 acides aminés (dans la protéine R-Ras) et pourrait être le lieu d'interaction protéine-protéine.
- (ii) le domaine le plus conservé compris entre les acides aminés 6 et 83 qui est impliqué dans la liaison au phosphate du nucléotide guanylique. On retrouve dans ce domaine le motif  $G_{10}XXXXGKS_{17}$ (ou T), rencontré dans toutes les protéines Ras et dans de nombreuses GTPases, et le motif  $D_{57}TAGQE_{62}$ . Des mutations dans ce dernier domaine modifient l'activité GTPasique intrinsèque de la protéine, ainsi que la stimulation de cette activité par les GAPs. A l'intérieur de ce domaine, est également retrouvée la région dite effectrice (résidus 32 à 40) qui a été décrite comme étant impliquée dans l'interaction des protéines Ras avec leurs effecteurs. Cette région est encadrée par les régions appelées *switch I* (résidus 30 à 37) et *switch II* (résidus 60 à 76) qui subissent des modifications conformationnelles lors de la transition GDP/GTP (Wittinghofer and Nassar, 1996).
- (iii) le domaine de liaison de la guanine qui comprend les résidus 84 à 164. A l'intérieur de ce domaine, deux motifs sont très conservés : la séquence  $L_{113}VGNKXDL_{120}$ , également retrouvée dans la majorité des GTPases, et la séquence  $E_{143}TSAK_{147}$ .
- (iv) le domaine C terminal (sans la séquence CAAX) qui est variable en séquence et en longueur. Il comprend entre 14 (dans les protéines Rho) et 47 (dans les protéines Rab) acides aminés et pourrait être le lieu d'interaction avec des protéines membranaires.
- (v) la séquence CAAX, dans laquelle le C correspond à la Cystéine, les A à des acides aminés aliphatiques et le X à d'autres résidus. Cette séquence est décrite comme étant le consensus de farnésylation ou de

géranylgéranlation, de clivage et de carboxyméthylation. Cette séquence CAAX est remplacée chez certaines protéines par la séquence CXC ou encore CC, qui sont des consensus de deux géranlygéranlations.



**Figure G1** : Représentation schématique des différents domaines dans les protéines Ras, d'après Valencia *et al.*, 1991. Les acides aminés les plus conservés sont représentés par un rectangle à l'intérieur des domaines.

### *I.1.b Arbre phylogénétique*

Au début des années 90, Valencia et collaborateurs construisent un arbre phylogénétique de la super-famille Ras en alignant les séquences des domaines les plus conservés (à l'exception des domaines C- et N- terminaux) de ces protéines. A cette époque, les auteurs proposent une super-famille divisée en 4 branches : Ras, Rho, Rab et Ran (Valencia *et al.*, 1991). Depuis, de nombreuses autres protéines ont été identifiées, et la super-famille Ras compterait 4 nouvelles familles : ARF, Rin/Rit, GEM et Rheb.

Les familles se distinguent les unes des autres par l'existence d'insertions et de délétions d'acides aminés au sein des séquences de leurs protéines. La position des acides aminés est donnée par rapport à leur numérotation dans les protéines Ras. Ainsi, les familles Ran et Rab se caractérisent par une délétion en position 95 et une insertion entre les acides aminés 41 et 42. La famille Ran présente deux autres délétions : une en position 106 et une de 2 résidus en positions 141 et 142. La famille Rho se caractérise, elle, par la délétion de l'acide aminé en position 103, une insertion d'un acide aminé entre les acides aminés 138 et 139 et une insertion de 12 acides aminés entre les positions 122 et 123. La taille de cette dernière insertion étant conservée, les auteurs suggèrent que les membres de la famille Rho seraient issus du même gène ancestral (Chardin, 1993).

### **I.2 La famille Rho**

La famille Rho constitue l'une des 3 plus grandes familles de la super-famille Ras. Ses membres possèdent 30 % d'identité avec les membres de la famille Ras (Chardin, 1993).

La famille Rho comporte à ce jour 13 membres qui sont : RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoE, RhoG, Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7, Rac1, Rac2, Rac3, Cdc42 et TC10. Deux isoformes de la protéine Cdc42 sont caractérisées, l'une dans le placenta (Cdc42P), et l'autre dans le cerveau (Cdc42B). L'alignement des séquences de ces 14 protéines permet l'élaboration d'un arbre phylogénétique et la définition de 5 sous-familles : (1) Cdc42 et TC10 ; (2) Rac1, 2 et 3 et RhoG ; (3) RhoA, B et C ; (4) Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7 et RhoE et (5) RhoD. Toutes les protéines Rho, à l'exception de Rac2 dont l'expression est restreinte aux tissus hématopoïétiques, sont retrouvées dans tous les tissus.

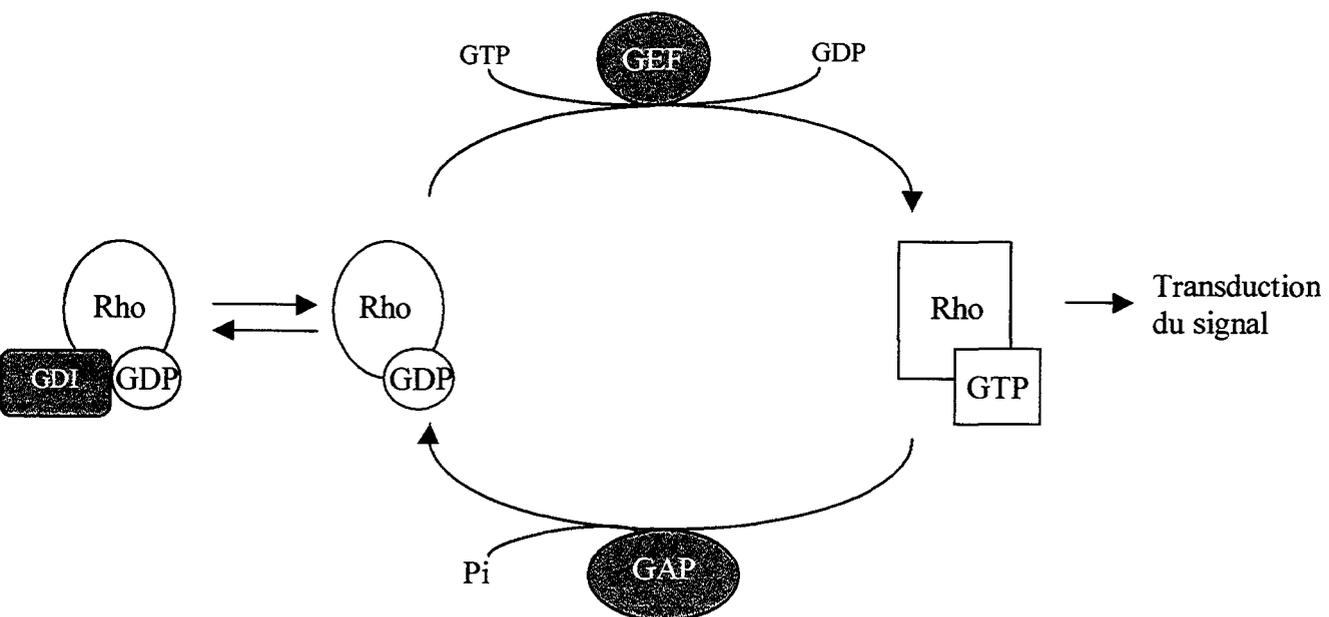
### 1.2.a Mise en évidence des membres de la famille Rho

Les gènes codant ces protéines sont isolés soit directement, soit indirectement. Dans le premier cas, les auteurs, dans le but de mettre en évidence de nouvelles protéines Rho, utilisent une approche génétique moléculaire. Certains réalisent des réactions de PCR utilisant des mélanges d'oligonucléotides dégénérés qui correspondent aux régions conservées (principalement à la séquence DTAGQE). D'autres criblent des banques d'ADNc, dans des conditions de faible stringence avec des sondes préparées à partir des séquences de protéines déjà isolées. Ces techniques permettent d'isoler les protéines RhoD, Cdc42, TC10, Rac3 (Drivas *et al.*, 1990 ; Munemitsu *et al.*, 1990 ; Chavrier *et al.*, 1992 ; Haataja *et al.*, 1997). La particularité du gène *RhoE*, récemment identifié par l'équipe de Settleman, est qu'il est isolé par criblage d'une banque d'expression en utilisant comme sonde la protéine p190RhoGAP qui est une protéine régulatrice de certaines protéines Rho (Foster *et al.*, 1996).

Certaines études aboutissent à la découverte de protéines Rho de manière fortuite. C'est le cas des gènes codant les protéines RhoB et RhoG qui sont isolés par les équipes de Hunter et de Fort, respectivement (Jähner and Hunter, 1991 ; Vincent *et al.*, 1992). Leurs études visent alors à mettre en évidence des gènes exprimés soit très précocement (RhoB ; « *Immediate early gene* ») soit très tardivement (RhoG) après stimulation cellulaire par des facteurs de croissance.

### 1.2.b Régulation de l'activité des protéines Rho

Les protéines Rho sont capables de fixer le GTP, de l'hydrolyser en GDP. Cette molécule de GDP est libérée et remplacée par une molécule de GTP. Ce cycle permet de contrôler l'activité biologique de ces protéines grâce à leur passage d'une forme active (liée au GTP) à une forme inactive (liée au GDP). Le *ratio* des 2 formes présentes dans la cellule est régulé par 3 types de protéines (Fig. G2) (voir pour revue : Ridley, 1997 ; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997). On trouve d'abord les facteurs d'échange ou GEFs (pour l'anglais : « *Guanine nucleotide Exchange Factors* ») qui permettent le remplacement du GDP par une molécule de GTP ; ensuite, les protéines activatrices de l'activité GTPasique intrinsèque des protéines Rho, ou GAPs (pour l'anglais : « *GTPase-Activating Proteins* ») ; et enfin, les inhibiteurs de l'échange du GDP par le GTP ou GDIs (pour l'anglais : « *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors* »). Ces derniers sont également capables de bloquer l'hydrolyse du GTP.



**Figure G2** : Représentation schématique du cycle de régulation des protéines Rho.

- ✓ **Les GEFs** possèdent un motif commun appelé le domaine DH (pour l'anglais : « *Dbl-Homology domain* ») qui est nécessaire et suffisant pour l'activité d'échange. Le prototype de cette famille est l'oncogène *dbl* dont l'activité sur la protéine Cdc42 est démontrée *in vitro*. Le domaine PH (pour l'anglais : « *Pleckstrin-Homology domain* »), situé à côté du domaine DH, est essentiel pour la spécificité de localisation membranaire de ces protéines. Un grand nombre de protéines DH/PH existe, la majorité d'entre elles étant oncogénique. A côté des domaines DH et PH, certains GEFs possèdent des domaines d'interaction protéine-protéine comme le domaine SH3 (pour l'anglais : « *Src-Homology 3* »), ce qui semble indiquer que ces protéines participent à des voies de signalisation. Ces facteurs d'échange sont exprimés dans tous les tissus à l'exception de la protéine Vav qui est retrouvée uniquement dans les cellules hématopoïétiques (Katzav *et al.*, 1989).
  
- ✓ **Les GAPs**. Cette famille comporte de nombreuses protéines qui présentent toutes un domaine « GAP » de 140 acides aminés. Le prototype de cette famille est la protéine p50RhoGAP qui a une activité sur les protéines Rho, Cdc42 et Rac *in vitro*. La spécificité d'action de chaque GAP est controversée, car les résultats d'études diffèrent selon qu'elles sont effectuées *in vitro* ou *in vivo*. En plus de leur fonction activatrice de l'hydrolyse du GTP par les protéines Rho, ces protéines peuvent avoir d'autres fonctions que l'on pourrait qualifier de fonctions effectrices. En effet, la microinjection du domaine GAP de certaines GAPs (de la N-chimerin par exemple) induit le même phénotype que les cellules sur-exprimant les protéines Rho. De plus, ces modifications morphologiques sont inhibées par des mutants dominants négatifs, ce qui confirme cette hypothèse.
  
- ✓ **Les GDIs**. Le premier membre de cette famille est la protéine RhoGDI qui se lie préférentiellement aux protéines RhoA-GDP et RhoB-GDP, mais est également actif sur les protéines Cdc42-GDP et Rac-GDP. RhoGDI peut également interagir avec les protéines Rho, Rac et Cdc42 sous leur forme GTP liée, ce qui provoque une inhibition de leur activité GTPasique. Ceci permet de dire que les GDIs ont la capacité de bloquer le cycle GTP/GDP à 2 niveaux : au moment de l'échange du GDP par le GTP et au niveau de l'hydrolyse du GTP. Ces protéines GDIs auraient également un rôle crucial dans la translocation des protéines Rho du cytoplasme

vers la membrane. Sous leur forme inactive, les protéines Rho seraient complexées à leur GDI et suite à l'activation cellulaire par un stimulus extracellulaire, la protéine Rho serait dirigée vers la membrane où elle se trouverait sous une forme active. Le mécanisme permettant cette translocation est encore méconnu. Parmi les GDIs identifiés, la protéine LyGDI est exprimée uniquement dans les tissus hématopoïétiques, contrairement aux autres GDIs qui n'ont pas de spécificité d'expression (Gorvel *et al.*, 1998).

### I.3 Outils et méthodes d'étude des protéines Rho

#### I.3.a L'exoenzyme C3

Des études réalisées en 1988 sur l'exoenzyme C3 de *Clostridium botulinum* par l'équipe de Chatwall permettent de montrer que le substrat de cette toxine appartient à la super-famille Ras. En effet, l'exoenzyme C3 provoque une modification de la morphologie cellulaire identique à celle induite par la microinjection de Ras, mais un anticorps spécifique de la protéine p21Ras ne reconnaît pas le substrat de cette exoenzyme C3 (Rubin *et al.*, 1988). Un an plus tard, cette même équipe démontre que cette exoenzyme fixe un groupement ADP-ribosyl sur la protéine RhoC (Chardin *et al.*, 1989), protéine identifiée en 1988 et de rôle encore inconnu. Par la suite, il est établi que RhoA et RhoB sont elles aussi des substrats de l'exoenzyme C3, et que l'ADP-ribosylation de ces protéines sur le résidu Asparagine en position 41 les rend inactives dans leur rôle biologique, mais les laisse capables de fixer et d'hydrolyser le GTP (Paterson *et al.*, 1990).

Des études effectuées sur les protéines Rho utilisent la capacité de l'exoenzyme C3 d'inactiver de manière spécifique certaines protéines de la famille Rho (Chardin *et al.*, 1989).

#### I.3.b La microinjection de protéines recombinantes de type sauvage ou mutées

Parallèlement à l'utilisation de l'exoenzyme C3, des expériences de microinjection de protéines recombinantes sont réalisées (Paterson *et al.*, 1990 ; Ridley and Hall, 1992 ; Ridley *et al.*, 1992 ; Kozma *et al.*, 1995 ; Nobes and Hall, 1995). L'avantage majeur de la microinjection est qu'elle permet de visualiser très rapidement les effets des protéines injectées.

Ces protéines sont très souvent produites à l'aide du système procaryote qui permet d'obtenir des protéines de type sauvage capables de fixer et d'hydrolyser le GTP, et d'interagir avec leurs protéines régulatrices. Les expériences de mutagenèse dirigée inspirées des travaux réalisés sur la protéine Ras, permettent de produire différents mutants aux activités modifiées. Des mutations dans le domaine de liaison au phosphate des protéines ont pour conséquence soit l'activation, soit l'inactivation constitutives de ces protéines (Tableau G1). Ainsi, le remplacement de la Glycine par une Valine en position 14 dans la protéine Rho (correspondant à la Glycine en position 12 dans Ras) réduit l'activité GTPasique de la protéine et bloque également l'hydrolyse du GTP stimulée par la protéine GAP (Garrett *et al.*, 1989). Par contre, dans la protéine Rac1 par exemple, une Asparagine en position 17 remplaçant une Sérine, permet d'obtenir une protéine inactive car incapable de fixer le GTP (Ridley *et al.*, 1992).

### *1.3.c La transfection de vecteurs d'expression codant des protéines de type sauvage ou mutées*

La transfection de vecteurs d'expression est de réalisation simple et courante pour étudier le rôle des protéines Rho. Cette technique présente un avantage non négligeable, celui de permettre une étude à long terme (Dutartre *et al.*, 1996) contrairement à la microinjection qui ne permet qu'une étude transitoire. En effet, la transfection d'un vecteur contenant un gène de résistance à un antibiotique permet d'établir des lignées exprimant de façon stable la protéine d'intérêt.

Ces différentes techniques permettent d'étudier le rôle des protéines Rho et de montrer leur implication dans un très grand nombre de fonctions cellulaires. En effet, de par leur rôle dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine et de l'expression de certains gènes, les protéines Rho touchent à la fois : la morphologie cellulaire (Rubin *et al.*, 1988 ; Chardin *et al.*, 1989 ; Paterson *et al.*, 1990 ; Nobes and Hall, 1995), la mobilité, l'adhésion (Takaishi *et al.*, 1993, 1994), l'invasion cellulaire (Verschueren *et al.*, 1997 ; Keely *et al.*, 1997), l'agrégation des plaquettes (Morii *et al.*, 1992) et des lymphocytes (Tominaga *et al.*, 1993), l'interaction cellule-cellule (Nusrat *et al.*, 1995), la contraction des muscles lisses (Hirata *et al.*, 1992), la rétraction ou l'extension des dendrites (Jalink *et al.*, 1994), l'endocytose, l'exocytose (Lamaze *et al.*, 1996 ; Komuro *et al.*, 1996), la mitose (Kishi *et al.*,

1993), la prolifération (Olson *et al.*, 1995 ; Yamamoto *et al.*, 1993), et l'apoptose (Gomez *et al.*, 1997).

Dans ce chapitre, nous allons décrire quelques unes de ces fonctions en nous intéressant tout d'abord à l'implication des protéines Rho dans l'organisation du cytosquelette cellulaire dans les fibroblastes et les cellules épithéliales, puis dans les cellules hématopoïétiques.

PROTEINE	FORME ACTIVEE			FORME DOMINANTE NEGATIVE		
	Codon	Acide aminé d'origine	Acide aminé généré	Codon	Acide aminé d'origine	Acide aminé généré
Ras	12	G (Glycine)	V(Valine)	17	S (sérine)	N (Asparagine)
	61	Q (Glutamine)	L (Leucine)			
RhoA, B, C	14	G (Glycine)	V(Valine)	19	T (Thrénine)	N (Asparagine)
	63	Q (Glutamine)	L (Leucine)			
Rac1	12	G (Glycine)	V(Valine)	17	T (Thrénine)	N (Asparagine)
	61	Q (Glutamine)	L (Leucine)			
CDC42	12	G (Glycine)	V(Valine)	17	T (Thrénine)	N (Asparagine)
	28	F (Phénylalanine)	L (Leucine)			
	61	Q (Glutamine)	L (Leucine)			
RhoG	12	G (Glycine)	V(Valine)			

**Tableau G1** : Mutations dans les protéines Ras et Rho.

## II. Rôle des protéines Rho dans l'organisation du cytosquelette d'actine

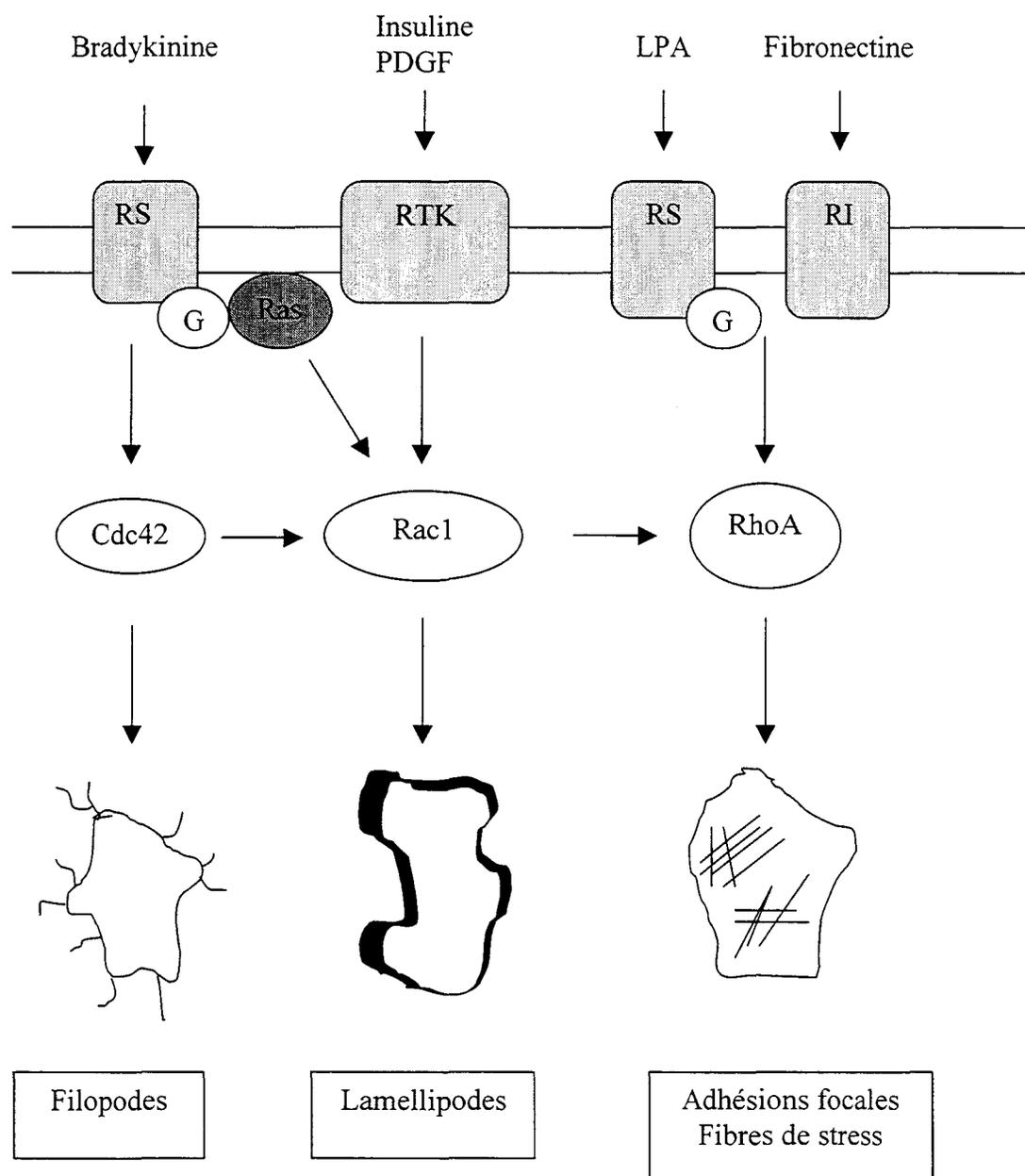
### II.1 Implication des protéines Rho dans l'organisation du cytosquelette des fibroblastes et des cellules épithéliales

Composant du cytoplasme, le cytosquelette détermine la forme de la cellule, il permet son mouvement et intervient dans de très nombreux processus cellulaires tels le phénomène de division cellulaire, la migration des vésicules de transport intracellulaire. Le cytosquelette est composé de 3 structures qui sont : les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Les filaments d'actine entrent dans la composition des filopodes, des lamellipodes et des fibres de stress induits par différents stimuli extracellulaires via les protéines Rho.

#### II.1.a Les observations

Les premiers résultats montrant que les protéines Rho sont impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine proviennent des études utilisant l'exoenzyme C3 (Chardin *et al.*, 1989). En effet, il apparaît que la toxine du *Clostridium botulinum* provoque, par ADP-ribosylation de la protéine RhoC, une modification de la morphologie cellulaire qui se traduit par la formation de dendrites dans les cellules PC12, et un arrondissement des cellules NIH3T3 (Rubin *et al.*, 1988). Par la suite, l'analyse des effets de la microinjection de mutants des protéines Rho indique que les protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 appartiennent à des voies de signalisation qui contrôlent différentes modifications du cytosquelette et différentes structures cellulaires en réponse à certains facteurs de croissance (Paterson *et al.*, 1990 ; Ridley *et al.*, 1992 ; Ridley and Hall, 1992 ; Nishiyama *et al.*, 1994 ; Nobes and Hall, 1995). De plus, il est démontré que ces protéines peuvent participer à une cascade de GTPases (Fig. G3).

Ainsi, dans les cellules Swiss3T3, la microinjection de Cdc42 activée (liée au GTP) ou la stimulation de la cellule par la bradykinine provoque la formation de filopodes (Nobes and Hall, 1995 ; Kozma *et al.*, 1995). Ces filopodes sont de petites excroissances de 10 à 25  $\mu\text{m}$  de long à la surface de la cellule et dont la structure est constituée de complexes multiprotéiques associant la vinculine et la paxilline. La formation de filopodes s'accompagne de la rétraction du corps cellulaire.



**Figure G3 :** Représentation schématique de la cascade des protéines Rho et Ras impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine, d'après Zohn *et al.*, 1998.

RS : Récepteur couplé aux protéines G ; RTK : Récepteur Tyrosine Kinase ; RI : Récepteur aux intégrines.

Secondairement, Cdc42 semble entraîner l'activation de Rac1 dans le modèle des Swiss3T3. Cette activation peut aussi être obtenue après stimulation cellulaire par le PDGF (pour l'anglais : « *Platelet Derivated Growth Factor* »), l'EGF (pour l'anglais : « *Epithelial Growth Factor* ») ou l'insuline. Rac1 activée (liée au GTP) est alors responsable de la formation de replis de la surface cellulaire (« *ruffles* » en anglais) et de lamellipodes impliqués dans le mécanisme de reptation cellulaire (Ridley *et al.*, 1992).

Enfin, Rac1-GTP est susceptible d'activer RhoA, ainsi que le ferait une stimulation cellulaire par l'acide lysophosphatidique (LPA) ou par la bombésine. RhoA-GTP induit alors la formation de plaques d'adhésion et de faisceaux de fibres de tension émanant de ces plaques (Ridley and Hall, 1992). Ces structures permettent à la cellule de s'ancrer au support (matrice extracellulaire) sur des points d'appui.

Une autre cascade de GTPases mettant en jeu la protéine Ras a également été mise en évidence dans les fibroblastes (Fig. G3). Dans ce cas, la forme oncogénique de la protéine Ras est capable d'activer Rac1 et donc RhoA indirectement (Ridley *et al.*, 1992).

Bien que cette cascade impliquant les protéines Rho soit également mise en évidence dans d'autres organismes tels que les levures (Chant and Stowers, 1995), et dans d'autres types cellulaires (Allen *et al.*, 1997), certaines études donnent des résultats contradictoires.

Ainsi, les équipes de Symons et Lim proposent que la protéine Cdc42 inhibe la formation de fibres de stress dans les cellules fibroblastiques Rat1 et Swiss3T3 (Kozma *et al.*, 1995 ; Qiu *et al.*, 1997) et sont en désaccord avec Nobes et Hall qui sont les premiers à décrire, également dans des fibroblastes, la cascade d'activation de RhoA par Rac et Cdc42 (Nobes and Hall, 1995). D'autre part, dans les cellules épithéliales MDCK, la protéine Rac1 activée ne provoque pas la formation de fibres de stress (Ridley *et al.*, 1995), alors que dans une autre lignée de cellules épithéliales, les KB, la sur-expression de cette protéine induit l'apparition de ce phénotype (Nishiyama *et al.*, 1994). Kozma et collaborateurs, quant à eux, émettent l'hypothèse qu'il existe plutôt une compétition entre les voies d'activation de Cdc42 et de RhoA (Kozma *et al.*, 1997). En effet, leur étude dans les cellules nerveuses NIE-115 montre que la sur-expression de la protéine Cdc42 ne provoque pas l'activation de RhoA, et aboutit donc à l'élongation des dendrites et non à leur rétraction.

Cdc42, Rac et Rho ne sont pas les seules protéines d'intérêt. En effet, d'autres protéines Rho jouent un rôle dans l'organisation du cytosquelette :

- la protéine RhoD est responsable de la formation de structures ressemblant à des filopodes et à une disparition des fibres de stress et des plaques d'adhérence (Murphy *et al.*, 1996). Il est intéressant de noter que ces phénomènes sont liés à la mobilité et la distribution des endosomes.
- la protéine RhoG est, elle, responsable de la formation de lamellipodes dans les fibroblastes et la protéine Rac1 est indispensable à cette activité (Roux *et al.*, 1997).
- l'activation des protéines Rnd1 et RhoE quant à elle provoque la disparition des fibres de stress (Nobes *et al.*, 1998 ; Guash *et al.*, 1998).

### *II.1.b. Mécanisme de régulation de l'organisation du cytosquelette par les protéines Rho*

De nombreuses protéines sont supposées être impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine parce que leur sur-expression induit le même phénotype que les protéines RhoA, Rac1 ou Cdc42, et/ou parce qu'elles possèdent un domaine de liaison à l'actine. Toutefois, ces données doivent être confirmées, et des études restent à être effectuées *in vivo* afin d'établir la réelle implication de tous ces candidats dans l'organisation du cytosquelette induite par les protéines Rho.

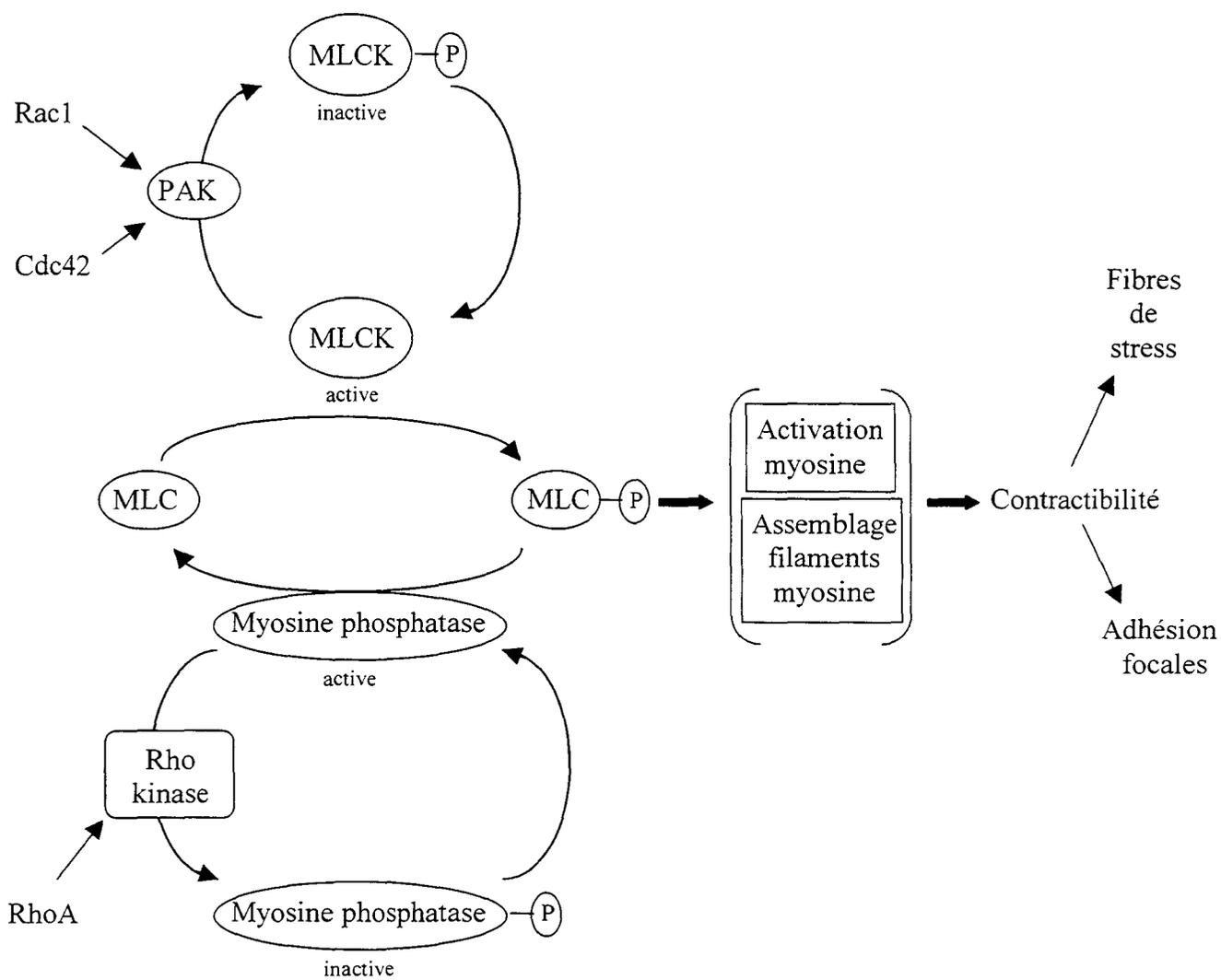
Les techniques de chromatographie d'affinité, de double-hybride et de criblage de banque d'expression permettent d'isoler des protéines interagissant directement avec les protéines Rho *in vitro*, et pour certaines d'entre elles, *in vivo*. Des études sont menées à l'aide de ces protéines sur-exprimées dans différents types cellulaires, afin d'essayer de comprendre leur rôle dans l'organisation du cytosquelette.

Les effecteurs des protéines Rho sont classés en 2 groupes : ceux qui interagissent avec Rac1 et Cdc42 uniquement (pas avec Rho), et ceux qui se lient à Rho, Rac1 et Cdc42. Pour les premiers, l'équipe de Hall définit une région minimale de 16 résidus dans leur séquence primaire, nécessaire à l'interaction et appelée domaine CRIB (pour l'anglais : « *Cdc42/Rac Interactive Binding* ») (Burbelo *et al.*, 1995).

En ce qui concerne les interactions avec les protéines Rho, 2 domaines sont définis du côté effecteur : le REM-1 et le REM-2 (pour l'anglais : « *Rho Effector Motif* » de classe I et II). Il semble que d'autres régions restent à être caractérisées puisque dans les deux types d'effecteurs, les domaines déterminés jusqu'à maintenant ne sont pas retrouvés dans tous les effecteurs mis en jeu.

A partir des données de différentes études, Burridge propose un modèle permettant de comprendre comment l'activation de Rac1 et Cdc42 dans les fibroblastes provoque l'apparition d'un phénotype « opposé » à celui induit par l'activation de RhoA (Burridge, 1999). En effet, Rac1 et Cdc42 activées permettent une élongation des structures cellulaires à la périphérie de la cellule alors que RhoA provoque une rétraction de ces structures. Le modèle de Burridge fait intervenir la protéine kinase PAK1 (p21-activated kinase 1) à domaine CRIB qui est activée par Rac1 et Cdc42 (Manser *et al.*, 1994 ; Bagrodia *et al.*, 1995), la protéine Rho kinase, effecteur de RhoA à domaine REM-2 (Leung *et al.*, 1996a ; 1996b ; Ishizaki *et al.*, 1996), la MLC kinase (MLCK pour l'anglais : « *Myosin Light Chain Kinase* ») et la sous-unité MBS de la phosphatase des chaînes légères de myosine (Kimura *et al.*, 1996). Ce modèle est basé sur le fait que l'activation des molécules de myosine par phosphorylation génère une tension sur les filaments d'actine qui s'organisent alors en fibres de stress. Cette phosphorylation est régulée par la MLCK et la myosine phosphatase dont l'activité est elle-même régulée par un système de phosphorylation/déphosphorylation. En résumé, et comme le montre la figure G4, suite à l'activation de Rac1 ou Cdc42, la protéine PAK1 phosphoryle la MLCK qui devient alors inactive ; ainsi, les chaînes légères de myosine ne sont pas phosphorylées. Par contre, l'activation de la protéine Rho kinase par RhoA provoque la phosphorylation et donc l'inactivation de la phosphatase des chaînes légères. Ce schéma se complique par le fait que la protéine Rho kinase est capable de phosphoryler directement les chaînes légères de myosine.

En ce qui concerne l'implication de la protéine PAK1 dans l'organisation du cytosquelette, les avis sont controversés. Des études montrent que l'interaction de PAK1 ou de ses homologues (h-PAK2 et m-PAK3) avec les protéines Rac1 et Cdc42 stimule leur activité kinase, ce qui entraîne une modification de l'organisation du cytosquelette (Manser *et al.*, 1994 ; Bagrodia *et al.*, 1995 ; Martin *et al.*, 1995). Alors que d'après les équipes de Hall et de Der, qui utilisent des protéines Rac1 et Cdc42 mutées dans le domaine effecteur, ces mutations provoquent une inhibition de l'interaction entre ces protéines Rho et la protéine PAK1 sans modifier leur capacité à induire la formation de filopodes et de lamellipodes (Lamarche *et al.*, 1996 ; Westwick *et al.*, 1997).



**Figure G4 :** Représentation schématique d'un mécanisme de régulation de l'organisation du cytosquelette par les protéines Rho, d'après Burridge, 1999.

D'autres protéines sont supposées être le lien entre les protéines Rho et le cytosquelette, parmi lesquelles nous pouvons citer :

- la protéine WASP spécifique des tissus hématopoïétiques et qui possède un domaine CRIB. Plusieurs points indiquent que cette protéine est un candidat potentiel. Elle est absente chez les malades atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) qui se traduit par une thrombopénie et est caractérisé par des cellules T et B dont le cytosquelette est désorganisé (Kirchhausen and Rosen, 1996). De plus, une isoforme de WASP, la protéine N-WASP exprimée dans tous les tissus, est capable de se lier directement aux filaments d'actine ainsi qu'à la profiline, protéine qui régule la polymérisation de l'actine en séquestrant ses monomères. Enfin, N-WASP est capable d'induire la formation de filopodes dans les fibroblastes (Miki *et al.*, 1998).

- la protéine IQGAP1 capable de se lier à Cdc42 et Rac1 (Kuroda *et al.*, 1996). Le fait que cette protéine ait un domaine potentiel de liaison à l'actine, qu'elle soit nécessaire à la formation des contacts intercellulaires induits par Rac1 et Cdc42 et enfin, qu'elle soit retrouvée dans les lamellipodes induits par Rac1 suggère qu'elle est un effecteur de Rac1 et Cdc42.

- la protéine POR1 (pour l'anglais : « *Partner of Rac1* ») identifiée à l'aide de la technique de double-hybride par l'équipe de Bar-Sagi en 1996 (Van Aelst *et al.*, 1996). Les auteurs pensent que cette protéine, qui ne possède pas de domaine CRIB, joue un rôle dans l'organisation du cytosquelette car (i) l'expression d'une forme mutée de Rac1(35A), qui est incapable d'interagir avec la protéine POR1, ne provoque pas la formation de lamellipodes ; (ii) la coexpression de la forme tronquée de POR1 avec la protéine Rac1 mutée en position 12 n'induit pas la formation de lamellipodes ; (iii) POR1 semble également être un effecteur de ARF6 qui a un rôle dans l'organisation du cytosquelette et le trafic des membranes intracytoplasmiques (D'Souza-Schorey *et al.*, 1997).

- la phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K) qui est un important effecteur de RhoA car elle produit du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2), second messenger qui se lie et régule l'activité de nombreuses protéines se liant elles-mêmes à l'actine (voir pour revue : Toker, 1998).

- d'autres protéines telles : la protéine kinase N (PKN ou PRK1/2) (Watanabe *et al.*, 1996), la rhopiline (Watanabe *et al.*, 1996), la rhotekine (Reid *et al.*, 1996) et la protéine citron (Madaule *et al.*, 1995) ; ROK $\alpha$  (Leung *et al.*, 1996a), POR2 (Van Aelst *et al.*, 1996), CIP4 (Aspenström, 1997) et p140Sra-1 (Kobayashi *et al.*, 1998). Toutes

ces protéines semblent elles aussi être impliquées dans la réorganisation du cytosquelette, mais leur rôle exact est encore inconnu.

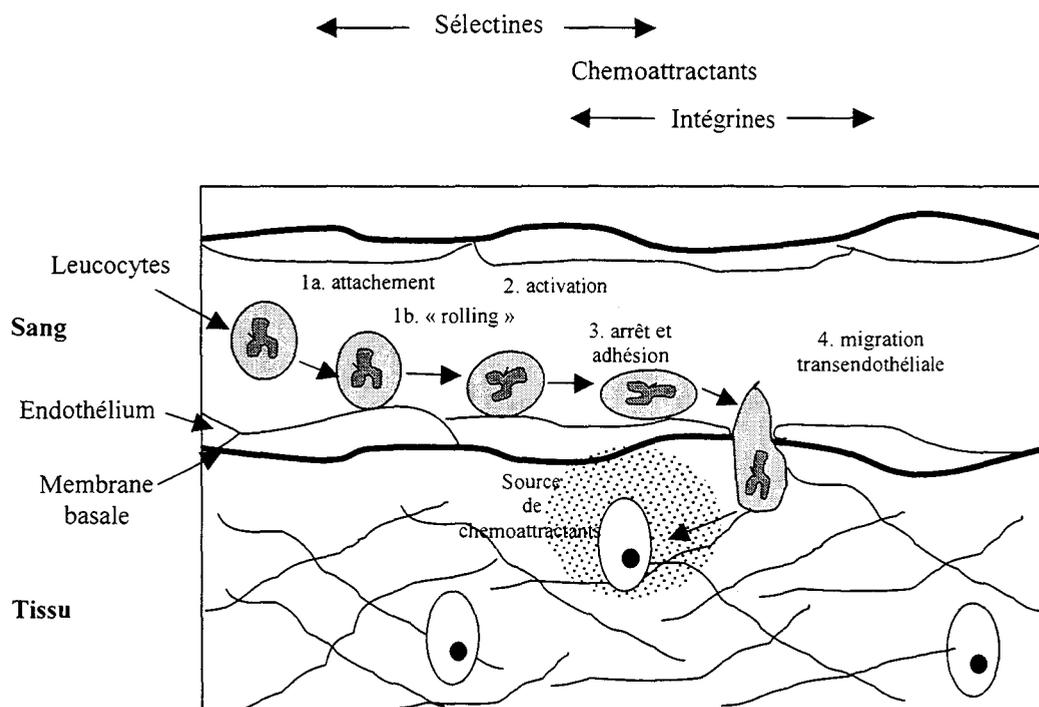
## **II.2 Implication des protéines Rho dans l'organisation du cytosquelette dans les cellules hématopoïétiques**

Les fonctions des protéines Rho sont vraisemblablement essentielles pour tous les types cellulaires et l'on peut penser que leurs rôles dans les cellules hématopoïétiques devraient être identiques à ceux mis en évidence dans les fibroblastes et les cellules épithéliales. Toutefois, certains auteurs envisagent puis démontrent la participation de ces protéines Rho à certaines fonctions spécialisées dans les cellules du système immunitaire. A côté de Rac2 impliquée dans le phénomène de phagocytose et dont l'expression est restreinte aux tissus hématopoïétiques, les protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 ont également un rôle dans la cytotoxicité à médiation cellulaire (Reid *et al.*, 1996).

La défense immunitaire de l'organisme est assurée par les leucocytes. Selon la nature de l'antigène, la réponse sera différente. On distingue la réponse humorale, qui fait intervenir la synthèse d'anticorps par les lymphocytes B, et la réponse à médiation cellulaire, qui est un processus très complexe, régulé par les lymphocytes T, les monocytes, les cellules présentatrices de l'antigène, etc.

Les leucocytes sont des cellules circulantes, qui sont activées en réponse à l'introduction d'un antigène dans l'organisme. L'activation de ces leucocytes induit une modification de leur propriété d'adhésion qui leur permet de traverser la paroi des vaisseaux sanguins et de se diriger vers le point d'infection (voir pour revue : Butcher *et al.*, 1996). Les molécules chimio-attractives produites dans l'environnement de l'infection attirent les leucocytes activés et augmentent leur affinité pour les composants de la matrice extracellulaire des cellules endothéliales. Dans un premier temps, l'adhésion est de faible intensité et fait intervenir les sélectines, puis les molécules chimio-attractives activent l'adhésion de forte intensité via des molécules d'intégrines (Springer, 1994). La figure G5 schématise ce processus.

De façon simplifiée, nous pouvons dire que selon la nature de l'antigène, son interaction avec les leucocytes est différente : soit il est présenté aux leucocytes par l'intermédiaire des cellules présentatrices de l'antigène (CPA), c'est le cas de molécules de



**Figure G5** : Représentation schématique de la migration des leucocytes à travers la paroi des vaisseaux, d'après Springer, 1994.

très petite taille ( $< 0.5\mu\text{m}$ ); soit il est phagocyté par les macrophages, c'est le cas de plus grandes particules comme les bactéries.

Comme nous allons le voir maintenant, il semble que les protéines Rho jouent un rôle dans de nombreuses étapes régulant ces différents événements, en particulier lors de la migration (Aepfelbacher *et al.*, 1994 ; Laudanna *et al.*, 1996 ; D'Souza-Schorey *et al.*, 1998), lors de l'activation (Lang *et al.*, 1992 ; Stowers *et al.*, 1995 ; voir pour revue : Penninger and Crabtree, 1999), et enfin dans la phagocytose (Cox *et al.*, 1997 ; Caron and Hall, 1998 ; Massol *et al.*, 1998).

### *II.2.a Migration et activation des leucocytes*

Les premières études soulignant l'implication d'une protéine Rho dans le phénomène d'adhésion des cellules hématopoïétiques sont réalisées par l'équipe de Narumiya en 1992 (Morii *et al.*, 1992). En effet, le traitement des plaquettes par l'exoenzyme C3 inhibe l'agrégation de ces cellules entre elles sans toutefois modifier l'expression des molécules d'intégrines à leur surface. Comme la protéine RhoA est fortement exprimée dans les plaquettes, les auteurs proposent qu'elle est impliquée dans ce phénomène. De la même façon, ils montrent que RhoA est nécessaire à l'agrégation des lymphocytes activés par le PMA (pour l'anglais : « *Phorbol Myristate Acetate* ») (Tominaga *et al.*, 1993). En effet, l'adhésion de ces cellules entre elles par l'intermédiaire des intégrines, et en particulier de la molécule LFA-1 (pour l'anglais : « *Lymphocyte Function-associated Antigen-1* ») et de l'un de ses récepteurs : ICAM-1 (pour l'anglais : « *Intercellular Adhesion Molecule-1* »), est inhibée par l'exoenzyme C3. D'après les travaux de l'équipe de Glomset en 1994, la stimulation de monocytes par le PMA provoque une augmentation de la quantité de protéines Cdc42 liée à la membrane cytoplasmique (Aepfelbacher *et al.*, 1994). Cette augmentation est corrélée avec la différenciation des monocytes en macrophages et avec l'étalement des cellules sur leur support ce qui permet de croire que la protéine Cdc42 est responsable de l'augmentation de leur adhésion. Cette hypothèse est soutenue par l'équipe de P. Chavrier qui montre que l'expression de la protéine Cdc42N17 dans des basophiles murins inhibe la formation de structures adhésives (plaques d'actine) induite par la stimulation des récepteurs du fragment Fc de certaines immunoglobulines (Guillemot *et al.*, 1997).

Outre ce rôle dans l'agrégation de cellules de même type, la protéine RhoA semble également avoir un rôle dans l'adhésion des lymphocytes T à la matrice extracellulaire par

l'intermédiaire des molécules d'intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et de leurs récepteurs, VCAM-1 (pour l'anglais : « *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* ») (Laudanna *et al.*, 1996). Cependant les résultats obtenus par l'équipe de Van Aelst contredisent cette hypothèse puisqu'ils montrent que seule la protéine Rac1 est responsable de l'adhésion des lymphocytes T à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des molécules  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 5\beta 1$  (D'Souza-Schorey *et al.*, 1998). Il est important de noter que dans tous les cas, l'augmentation de l'adhésion des cellules n'est pas due à une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, ni de leur affinité mais plutôt à leur regroupement au niveau du point de contact (Laudanna *et al.*, 1996 ; D'Souza-Schorey *et al.*, 1998).

La réorganisation du cytosquelette a également un rôle important dans l'activation des lymphocytes T (voir pour revue : Penninger and Crabtree, 1999). Leur stimulation est induite par l'interaction du récepteur des cellules T (TCR) avec l'antigène, qui est lié aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), présent sur les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Cette interaction est suivie immédiatement de la polymérisation de l'actine puis de la formation de 2 types de complexes multiprotéiques, à l'interface entre les cellules T et les CPAs, appelés Caps et SMACs (pour l'anglais : « *Supra Molecular Activation Clusters* »). Ces complexes regroupent à la fois des récepteurs d'antigène, des corécepteurs, des molécules de signalisation et d'adhésion parmi lesquelles on retrouve LFA-1 et ICAM-1. La formation de ces Caps nécessite la polymérisation de l'actine dans les lymphocytes T mais pas dans les CPAs, processus qui impliquerait les protéines Rho. En effet, l'absence dans les lymphocytes du facteur d'échange Vav, exprimé exclusivement dans les cellules hématopoïétiques, provoque l'inhibition de la formation des Caps (Holsinger *et al.*, 1998). D'autre part, l'absence de la protéine WASP, effecteur potentiel de Rac1 et Cdc42 (cf § II.2.b), provoque l'apparition du syndrome de Wiscott-Aldrich qui se caractérise par une immunodéficience. De plus, l'équipe de Chant prouve que la protéine Cdc42 est responsable de la polarisation du lymphocyte suite à son activation (Stowers *et al.*, 1995). Et enfin, la sur-expression de la forme dominante négative de Rac1 induit une déficience dans la formation des Caps (Holsinger *et al.*, 1998). Tout ceci indique que les protéines Rho et Vav sont impliquées dans l'organisation du cytosquelette des leucocytes, le rassemblement des récepteurs et la formation des Caps induite par l'interaction des lymphocytes T avec les cellules présentatrices d'antigène *via* le TCR et le CMH.

## II.2.b Implication des protéines Rho dans la phagocytose

La phagocytose est un processus par lequel les cellules (en particulier les macrophages, les basophiles et les neutrophiles) reconnaissent et englobent des particules étrangères. A la surface des macrophages, des récepteurs sont impliqués dans ce phénomène dont les FcRs qui sont les récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines (Ig), et les CR3s, récepteurs du complément. Lorsqu'une particule pénètre dans l'organisme, des molécules du complément ou d'immunoglobuline recouvrent cette particule puis activent les macrophages par l'intermédiaire de leur récepteurs respectifs. L'activation du macrophage provoque alors la réorganisation de son cytosquelette avec accumulation de filaments d'actine au niveau du point de contact entre le macrophage et la particule, puis formation de pseudopodes qui entourent la particule, tout ceci résultant en la formation du « phagosome ». La similarité entre les phénomènes de réorganisation du cytosquelette d'actine dans les macrophages et ceux observés dans les fibroblastes activés par un facteur de croissance suggère l'implication des protéines Rho dans cette polymérisation (Cox *et al.*, 1997 ; Guillemot *et al.*, 1997). L'équipe de Greenberg montre en 1997, que l'expression des formes dominantes négatives de Rac1 (Rac1N17) et de Cdc42 (Cdc42N17) dans des macrophages murins inhibe la formation des replis membranaires induits par le CSF1 (pour l'anglais : « *Colony Stimulated Factor-1* ») et le fMLP (pour l'anglais : « formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine »), par l'intermédiaire des FcRs, confirmant ainsi l'hypothèse émise (Cox *et al.*, 1997). Cependant, il existe une différence de comportement entre les protéines Rac1 et Cdc42. En effet, l'induction de la réorganisation du cytosquelette par le PMA est inhibée par la protéine Cdc42N17 mais pas par la protéine Rac1N17. Ceci suggère qu'elles ont un rôle distinct dans la phagocytose. Cette hypothèse est confirmée par les travaux de Massol et collaborateurs. En effet, l'utilisation de la microscopie électronique permet de montrer que la sur-expression de Rac1N17 dans les basophiles murins RBL-2H3 (pour l'anglais : « *Rat Basophil Leukemia cells* ») induit, via les FcRs, la formation de pseudopodes incapables de fusionner, et que la protéine Cdc42N17 inhibe la formation de ces pseudopodes (Massol *et al.*, 1998).

Caron et Hall précisent que les protéines Rho n'interviennent pas dans le mécanisme de reconnaissance de la particule par le macrophage mais bien dans la formation du phagosome. De plus, la protéine RhoA participe à l'activation des macrophages par l'intermédiaire des récepteurs du complément (CR3s). En effet, le traitement de macrophages de souris (J774) par l'exoenzyme C3 inhibe la phagocytose induite par la stimulation des CR3s (Caron and Hall, 1998).

Dans le phagosome, les particules englobées sont détruites. La NADPH (pour l'anglais : « *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* ») oxydase est un complexe multiprotéique présent dans le phagosome. Il est responsable de la production d'anions superoxydes, dans le but de détruire les particules. Ce complexe est composé d'une protéine membranaire : le cytochrome  $b_{558}$ , lui-même constitué des unités  $gp91^{phox}$  et  $p22^{phox}$ , et de protéines cytoplasmiques qui sont transloquées au niveau de la membrane suite à l'activation des neutrophiles. Les protéines  $p67^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  et  $p40^{phox}$  constituent ces protéines cytosoliques, ainsi que la protéine Rap1a appartenant à la famille des protéines Ras (Gabig *et al.*, 1995). Dans ce modèle, suite à l'activation des neutrophiles, la protéine Rac2 induirait la réorganisation du cytosquelette permettant au complexe  $p47^{phox}/p67^{phox}$  de se trouver à proximité du cytochrome  $b_{558}$ . Selon certains auteurs, la formation de ce complexe impliquerait également la protéine Rac1 (Dusi *et al.*, 1996). Rac2 serait en étroite relation avec le cytochrome  $b_{558}$  et Rac1, elle, serait liée à la protéine  $p67^{phox}$ . D'après Dorseuil et ses collaborateurs qui utilisent le système du double hybride, la protéine Rac2 est utilisée préférentiellement à Rac1 dans la composition de la NADPH oxydase (Dorseuil *et al.*, 1996).

Toutes ces données de la littérature indiquent clairement que la réorganisation du cytosquelette d'actine est très importante pour les fonctions biologiques des cellules qu'elles soient épithéliales, hématopoïétiques ou des fibroblastes. Il apparaît également que les protéines Rho jouent un rôle essentiel dans cette réorganisation du cytosquelette.

## **B. LES PROTEINES RHO ET LA TRANSFORMATION CELLULAIRE**

La formation d'une tumeur maligne est un mécanisme mettant en jeu une succession d'événements moléculaires et cellulaires qui aboutissent à une prolifération incontrôlée, puis à des modifications des propriétés d'adhérence des cellules en cours de prolifération. Les cellules cancéreuses peuvent alors envahir les tissus adjacents, être disséminées à distance du site d'origine et former des métastases.

Les protéines Rho ayant un rôle dans la régulation de l'expression des gènes et dans la prolifération, l'hypothèse d'une implication de ces protéines dans la transformation cellulaire est avancée. Nous ferons tout d'abord le point sur les études montrant une implication des protéines Rho dans la régulation de l'expression des gènes puis de la prolifération cellulaire. Nous verrons également les données décrites dans la littérature concernant le rôle transformant des protéines Rho, puis leur implication dans la deuxième phase de la transformation, c'est à dire dans l'invasion des tissus par les cellules tumorales.

### **I. Implication indirecte des protéines Rho dans la transformation cellulaire**

#### **I.1 Implication des protéines Rho dans la régulation de l'expression des gènes**

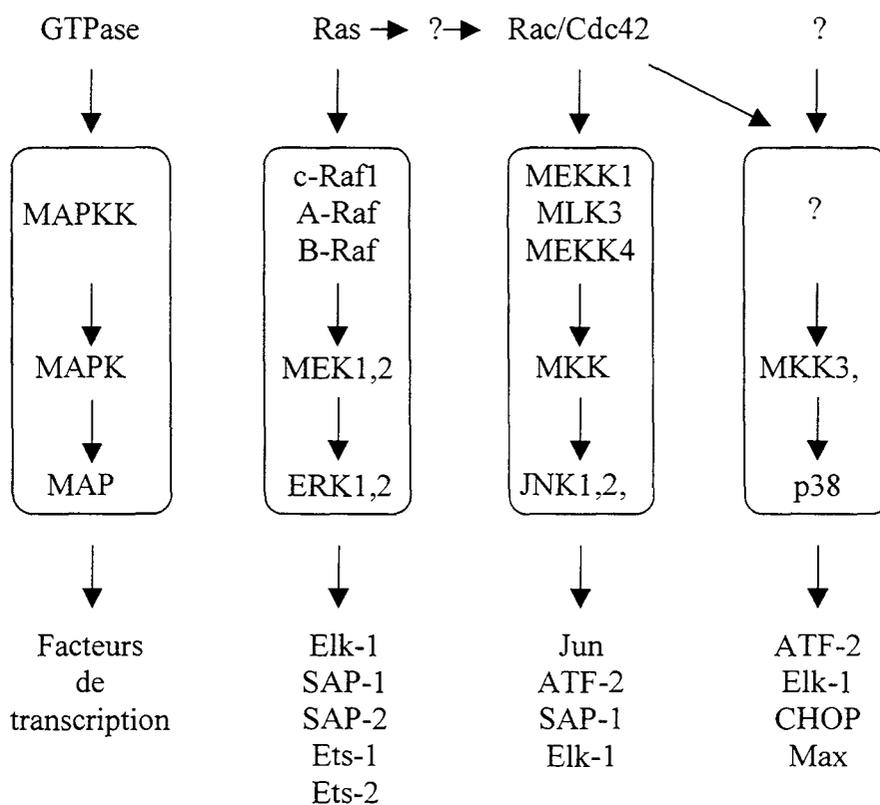
Les protéines Rho sont impliquées dans la régulation de l'expression de certains gènes, par activation de facteurs de transcription *via* l'activation de kinases (Fig. G6). Il existe trois cascades de MAPK (pour l'anglais « *Mitogen-Activated Protein Kinase* ») décrites à ce jour chez les mammifères (Treisman, 1996) : (i) la cascade des p42 et p44 ERKs pour l'anglais « *Extracellular signal Regulated Kinases* » (également appelées p42 et p44 MAPK), cette voie étant activée par les protéines de la famille Ras ; (ii) la voie des JNKs pour l'anglais « *Jun NH2-terminal Kinases* » et (iii) la cascade d'activation de la kinase p38. Il est établi que la cascade des MAPK est activée par des facteurs de croissance et que les voies des JNKs et de p38 sont, elles, activées par des agents de stress cellulaire (choc osmotique, radiation ionisante, choc thermique, etc.) et par des cytokines.

### *I.1.a Les observations*

De nombreuses études démontrent que les protéines Ras sont capables d'induire l'activation de la voie des MAPKs et que les protéines Rac1 et Cdc42 sont responsables de l'activation des cascades des JNKs et de p38 (Coso *et al.*, 1995 ; Minden *et al.*, 1995 ; Olson *et al.*, 1995 ; Bagrodia *et al.*, 1995 ; Zhang *et al.*, 1995). L'activation de ces voies se traduit par le recrutement des facteurs de transcription, ATF-2 et Jun par exemple, dans des complexes multiprotéiques au niveau des séquences AP-1 de certains promoteurs, comme le promoteur du gène *c-jun*, ce qui entraîne la transcription de ce gène (Karin, 1995) (Fig. G6). Ces observations sont obtenues par cotransfection des formes activées des protéines Ras, RhoA, Rac1 ou Cdc42 avec les kinases JNK, MAPK ou p38 dans de nombreuses cellules (HeLa, COS-1 et -7, NIH3T3, ou CHO). Des tests de « *kinase assay* » *in vitro* permettent ensuite de visualiser la phosphorylation d'un substrat et donc une augmentation de l'activité de chaque kinase. Ces mêmes études indiquent que RhoA est incapable d'induire l'activation de ces différentes kinases dans les cellules utilisées. Cependant, en 1996, Teramoto et ses collaborateurs, en utilisant des cellules épithéliales de rein humain (293T), contredisent ce résultat (Teramoto *et al.*, 1996a). En effet, dans les cellules 293T, les protéines Cdc42, RhoA, RhoB et RhoC activées, mais pas Rac1, augmentent l'activité de phosphorylation de la JNK *in vitro*.

Ceci démontre que l'activation des cascades de kinase est dépendante du contexte cellulaire. L'équipe de Fort observe également une induction de l'activation de la cascade des JNKs par la protéine RhoG dans les NIH3T3 (Roux *et al.*, 1997).

En parallèle, les protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 stimulent également le facteur de transcription SRF (pour l'anglais : « *Serum Responsive Factor* ») (Hill *et al.*, 1995 ; Whitmarsh *et al.*, 1995) (Fig. G6). Le SRF est responsable de l'activation de promoteur comprenant des éléments de réponse au sérum (SRE). Le mécanisme d'activation du SRF par la protéine RhoA est inconnu. Par contre, cette protéine semble utiliser une voie différente de celle utilisée par les protéines Rac1 et Cdc42 (Hill *et al.*, 1995). En effet, la microinjection des formes dominantes négatives de Rac1 et Cdc42 ne bloque pas l'activation du SRF par RhoA. Ceci prouve que la cascade d'activation des protéines Rho observée dans la régulation de l'organisation du cytosquelette (cf § II.1.a page) n'existe pas dans la régulation de la transcription des gènes.



**Figure G6 :** Représentation schématique de l'implication des protéines Rho dans la régulation des cascades de kinase, d'après Zohn *et al.*, 1998.

D'autres facteurs de transcription peuvent être stimulés par les protéines Rho. C'est le cas de la protéine NFκB (Perona *et al.*, 1997). Ce facteur de transcription a un mécanisme d'activation complexe. Sous sa forme inactive, il est cytoplasmique, complexé à la protéine IκB. Suite à la phosphorylation du facteur IκB par des protéines activatrices, NFκB est libéré. Ce facteur peut alors migrer vers le noyau où il ira se lier à des séquences retrouvées dans de nombreux promoteurs (voir pour revue : Baeuerle and Baltimore, 1996). En ce qui concerne l'implication des protéines Rho dans l'activation de ce facteur de transcription, les résultats divergent. En effet, pour l'équipe de Finkel, seule la protéine Rac1 est capable d'activer cette voie (Sulciner *et al.*, 1996). Par contre, d'après les travaux de Perona et de ses collaborateurs, les protéines Cdc42, Rac1, RhoA, RhoB et RhoC provoquent la phosphorylation de IκB entraînant ainsi la stimulation de NFκB (Perona *et al.*, 1997). Une autre étude vient soutenir cette hypothèse en montrant que des protéines de la famille Dbl non activatrices de Rac1 sont capables d'activer NFκB (Westwick *et al.*, 1998).

### *1.1.b Les mécanismes de régulation de l'expression des gènes par les protéines Rho*

De la même manière que pour la régulation du cytosquelette, des études sont menées afin de caractériser les effecteurs des protéines Rho impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. Les résultats décrits sont très souvent contradictoires, et il n'est pas simple de donner des conclusions définitives. Dans ce paragraphe, nous donnerons quelques exemples de travaux concernant les protéines PAK1, MLK3 et MEKK1 et 4 qui sont des effecteurs potentiels des protéines Rac1 et Cdc42. Le mécanisme de régulation de l'activation du facteur de transcription NFκB et du SRF n'est pas totalement connu à ce jour. Mais, des travaux récents de l'équipe de Lacal montrent que l'activation du SRF par RhoA est dépendante de l'activation du facteur de transcription NFκB (Montaner *et al.*, 1999).

A côté de son rôle régulateur de l'organisation du cytosquelette, certains auteurs proposent que la protéine PAK1 soit également impliquée dans la régulation de l'expression des gènes. Leurs études montrent que cette protéine activée par les protéines Rac1 et Cdc42 est, en effet, capable d'induire l'activation des JNK et de p38 (Manser *et al.*, 1994 ; Zhang *et al.*, 1995 ; Frost *et al.*, 1996), et que des mutants de Rac1 et Cdc42, incapables d'interagir avec la protéine PAK1, sont également incapables d'activer les voies de JNK (Lamarche *et*

*al.*, 1996). Cependant, d'autres équipes tentent de démontrer le contraire. En effet, en utilisant un autre mutant de la protéine Rac1, Westwick et collaborateurs montrent que la sur-expression de cette protéine, incapable elle aussi de se lier et d'activer la protéine PAK1, est responsable de l'activation des voies des JNKs (Westwick *et al.*, 1997). De plus, Teramoto et collaborateurs suggèrent que la protéine MLK3, et non PAK1, soit le lien entre Rac1/Cdc42 et les cascades de kinases (Teramoto *et al.*, 1996b). Leur hypothèse est basée sur les faits que cette protéine MLK3 interagit avec Rac1 et Cdc42 *in vivo*, et que la coexpression de MLK3 (mais pas de PAK1) avec Rac1 et Cdc42 augmente l'activation des JNKs. Cependant, ces travaux sont en désaccord avec ceux de Hall et de ses collaborateurs pour qui la protéine MLK3 ne peut être le bon candidat (Nagata *et al.*, 1998).

Des études similaires, aux résultats tout aussi contradictoires, sont menées sur MEKK1 et MEKK4 (Fanger *et al.*, 1997 ; Gerwins *et al.*, 1997 ; Takekawa *et al.*, 1997).

## **I.2 Implication des protéines Rho dans la prolifération cellulaire**

### *I.2.a Les observations*

Comme l'expression de 3 protéines Rho est régulée par des facteurs de croissance, une éventuelle implication de ces protéines dans la régulation de la prolifération cellulaire fait l'objet de nombreuses investigations. En ce qui concerne la protéine RhoB, son gène est qualifié de gène précoce (« *Immediate early gene* ») car son expression augmente très rapidement à la suite d'une stimulation cellulaire par des facteurs de croissance comme l'EGF et le PDGF, ou par des irradiations de type UV, ou encore suite à un traitement des cellules par des agents génotoxiques (Jähner and Hunter, 1991). Par contre, la protéine RhoG est exprimée très tardivement après une stimulation par des facteurs de croissance (Vincent *et al.*, 1992). L'expression de la protéine Rac2, isoforme de la protéine Rac1 et exprimée uniquement dans les cellules hématopoïétiques est, elle, stimulée par la phytohématoglutinine A (PHA) (Reibel *et al.*, 1991).

De plus, en utilisant l'exoenzyme C3 ou la sur-expression des formes mutées des protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 dans les fibroblastes Swiss3T3, les équipes de Narumiya et de Hall montrent que ces protéines sont impliquées dans la progression du cycle cellulaire et en particulier au niveau de la phase G1 (Yamamoto *et al.*, 1993 ; Olson *et al.*, 1995). Cependant,

les études de Lin et collaborateurs permettent d'observer une inhibition de la croissance des cellules NIH3T3 par Cdc42 (Lin *et al.*, 1997).

Une autre propriété corroborant l'implication des protéines Rho dans la régulation de la prolifération cellulaire, est que la sur-expression de ces protéines Rho est capable, au même titre que Ras, d'induire une transformation cellulaire.

### *1.2.b Le mécanisme de régulation de la prolifération cellulaire par les protéines Rho*

La régulation de la prolifération par les protéines Rho fait l'objet de peu d'études. Cependant, la cycline D1 semble être la cible des protéines Rho impliquées dans ce phénomène puisque les protéines Rac1 et RhoA sont capables de stimuler la transcription de ce gène (Westwick *et al.*, 1997). De plus, les protéines Rho semblent participer à la régulation de la dégradation de l'inhibiteur d'une cdk (pour l'anglais : « *cycline-dependent kinase* ») : la protéine p27<sup>Kip1</sup>, ce qui permettrait l'entrée de la cellule en phase G1 (Hirai *et al.*, 1997). Différentes cyclines et cdk sont actives à différentes étapes du cycle cellulaire, la cycline D1 semble jouer un rôle très important pour le passage de la cellule de la phase G1 à la phase S (Matsushime *et al.*, 1991).

Les études de Westwick et collaborateurs, décrites auparavant (cf § II.1.b page) indiquent que la protéine PAK1 serait responsable de la stimulation de l'expression de la cycline D1, par régulation positive de la transcription de ce gène (Westwick *et al.*, 1997). Cependant, l'équipe de Hall contredit cette hypothèse et avance que la protéine PAK1 n'est pas indispensable à la régulation de la prolifération cellulaire induite par Rac1 et Cdc42 (Lamarche *et al.*, 1996).

## **II. Implication directe des protéines Rho dans la transformation cellulaire**

### **II.1 Les propriétés transformantes des protéines Rho**

#### *II.1.a La transformation cellulaire par les protéines Rho*

La transformation cellulaire est caractérisée par l'acquisition des propriétés suivantes :

- altération de la morphologie cellulaire
- croissance accrue

- réduction de la dépendance au sérum
- perte de l'inhibition de contact
- altération de la régulation de l'expression des gènes
- possibilité de croître en milieu semi-solide
- formation de tumeurs *in vivo*.

En ce qui concerne l'étude du pouvoir transformant des protéines Rho, la mise en évidence de ces propriétés est réalisée par la sur-expression de leurs formes sauvage, activée ou dominante négative dans les fibroblastes de souris NIH3T3 et/ou Rat1.

Ainsi, la sur-expression de la forme activée de la protéine Rac1 est responsable de la transformation des cellules NIH3T3 (Qiu *et al.*, 1995a). De plus, ces cellules transformées possèdent toutes les caractéristiques décrites ci-dessus.

La sur-expression de la protéine Cdc42V12 provoque également la transformation des cellules Rat1 (Qiu *et al.*, 1997). Néanmoins, il est important de noter que les cellules transformées ne présentent que quelques caractères de transformation, comme la formation de colonies en milieu semi-solide et de tumeurs chez la souris nude ; mais elles sont incapables de croître en milieu appauvri en sérum et n'ont pas perdu leur inhibition de contact. Cependant, quelques ambiguïtés existent. En effet, selon Lin et ses collaborateurs, la protéine Cdc42L61 inhibe la croissance des cellules NIH3T3 (Lin *et al.*, 1997). Par contre, une mutation en position 28 dans la séquence primaire de Cdc42 provoque la transformation des NIH3T3 avec réduction de la dépendance au sérum et production de colonies en agar mou. La protéine Cdc42L28 se caractérise par un cycle GDP/GTP très rapide, c'est à dire un échange spontané du GDP par le GTP. Les auteurs suggèrent que cette caractéristique en association avec une forme activée est nécessaire pour la transformation « complète » des cellules NIH3T3 par Cdc42.

De façon intéressante, la délétion des résidus 120 à 139 dans la protéine Cdc42 inhibe le pouvoir transformant de cette protéine, sans modifier ses propriétés régulatrices de l'organisation du cytosquelette, et activatrices de l'expression des gènes (Wu *et al.*, 1998). Pour la première fois est ainsi décrite une fonction pour cette région, qui comprend l'insertion retrouvée uniquement dans la partie C-terminale des protéines Rho (Chardin, 1993). Cette insertion serait donc nécessaire à l'interaction de l'effecteur de Cdc42 responsable de son activité transformante (Wu *et al.*, 1998).

Les protéines RhoA et RhoB sont, elles, faiblement transformantes. La sur-expression des formes activées (V14 et L63) de la protéine RhoA dans les cellules NIH3T3 ou Rat1 est incapable d'induire la formation de foyers, ou de colonies en agar mou (Avraham and Weinberg, 1989). Seules les cellules exprimant des taux très élevés de protéine RhoAV14 mais aussi de type sauvage provoquent la formation de tumeurs chez les souris nude avec un temps de latence de 8 à 10 semaines. Ces résultats sont confirmés par les études de Perona, Prendergast et collaborateurs (Perona *et al.*, 1993 ; Prendergast *et al.*, 1995). L'équipe de Symons observe la formation de foyers par les cellules NIH3T3 exprimant la protéine RhoAV14 après un temps de latence de 5 semaines, alors que pour la protéine Rac1V12, le temps de latence n'est que d'une semaine. L'équipe de Symons considère donc que la protéine RhoA n'a pas de propriétés transformantes (Qiu *et al.*, 1995b). En résumé, seules les cellules exprimant une quantité très importante de protéines RhoAV14 peuvent acquérir des propriétés transformantes, contrairement aux cellules transformées par les protéines RasV12 ou Rac1V12 qui expriment des taux relativement faibles.

Les propriétés transformantes d'autres protéines de la famille Rho, et notamment la protéine RhoG sont également étudiées par l'équipe de Fort. La sur-expression de la protéine RhoGV12 induit la transformation partielle des cellules NIH3T3 (Roux *et al.*, 1997). En effet, cette protéine est incapable de provoquer seule la formation de foyers, par contre, les cellules exprimant la protéine RhoGV12 ont une densité de saturation supérieure à celle des cellules NIH3T3 non transfectées. De plus, la co-expression de Cdc42V12 avec RhoG montre qu'il existe une synergie entre l'action de ces protéines contrairement à la co-expression de Rac1V12 et RhoG. Rac1 et RhoG appartiennent donc à une même voie de signalisation au niveau de laquelle RhoG activerait Rac1.

### *II.1.b Implication des protéines Rho dans la transformation par Ras*

Le mécanisme de transformation des cellules par les protéines Rho est inconnu. Contrairement aux protéines Ras qui sont impliquées dans de nombreux cancers (voir pour revue : Bos, 1989), à ce jour, aucune mutation d'une protéine Rho n'est mise en évidence dans les pathologies (Moscow *et al.*, 1994) ; une seule publication très récente relate la sur-expression de quelques protéines Rho dans certaines tumeurs solides (Fritz *et al.*, 1999). L'apparition des tumeurs induites par Ras est due à des mutations au niveau des résidus 12, 13 ou 61. Les cellules NIH3T3 transformées par la forme oncogénique de la protéine Ras

présentent une modification de leur morphologie, *in vitro*, avec perte des fibres de stress, augmentation des replis membranaires et de la mobilité, suggérant une implication des protéines Rho dans la transformation par Ras (Bar-Sagi and Feramisco, 1986). Des études récentes confirment cette hypothèse. En effet, (i) la co-expression de la forme dominante négative de chaque protéine Rho avec la protéine RasV12 inhibe partiellement ou totalement la formation de foyers ; (ii) la co-expression de la forme activée de chaque protéine Rho avec un mutant activé de la protéine Raf (effecteur de Ras dans l'activation de la cascade des MAPK) montre une coopération et une synergie dans la formation de foyers ; (iii) les formes mutées de Ras en position 37 ou 40 caractérisées par leur incapacité de liaison et d'activation de la protéine Raf, sont encore capables de transformer des cellules NIH3T3 (Khosravi-Far *et al.*, 1996). Dans ce cas, le phénotype des cellules est différent de celui des cellules transformées suite à l'activation de la voie des MAPK via Raf, mais identique à celui des cellules transformées par les protéines Rac1 ou Rho. Tout ceci tend à prouver que les protéines RhoA, Rac1, Cdc42 et RhoG sont nécessaires à la transformation des fibroblastes par la protéine Ras (Khosravi-Far *et al.*, 1995 ; Prendergast *et al.*, 1995 ; Qiu *et al.*, 1995a ; 1995b ; Roux *et al.*, 1997). Un modèle dans lequel la forme oncogénique de Ras serait responsable de l'activation constitutive des protéines Rho est donc proposé ; celles-ci activeraient un spectre de fonctions qui contribuerait à l'activité transformante complète de la protéine Ras. Cependant, aucune étude ne permet de mettre en évidence la présence d'un taux anormalement élevé de protéines Rho liées au GTP dans les cellules transformées par RasV12.

Plusieurs observations permettent de penser que chaque protéine Rho contribue à un aspect différent de la transformation par Ras. Premièrement, la sur-expression de chaque protéine Rho induit un phénotype différent dans les cellules NIH3T3. Deuxièmement, la co-expression de différentes combinaisons des formes activées des protéines Rho révèle une coopération entre ces protéines dans la formation des foyers, mettant ainsi en évidence l'existence de voies de signalisation différentes (Roux *et al.*, 1997). Troisièmement, la protéine Cdc42N17 inhibe la formation des colonies en milieu semi-solide et provoque la réversion de la morphologie des cellules transformées par Ras (Qiu *et al.*, 1997). Cependant, les cellules restent capables de croître en présence d'une faible teneur en sérum. Par contre, la protéine Rac1N17 inhibe la croissance en milieu semi-solide et en présence d'un faible pourcentage de sérum, mais ne provoque pas la réversion morphologique. Ainsi, les protéines

Cdc42 et Rac1 seraient responsables, respectivement, des modifications de la morphologie et de la croissance des cellules nécessaires à leur transformation par la protéine RasV12.

Il est intéressant de noter que les protéines RhoAN19 et Cdc42N17, contrairement à la protéine Rac1N17, sont capables de bloquer la transformation induite par Raf activée. Ceci démontre que la cascade d'activation des protéines Rho, mise en évidence dans la réorganisation du cytosquelette (Cdc42<Rac1<RhoA), n'est pas impliquée dans leur pouvoir transformant.

### *II.1.c Implication des oncoprotéines Dbl dans la transformation par Rho*

*In vivo*, le potentiel transformant des protéines Rho pourrait donc être dû à leur activation par la protéine Ras oncogénique qui pourrait d'ailleurs aussi passer par l'activation d'un facteur d'échange ou GEF.

La majorité de ces protéines, apparentée à la protéine Dbl, est le produit de proto-oncogène dont la forme oncogénique correspond à la protéine tronquée de sa partie N-terminale, en amont des domaines DH et PH (voir pour revue : Cerione and Zheng, 1996). Ces domaines sont nécessaires à leur activité transformante, mais ne participent pas à l'interaction des GEFs avec les protéines Rho. Cette famille comporte à ce jour 14 protéines (voir tableau G2) dont plusieurs membres sont mis en cause dans certaines pathologies tels que : (i) la protéine Tiam1 qui est responsable des propriétés invasives des cellules lymphomateuses T (Michiels *et al.*, 1995) ; (ii) la protéine Bcr qui est le partenaire de la tyrosine kinase Abl dans la translocation t(9;22) retrouvée dans certaines leucémies (Hamdane *et al.*, 1997 ; Skorski *et al.*, 1998) ; (iii) la protéine FGD1 qui est associée au développement de la dysplasie faciogénitale (syndrome d'Aarskog-Scott) suite également à une translocation chromosomique (Pasteris *et al.*, 1994 ; Zheng *et al.*, 1996).

Il est suggéré que les protéines Dbl provoquent une transformation cellulaire par activation constitutive des protéines Rho. Différentes observations viennent confirmer cette hypothèse. Tout d'abord, la sur-expression de ces protéines induit les mêmes modifications dans l'organisation du cytosquelette et dans l'expression des gènes que celles observées lors de la sur-expression des protéines Rho. Citons en exemple la protéine Tiam1 qui induit, dans les fibroblastes, un phénotype transformé identique à celui des cellules exprimant la protéine Rac1V12 (van Leeuwen *et al.*, 1995). De plus, la protéine Rac est nécessaire à la

	DISTRIBUTION	ACTIVITE BIOLOGIQUE	FONCTION BIOCHIMIQUE
<b>Dbi</b>	Lymphocytes B, cerveau, gonades	Oncogénique	GEF pour Rho et Cdc42
<b>Ost</b>	ostéosarcome, cerveau, cœur, poumon, foie	Oncogénique	GEF pour Cdc42
<b>Tiam-1</b>	lymphocytes T, cerveau, testicules	Métastasant et Oncogénique	GEF pour RhoA et Cdc42, liaison à Rac1
<b>Ect-2</b>	kératinocytes, rein, foie, rate	Oncogénique	GEF pour Rac et Cdc42
<b>Vav</b>	cellules hématopoïétiques	Oncogénique	liaison à RhoA, B et Rac
<b>Lbc</b>	leucémie myéloïde, cœur, poumon, muscle squelettique	Oncogénique	GEF pour Ras
<b>FGD1</b>	cerveau fœtal, cœur, poumon, rein	Dysplasie faciogénitale	GEF pour Cdc42
<b>Dbp</b>	cellules myéloïdes, cerveau	Oncogénique	Non déterminé
<b>Lfc</b>	cellules myéloïdes, rein, poumon	Oncogénique	Non déterminé
<b>Tim</b>	cellules épithéliales mammaires, rein, foie, pancréas, poumon, placenta	Oncogénique	Non déterminé
<b>Bcr</b>	cerveau	Leucémie myéloïde chronique	GAP pour Rac, GEF pour protéines Rho-like
<b>Abr</b>	fibroblastes	?	GAP pour Rac et Cdc42, GEF pour protéines Rho-like
<b>Sos</b>	aucune spécificité	?	GEF pour Ras, GEF pour Rho
<b>Ras GEF</b>	cerveau	?	GEF pour Ras, GEF pour Rho

**Tableau G2** : Les facteurs d'échange des protéines Rho.

leucémogénèse induite par la protéine chimère BCR/ABL (Skorski *et al.*, 1998). Enfin, le potentiel transformant des protéines Dbl est corrélé à l'activation de la transcription du gène de la cycline D1 (Westwick *et al.*, 1998).

## **II.2 Implication des protéines Rho dans l'invasion et la formation des métastases**

Les propriétés d'adhésion des cellules cancéreuses sont particulières. En effet, à partir d'une tumeur primaire, certaines cellules sont capables de se détacher de la masse tumorale, de rejoindre la circulation sanguine, puis d'envahir un organe pour y reformer une tumeur que l'on appelle métastase.

Nous avons précédemment souligné que les protéines Rho étaient impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, en particulier dans la formation de replis membranaires. Ces replis membranaires (« *ruffling* » en anglais) représentent des mouvements rapides du contour cellulaire associés à l'étalement et à la mobilité de la cellule. De plus, les protéines Rho jouent un rôle dans la migration des lymphocytes au cours du processus de défense immunitaire. A partir de ces observations, l'implication de ces protéines dans la mobilité, l'adhésion et l'invasion des cellules cancéreuses peut être supposée.

Des études réalisées *in vitro* confirment cette hypothèse. Il apparaît que les protéines Rho ont un rôle dans l'adhésion des cellules entre elles ou avec un autre type cellulaire en relation avec la cadhérine et le HGF (pour l'anglais : « *Hepatocyte Growth Factor* »).

La E-cadhérine est une molécule d'adhésion supposée identique à une glycoprotéine transmembranaire appelée uvomoruline. Ces 2 molécules jouent un rôle dans l'adhésion des cellules épithéliales entre elles, et sont considérées comme des protéines inhibitrices de l'invasion (Vleminckx *et al.*, 1991). En effet, les cellules épithéliales MDCK traitées par des anticorps anti-uvomoruline ou transformées par l'oncogène *Ras* deviennent capables de traverser un gel de collagène. Les cellules transformées par *Ras* n'expriment plus la molécule d'uvomoruline, ce qui expliquerait les propriétés invasives de ces cellules (Behrens *et al.*, 1989).

Le HGF, encore appelé SF (pour l'anglais : « *Scatter Factor* ») est le ligand du récepteur Tyrosine kinase c-MET. Il est impliqué dans de nombreux phénomènes biologiques comme la mobilité des cellules épithéliales (Gherardi and Stoker, 1991), l'invasion (Rosen *et al.*, 1991), la vasculogénèse et l'angiogénèse des tumeurs (Bussolino *et al.*, 1992). De plus, il

stimule la migration des cellules endothéliales *in vitro*. Il est également décrit comme étant une molécule chimio-attractrice de certains lymphocytes T (Adams *et al.*, 1994) : il induit l'adhésion des cellules lymphomateuses sur la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des molécules d'intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 5\beta 1$  (Weimar *et al.*, 1997).

Les protéines Rho et Rac, de par leur rôle dans l'organisation du cytosquelette, sont nécessaires à la formation et à la stabilisation des complexes d'adhésion, contenant la E-cadhérine et situés entre les cellules épithéliales (Braga *et al.*, 1997). Les travaux de Hordijk et collaborateurs montrent que les protéines Rac1 et Tiam1 inhibent la mobilité des cellules MDCK induite par le HGF (Hordijk *et al.*, 1997). Cette inhibition de la mobilité serait due à une augmentation de l'adhésion des cellules entre elles par l'intermédiaire de la E-cadhérine. Ces résultats sont contredits par Tokman et collaborateurs pour qui l'inhibition des protéines Rho par l'exoenzyme C3, dans d'autres cellules épithéliales issues d'un carcinome de poumon, augmente l'agrégation de ces cellules entre elles, par stimulation de l'adhésion via les molécules de E-cadhérine (Tokman *et al.*, 1997). Ainsi, le rôle exact des protéines Rho dans la formation des complexes d'adhésion reste à déterminer.

D'autres études viennent confirmer l'hypothèse de l'équipe de Tokman. Il apparaît en effet, que l'exoenzyme C3 inhibe (i) la mobilité des cellules Swiss3T3 (Takaishi *et al.*, 1993), (ii) la mobilité des kératinocytes de souris activés par le HGF (Takaishi *et al.*, 1994), (iii) l'invasion de fibroblastes en monocouche par des cellules épithéliales (Tokman *et al.*, 1997 ; Yoshioka *et al.*, 1998) et enfin (iv) la mobilité de cellules lymphomateuses (Verschueren *et al.*, 1997). Bien que l'exoenzyme C3 modifie les propriétés de ces cellules, la sur-expression de la protéine RhoA activée est incapable d'induire ce phénomène ; la protéine RhoA est donc nécessaire mais insuffisante à elle seule pour permettre la mobilité des cellules (Takaishi *et al.*, 1994 ; Stam *et al.*, 1998). De plus, l'activation des protéines Rac1 et Cdc42, dans des cellules épithéliales issues d'un carcinome du sein, induit la mobilité et l'invasion de ces cellules indépendamment de la protéine RhoA. L'activation de la kinase PI3K semble par contre essentielle à la mobilité de ces cellules (Keely *et al.*, 1997).

L'équipe de Collard démontre que la protéine RhoA agit en synergie avec les protéines Cdc42, Rac1 et Tiam1 dans le phénomène d'invasion par des cellules lymphomateuses (Habets *et al.*, 1994 ; Michiels *et al.*, 1995 ; Stam *et al.*, 1998). Dans ce cas, l'invasion des cellules est dirigée par les protéines Rac1 et Cdc42 mais est dépendante de la stimulation des récepteurs des lysophospholipides (LPA et SIP) qui activent RhoA et la phospholipase C. Le rôle de la phospholipase C dans le contrôle de la mobilité cellulaire est encore inconnu. De même, la réelle implication de la protéine RhoA reste à déterminer.

La sur-expression, *in vivo*, de la protéine Rho d'*Aplysia Californica* dans les fibroblastes NIH3T3 est capable de provoquer toutes les étapes nécessaires à la formation de métastases. En effet, l'injection de cellules NIH3T3 sur-exprimant la forme activée de cette protéine Rho provoque la formation d'une tumeur primaire au niveau d'un membre inférieur d'une souris *nude* puis l'apparition de métastases dans des organes dits secondaires (del Peso *et al.*, 1997).

Ainsi, l'hypothèse de la participation des protéines Rho dans la mobilité des cellules normales et cancéreuses est assez bien étayée, en particulier pour Rac1 et CDC42 ; cependant, d'autres travaux sont nécessaires afin d'expliquer le rôle exact de ces protéines dans la formation des métastases.

## C. LES TRANSLOCATIONS CHROMOSOMIQUES

Les évènements moléculaires responsables de la genèse d'une tumeur modifient soit des proto-oncogènes, soit des gènes suppresseurs de tumeur. Les proto-oncogènes altérés deviennent parfois des oncogènes qui produisent soit une quantité anormale de leur protéine soit une quantité normale d'une forme hyperactivée de cette protéine. Quand les produits de gènes suppresseurs de tumeur sont absents de la cellule ou ne sont pas fonctionnels, la division cellulaire ne peut pas être contrôlée, donc la cellule peut proliférer sans restriction.

Dans les hémopathies malignes, l'évènement moléculaire oncogénique majeur est la translocation chromosomique (voir pour revues : Rabbitts, 1994 ; Drexler *et al.*, 1995), avec pour conséquence la dérégulation de la fonction ou de l'activité du (ou des) gène(s) situé(s) au niveau du point de cassure. Dans les leucémies et les lymphomes, il existe 2 mécanismes généraux conduisant à cette dérégulation : (i) une modification de l'expression d'une forme normale (ou parfois tronquée) d'une protéine, après juxtaposition de l'oncogène correspondant à des gènes d'immunoglobulines (Ig) ou du récepteur des cellules T (TCR) ; (ii) la fusion de gènes, avec ou sans formation de protéine chimérique, ces protéines de fusion possédant des fonctions différentes de celles des formes sauvages.

De nombreux gènes situés au niveau des points de cassure des translocations sont à ce jour identifiés. Certains d'entre eux sont des proto-oncogènes dont la forme oncogénique correspondante a été retrouvée auparavant dans le génome de rétrovirus. Mais ce n'est pas le cas pour tous les gènes présents au voisinage des points de translocation, et il arrive parfois que les protéines correspondantes n'aient aucune activité transformante *in vitro* et *in vivo*. Cependant, il semble évident que la majorité des gènes impliqués dans les translocations ayant une conséquence pathologique, aient un rôle dans la survie cellulaire, la prolifération ou la différenciation. Malgré les nombreux travaux menés à bien, le rôle de certains de ces gènes transloqués dans le mécanisme de leucémogénèse ou de lymphomatogénèse n'est pas entièrement élucidé.

Dans cette partie, nous présenterons quelques exemples de translocations chromosomiques entraînant soit la juxtaposition à différents gènes de séquences activatrices de gènes d'Ig ou de TCR, soit la fusion de gènes, avec ou sans formation de protéine de fusion.

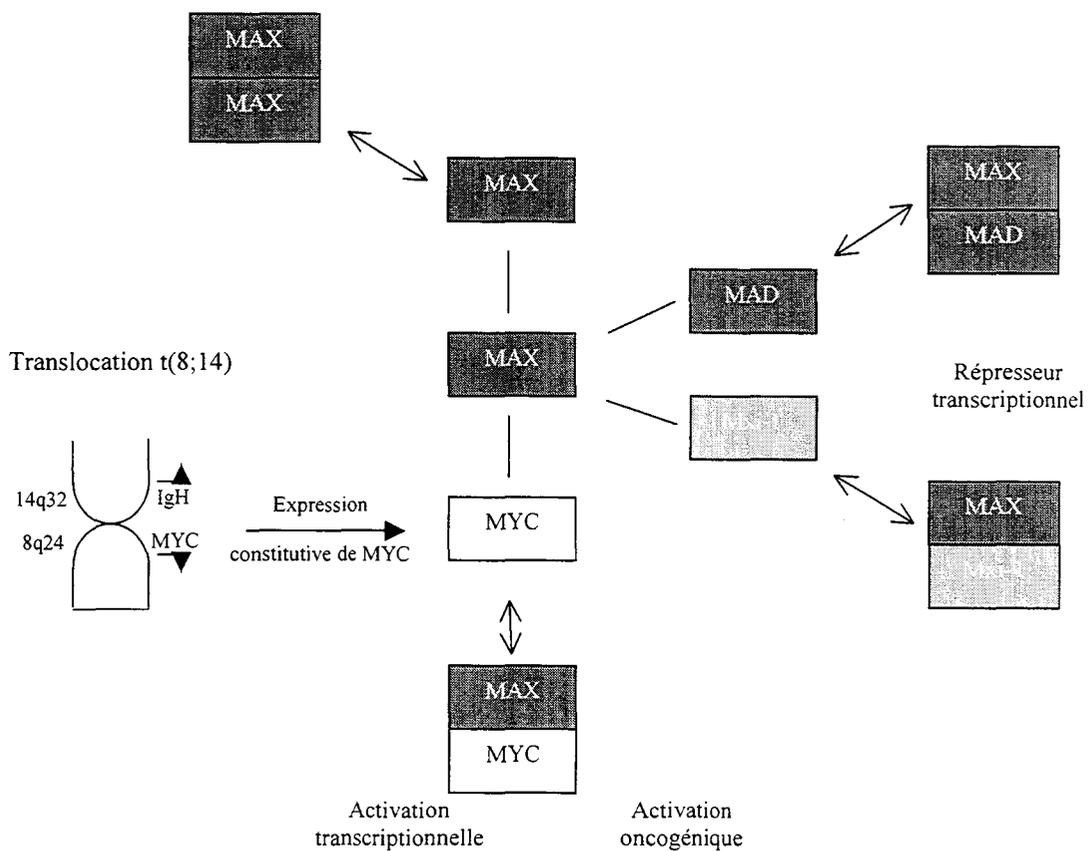
## I. Les translocations impliquant les séquences régulatrices des gènes d'Ig ou de TCR

Les translocations mettant en jeu les séquences régulatrices des gènes d'Ig sont spécifiques de certaines proliférations de cellules lymphoïdes B, celles impliquant les gènes des TCR sont associées à des proliférations T lymphoïdes. La majorité des gènes partenaires sont des facteurs de transcription. La fonction normale de ces protéines nucléaires est de se lier à des séquences spécifiques d'ADN, ce qui entraîne la répression ou l'activation de la transcription d'un gène. La présence des séquences régulatrices des gènes d'Ig ou de TCR en amont de ces proto-oncogènes provoquerait une modification de leur expression et donc une dérégulation de la machinerie transcriptionnelle.

L'étude moléculaire de ces translocations a abouti au clonage et à la caractérisation de nombreux loci, à partir des sondes des gènes d'Ig ou de TCR. Les exemples des gènes *MYC*, *BCL2*, *BCL1*, *TAL1* et *2* et *LYL1* seront brièvement exposés.

### I.1 Le gène *MYC*

Le gène *MYC*, localisé sur le bras long du chromosome 8 (en 8q24), code une protéine possédant un domaine de liaison à l'ADN de type « *Helix-Loop-Helix* » (HLH) et un domaine de dimérisation « *leucine zipper* » (ZIP). Il est impliqué avec les gènes d'Ig dans les translocations caractérisant un type particulier de lymphome non-Hodgkinien (LNH), le lymphome de Burkitt. La translocation t(8;14)(q24;q32), retrouvée majoritairement, concerne en 14q32 le gène des chaînes lourdes des Ig (*IgH*) (voir pour revue : Rabbitts and Boehm, 1991). Il existe 2 variantes : la t(2;8)(p12;q24) et la t(8;22)(q24;q11) qui touchent respectivement les chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$  des Ig. Dans des souris transgéniques, lorsque le gène *MYC* passe sous le contrôle des séquences régulatrices des gènes *Ig*, des tumeurs de type B se forment spontanément (Gauwerky and Croce, 1993). Ces réarrangements entraînent la sur-expression de la protéine MYC. Cette protéine peut former des hétérodimères avec le produit du gène *MAX* qui possède également des domaines HLH et ZIP. Quand la protéine MAX est complexée à la protéine MYC, il y a induction de leur activité transcriptionnelle ; par contre quand la protéine MAX est liée à d'autres protéines (MAD et Mxi-1), elle est inactive (Fig. G7) (Ayer *et al.*, 1993 ; Zervos *et al.*, 1993). La formation de ces différents



**Figure G7** : Représentation schématique des conséquences de la sur-expression de MYC suite à la translocation t(8;14) sur l'activité transcriptionnelle de la protéine MAX ; d'après Rabbitts, 1994.

complexes permet une régulation de l'activité des protéines concernées. La sur-expression de la protéine MYC déplacerait cet équilibre cellulaire vers la formation du complexe MYC-MAX et provoquerait ainsi une augmentation de la transcription de leurs gènes cibles. Cette hypothèse pourrait expliquer le rôle transformant du gène *MYC* suite aux translocations associés aux lymphomes de Burkitt (Amati *et al.*, 1993).

## I.2 Le gène *BCL2*

Le gène *BCL2* a été identifié au niveau du point de cassure de la t(14;18)(q32;q21) (voir pour revue : Larsen *et al.*, 1994). Cette translocation est la plus fréquente dans les LNH et 80 % des LNH folliculaires présentent une t(14;18). Cette anomalie chromosomique provoque la juxtaposition à *BCL2* des séquences activatrices du gène des *IgH*. Ce gène *BCL2*, localisé en 18q21, est également impliqué dans les translocations variantes, t(2;18)(p11;q21), t(18;22)(q21;q11) qui sont plus rarement retrouvées dans les lymphomes folliculaires et certains cas de LLC (Leucémies Lymphocytaires Chroniques). Ces réarrangements font intervenir les gènes des chaînes  $\kappa$  et  $\lambda$  des Ig. Dans les 3 cas, les translocations provoquent la sur-expression de la protéine BCL2. Cette protéine est localisée au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Elle a un rôle dans le contrôle de la mort programmée des cellules (encore appelée apoptose) de certains tissus à renouvellement permanent, en maintenant la viabilité cellulaire. *BCL2* est donc un gène anti-apoptotique. La sur-expression de *BCL2* *in vitro* et *in vivo* dans les cellules lymphoïdes inhibe l'apoptose induite par différents agents. Dans les conditions normales de l'ontogenèse B, les cellules dans lesquelles les recombinaisons somatiques des gènes d'Ig n'aboutissent pas à des gènes fonctionnels sont éliminées. Par contre, les cellules protégées contre l'apoptose constituent un compartiment en expansion lente mais continue, qui devient le siège d'événements oncogéniques, permettant l'émergence d'un clone malin en son sein.

## I.3 Le gène *BCL1/PRAD1*

La t(11;14)(q13;q32) provoque, le plus souvent, la juxtaposition du gène *BCL1/PRAD1* aux séquences régulatrices des *IgH*, parfois 100 kb en amont (voir pour revue : Rimokh *et al.*, 1995). Ce gène est également impliqué dans la t(11;22)(q13;q11) qui met également en jeu le gène des *Igλ*. Ces translocations sont décrites dans les LNH à cellules du manteau.

Le gène *BCL1/PRADI* encore appelé *CCND1* code la cycline D1. Cette protéine appartenant à la famille des cyclines D, a un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, en particulier au cours du passage de la cellule de la phase G1 à la phase S. La dérégulation de l'expression de cette protéine perturberait cette transition, ce qui contribuerait au développement de la tumeur. Il est intéressant de noter que la t(11;14)(q13;q32) et la t(11;22)(q13;q11) entraînent la sur-expression de la cycline D1 dans des cellules hématopoïétiques qui, à l'état normal, ne l'expriment pas.

#### I.4 Les gènes *TAL1*, 2 et *LYL1*

Les gènes *TAL1*, 2 et *LYL1* codent des membres de la famille HLH. Ils contiennent des domaines de liaison à l'ADN et des domaines de dimérisation (HLH). Ils sont associés aux T-LAL (leucémies aiguës lymphoblastiques de type T) quand ils sont juxtaposés aux gènes des TCRs (Mellentin *et al.*, 1989 ; Xia *et al.*, 1991).

Le gène *TAL1* est impliqué dans la t(1;14)(p32;q11) avec le gène codant le TCRA/D. Il existe une variante de cette translocation : la t(1;7)(p32;q35) qui juxtapose le gène *TAL1* au locus *TCRB* (Fitzgerald *et al.*, 1991). Les gènes *TAL2* et *LYL1* ont également comme partenaire le locus *TCRB* dans la t(7;9)(q35;q32) et la t(7;19)(q35;p13). Quelques travaux décrivent un mécanisme possible de leucémogénèse induite par la dérégulation de ces gènes dans les LAL-T (Xia *et al.*, 1994 ; Miyamoto *et al.*, 1996 ; François *et al.*, 1998).

#### I.5 Le gène *HOX11*

Le gène *HOX11*, localisé dans la bande q24 du chromosome 10, est impliqué, avec les gènes *TCRD* (en 14q11) et *TCRB* (en 7q35), dans les t(10;14)(q24;q11) et t(7;10)(q35;q24) associées aux T-LAL (Dubé *et al.*, 1991). Ce gène habituellement silencieux dans les tissus hématopoïétiques se retrouve exprimé dans les cellules présentant ces translocations, suggérant un rôle de la protéine correspondante dans la leucémogénèse (Lichty *et al.*, 1995 ; Salvati *et al.*, 1995). Il code une protéine à homéodomaine et est décrit comme étant un transactivateur de la transcription de certains gènes (Dear *et al.*, 1993).

## II. Les translocations générant la fusion de gènes

### II.1 La fusion de gènes provoquant la formation de protéine de fusion

Un nombre important de réarrangements chromosomiques ont pour conséquence la formation de protéines chimériques.

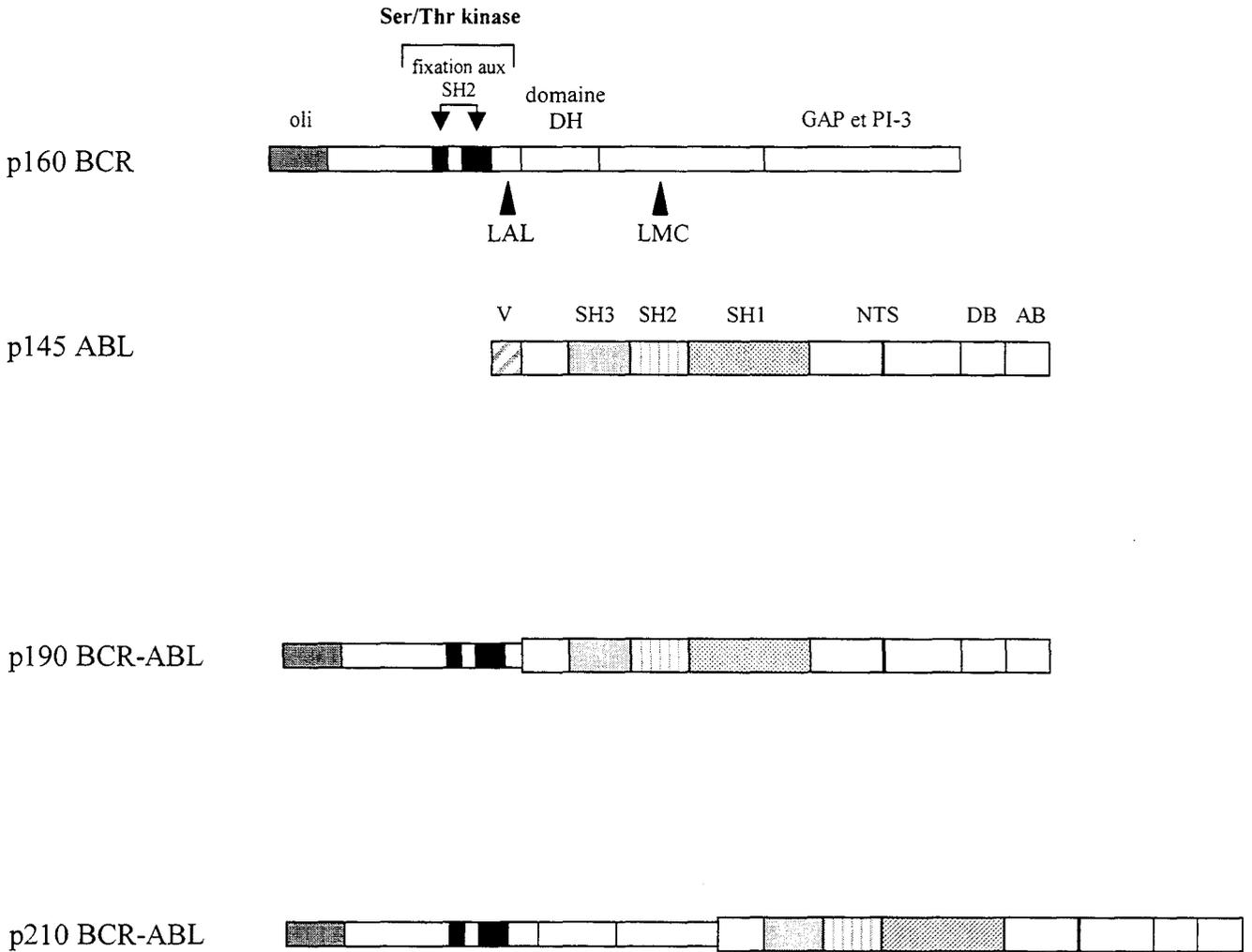
#### II.1.a Les gènes *BCR* et *ABL*

Le premier gène de fusion ayant été cloné est celui porté par le « chromosome Philadelphie » (Ph) généré suite à la translocation  $t(9;22)(q34;q11)$ , associée aux leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et aux leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) (Nowell and Hungerford, 1960). Le chromosome dérivé 22 (der 22\* ou Ph), porte la partie 5' du gène *BCR* derrière lequel est venu se greffer la quasi-totalité du gène *ABL*. La possibilité de 2 régions de cassure différentes au sein du gène *BCR* entraîne l'expression de 2 transcrits de fusion codant 2 protéines différentes : la p190<sup>BCR/ABL</sup> retrouvée dans les LAL, et la p210<sup>BCR/ABL</sup> retrouvée dans les LMC ou les LAL (Fig. G8).

La protéine BCR a une structure complexe. Elle possède différents domaines fonctionnels : des domaines d'interaction protéine-protéine (de type *coiled coil* et SH), un domaine Ser/Thr kinase, un domaine DH, une région possédant une activité GAP pour les protéines Rac1 et 2 et enfin un domaine présentant des homologies de séquence avec la sous-unité non catalytique de la phosphatidylinositol 3-kinase (Fig. G8). De par ces nombreux domaines, la protéine BCR pourrait jouer différents rôles dans la transmission du signal impliquant des protéines kinases et des petites protéines G de la super famille Ras. Une fonction impliquant le domaine GAP a été clairement établie par des expériences utilisant des souris transgéniques (Voncken *et al.*, 1995). Ces souris, ayant perdu l'expression du gène *BCR*, sont viables et se développent normalement. Cependant, l'induction d'un phénomène inflammatoire entraîne chez ces animaux un choc septique qui peut être mortel. Ce choc se produit suite à une surproduction d'anions superoxydes par les neutrophiles, accompagnée

---

\*définition : l'expression chromosome « dérivé » provient de l'anglais « derivative », qualifiant tout chromosome ayant subi une modification, en particulier ayant échangé une partie de son matériel avec une portion d'un autre chromosome dans le cas d'une translocation équilibrée réciproque.



**Figure G8 :** Représentation schématique des protéines BCR, ABL et BCR/ABL.  
oli : domaine d'oligomérisation ; SH : *Src Homology Domain* ; NTS : signal de localisation nucléaire ; DB : domaine de liaison à l'ADN ; AB : domaine de fixation à l'actine.

d'une translocation de la protéine Rac2 du cytoplasme vers la membrane. Ces travaux montrent une implication directe de la protéine BCR dans la régulation de l'activité de la protéine Rac2 dans les neutrophiles.

La protéine ABL, possède un domaine Tyrosine kinase dont l'activité est régulée au cours du cycle cellulaire, un signal de localisation nucléaire, un domaine de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine de fixation à l'actine et un signal de myristylation permettant à la protéine de s'ancrer aux membranes cellulaires (Welch and Wang, 1993) (Fig. G8). La présence de ces différents domaines suggère que la protéine ABL peut avoir des fonctions à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Le rôle de cette protéine au niveau du cytoplasme est peu étudié ; en revanche, sa fonction nucléaire a fait l'objet de nombreux travaux. Cette protéine aurait un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, de la transcription, et au niveau de l'hématopoïèse en permettant le développement normal de la lignée myéloïde (Rosti *et al.*, 1992).

La protéine p210<sup>BCR/ABL</sup> est exclusivement cytoplasmique malgré la présence du signal de localisation nucléaire et possède une activité Tyrosine kinase constitutive, corrélée à son pouvoir oncogénique (Konopka *et al.*, 1984). L'expression de cette protéine de fusion chez la souris entraîne l'apparition d'hémopathies très proches de la LMC montrant ainsi une implication directe de cette protéine dans la pathologie (Daley *et al.*, 1990 ; Kelliher *et al.*, 1990). Plusieurs hypothèses ont été émises concernant le mécanisme de transformation des cellules hématopoïétiques par la protéine p210<sup>BCR/ABL</sup>. L'activation de Ras et de MYC semblent nécessaires à l'activité oncogénique de cette protéine. L'inhibition de l'apoptose et l'interaction avec une fonction des intégrines pourraient également jouer un rôle important dans l'établissement du phénotype transformé. Dans notre laboratoire, l'équipe de D'Halluin montre que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B serait l'un des effecteurs potentiels de la protéine p210<sup>BCR/ABL</sup> responsable de la transformation des cellules hématopoïétiques de souris, DA1 (Hamdane *et al.*, 1997).

La LMC se caractérise par 2 phases : une phase chronique relativement peu maligne, suivie d'une phase de transformation aiguë appelée également crise blastique, hautement maligne. Le chromosome Ph, à l'origine du déclenchement de la 1<sup>ère</sup> phase de la maladie, n'est pas suffisant à lui seul pour entraîner cette évolution. En effet, des altérations cytogénétiques additionnelles (comme la trisomie du chromosome 8, l'apparition d'un deuxième chromosome Ph et d'autres anomalies) sont observées chez la majorité des patients atteints de LMC dont l'évolution s'approche de la phase aiguë. Néanmoins, ces événements moléculaires restent à étudier.

### II.1.b Le gène *MLL* et ses partenaires

La bande chromosomique 11q23, qui inclut le gène *MLL* (pour l'anglais : « *Mixed-Lineage Leukemia* »), est retrouvée dans de nombreuses translocations avec plus de 15 chromosomes partenaires (Rowley *et al.*, 1990 ; voir pour revue : Tigaud *et al.*, 1995). La t(4;11)(q21;q23) associée aux leucémies aiguës lymphoïdes est la plus fréquente de ces anomalies. Les remaniements chromosomiques impliquant la bande 11q23 sont aussi décrits dans des hémopathies myéloïdes et, en particulier, celles secondaires à un traitement par des agents anti-cancéreux (Bower *et al.*, 1994). Ils sont aussi fréquemment retrouvés au sein des leucémies aiguës avec une incidence particulièrement élevée chez le jeune enfant (LAL de l'enfant) (Rubnitz *et al.*, 1994).

Le gène *MLL*, encore appelé *ALL1*, *HRX* ou *HTRX*, code une protéine présentant une forte homologie avec le facteur de croissance Trithorax cloné chez la Drosophile (Cimino *et al.*, 1991 ; Ziemins-van der Poel *et al.*, 1991 ; Djabali *et al.*, 1992). La protéine *MLL* possède 2 motifs « en doigt de zinc » et un motif « en crochet AT » impliqués dans l'interaction avec l'ADN, ainsi qu'une zone d'homologie avec le domaine répresseur transcriptionnel d'une ADN méthyltransférase de mammifère.

Parmi les 10 partenaires du gène *MLL* (gènes AF) identifiés dans les translocations impliquant la région 11q23, une homologie significative est retrouvée entre les protéines AF-9 et ENL et entre AF-10 et AF-17. Il existe, au niveau de certaines de ces protéines, des régions d'interaction protéine-protéine conduisant à la formation d'homo- ou d'hétérodimères. Les réarrangements provoquent, dans tous les cas, la création d'une protéine chimérique formée de la partie N-terminale de la protéine *MLL* avec le motif « crochet AT » et de la partie C-terminale de la protéine partenaire exprimée à partir du der 11 (Corral *et al.*, 1993). Les données cytogénétiques, les travaux de transfert de gènes ainsi que les modèles de *knock-in* chez la souris indiquent que ces protéines de fusion issues du der 11 seraient responsables de la leucémogénèse (Corral *et al.*, 1996 ; Lavau *et al.*, 1997).

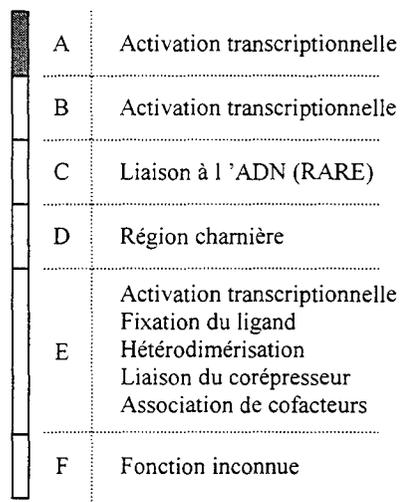
Diverses hypothèses sont proposées afin de tenter d'expliquer le rôle de ces produits de fusion *MLL/AF* dans la transformation cellulaire. Ces protéines possèdent le domaine de liaison à l'ADN de *MLL* ainsi que des portions variables des protéines AF. Elles seraient capables soit d'exercer une fonction transactivatrice, soit de former des dimères avec d'autres protéines. Le produit de fusion présente ainsi les caractéristiques d'un facteur de transcription possédant des propriétés différentes de celles de la protéine *MLL*. Il pourrait en particulier entrer en compétition avec le produit du gène *MLL* normal vis à vis de cibles spécifiques ou

attirer d'autres facteurs de transcription par l'intermédiaire de son domaine d'interaction protéine-protéine. Tout ceci reste à définir.

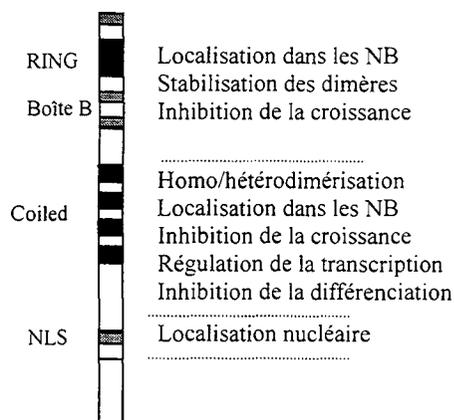
### II.1.c Les gènes *RAR $\alpha$* , *PML* et *PLZF*

Un dernier exemple très documenté, ayant permis la découverte et l'étude d'un autre facteur répresseur de la transcription, PML, (pour l'anglais : « *Promyelocytic Leukemia* ») est celui de la t(15;17)(q21;q21), retrouvée dans les leucémies aiguës promyélocyaires (LAP) (de Thé *et al.*, 1990). Cette translocation provoque la fusion du récepteur nucléaire aux rétinoïdes (*RAR $\alpha$* , gène situé en 17q21), et de la protéine PML (gène situé en 15q21) (voir pour revue : Melnick and Licht, 1999). La protéine *RAR $\alpha$*  possède 6 domaines fonctionnels (domaines A à F) (Fig. G9) dont un à doigt de zinc (domaine C), 3 domaines activateurs de la transcription (domaines A, B et E). Le domaine E est également le site de liaison du ligand (l'acide rétinoïque), des co-activateurs et des co-répresseurs de la transcription. En association avec les cofacteurs (en particulier, avec la protéine RXR), la protéine *RAR* contrôle la différenciation des cellules myéloïdes par stimulation de la transcription de certains gènes (Melnick and Licht, 1999). La protéine PML est un corépresseur de la transcription (Vallian *et al.*, 1997) possédant également plusieurs domaines à doigt de zinc en C-terminal ainsi qu'un domaine de dimérisation de type *coiled coil*. A l'état normal, cette protéine se trouve localisée dans des structures nucléaires appelées « *nuclear bodies* » en anglais (Koken *et al.*, 1997).

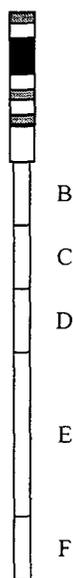
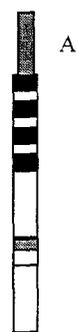
La protéine PML/*RAR $\alpha$*  est constituée des domaines B à F de *RAR $\alpha$*  devant lesquels on retrouve la partie N-terminale de PML (Fig. G9). L'existence de plusieurs points de cassure dans le gène PML induit la formation de plusieurs protéines de fusion possédant en partie ou ne possédant pas le domaine de dimérisation. PML/*RAR $\alpha$*  a une activité dominante négative: elle bloque la différenciation des cellules hématopoïétiques par séquestration des coactivateurs de la transcription interagissant avec *RAR $\alpha$*  (RXR par exemple). La protéine de fusion réciproque, *RAR $\alpha$* /PML, n'est pas retrouvée dans tous les cas de LAP associées à la t(15;17)(q21;q21). Ces données suggèrent que cette protéine n'a pas de rôle dans la leucémogénèse. Cependant, des études menées *in vivo* montrent que le produit *RAR $\alpha$* /PML aurait un rôle dans la progression de la maladie.

RAR $\alpha$ 

PML



t(15;17)

PML/RAR $\alpha$ Blocage de la  
différenciationRAR $\alpha$ /PMLAbsent dans 30 % des LAP  
Progression de la maladie?

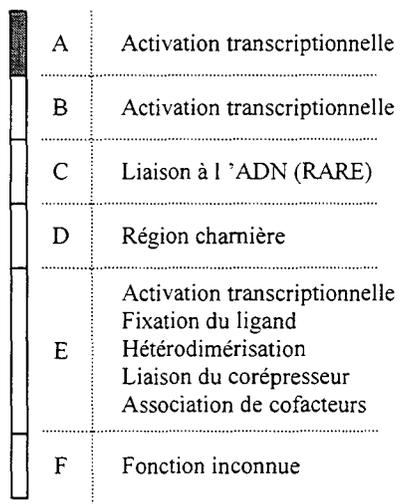
**Figure G9** : Représentation schématique des protéines RAR $\alpha$ , PML et des protéines de fusion PML/RAR $\alpha$  et RAR $\alpha$ /PML formées suite à la translocation t(15;17)(q21;q21).

Une variante de la t(15;17)(q21;q21) également retrouvée dans les LAP est la t(11;17)(q23;q21) qui provoque la fusion de RAR $\alpha$  avec un autre facteur répresseur de la transcription, la protéine PLZF (pour l'anglais : « *Promyelocytic Leukemia Zinc Finger* ») (Chen *et al.*, 1993). La protéine PLZF appartient à la famille des protéines BTB/POZ. Elle comporte en N-terminal un domaine répresseur POZ impliqué dans l'interaction protéine-protéine, un domaine riche en Proline et 9 motifs en doigt de zinc situés en C-terminal (Fig. G10). La protéine PLZF se caractérise par sa colocalisation avec PML dans des structures nucléaires (Koken *et al.*, 1997). Dans les cellules possédant la t(11;17)(q23;q21), les 2 protéines RAR $\alpha$ /PLZF et PLZF/RAR $\alpha$  sont exprimées. Comme dans le cas de la protéine PML/RAR $\alpha$ , des études montrent que la protéine PLZF/RAR $\alpha$  a un rôle dominant négatif par rapport à la protéine RAR $\alpha$  ce qui provoque un blocage de la différenciation cellulaire (Chen *et al.*, 1994). La protéine réciproque RAR $\alpha$ /PLZF est composée des 7 motifs en doigt de zinc provenant de la partie C-terminale de PLZF et du domaine transactivateur de RAR $\alpha$  (Fig. G10). Ces domaines sont impliqués dans le contrôle de la division cellulaire, par activation de certains gènes régulateurs du cycle cellulaire comme le gène de la cycline A2 (Yeyati *et al.*, 1999). Ce produit de fusion aurait donc un effet promoteur de croissance. Le cas de la t(11;17) constitue donc un exemple de translocation chromosomique pour lequel un rôle synergique des deux protéines de fusion dans la genèse de la maladie a été proposé. On peut concevoir effectivement comment l'effet conjoint des deux produits de fusion aboutisse à la multiplication incontrôlée d'une cellule bloquée à un stade précis de la différenciation, entraînant ainsi la leucémogénèse.

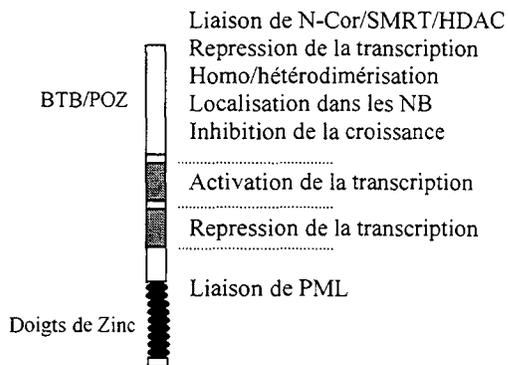
## **II.2 Les fusions de gènes ne provoquant pas la formation d'une protéine de fusion**

L'exemple majeur est donné dans ce cas par les translocations impliquant le gène *LAZ3/BCL6* : ces remaniements ne génèrent pas de protéines de fusion, mais provoquent un échange de séquences promotrices entre les 2 gènes partenaires. En effet, les études menées au laboratoire sur ce gène montrent que les points de cassure en 3q27 sont regroupés dans un MTC (pour l'anglais : « *Major Translocation Cluster* ») de 3.3 kb, situé en amont des exons contenant la séquence codante du gène (Deweindt *et al.*, 1993). Il existe également des points de cassure plus en 5' mais aucun n'a été trouvé dans la partie codante du gène (Chen *et al.*, 1998).

RAR $\alpha$

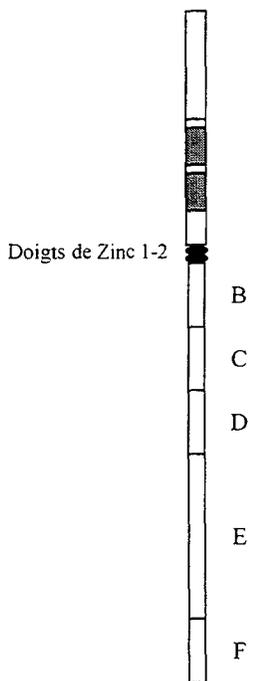


PLZF



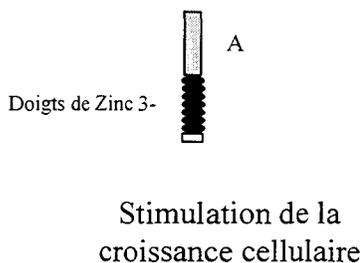
**t(11;17)**

PLZF/RAR $\alpha$



Blocage de la différenciation

RAR $\alpha$ /PLZF



**Figure G10** : Représentation schématique des protéines RAR $\alpha$ , PLZF et des protéines de fusion PLZF/RAR $\alpha$  et RAR $\alpha$ /PLZF formées suite à la translocation t(11;17)(q23;q21).

Les translocations mettant en jeu la région 3q27 et les gènes d'Ig représentent en fréquence la 3<sup>ème</sup> anomalie cytogénétique dans les LNH (Bastard *et al.*, 1992 ; 1994). Elles sont associées au remaniement moléculaire du gène *LAZ3/BCL6* (Kerckaert *et al.*, 1993 ; Ye *et al.*, 1993, Miki *et al.*, 1994) qui code un répresseur transcriptionnel à doigt de zinc et à domaine BTB-POZ (Albagli *et al.*, 1995a). De la même manière que pour la protéine PLZF, les études réalisées au laboratoire montrent que le domaine BTB-POZ de *LAZ3/BCL6* est nécessaire au contrôle de la régulation de la transcription des gènes et de la restructuration de la chromatine (Albagli *et al.*, 1995a ; b ; Dhordain *et al.*, 1995) par interaction avec le co-répresseur SMRT (pour l'anglais : «*Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptor*») (Dhordain *et al.*, 1997) sous forme d'un complexe protéique composé des facteurs SMRT, mSIN3A, et d'une histone désacétylase (Dhordain *et al.*, 1998 ; Wong *et al.*, 1998).

Comme le gène *MLL* et les gènes *TEL* et *AML1* non décrits ici, le gène *LAZ3/BCL6* a la caractéristique de se recombiner avec de nombreux gènes partenaires. Il se trouve réarrangé dans 40 % des LNH de type B les plus agressifs que sont les lymphomes diffus à grandes cellules, avec les gènes d'Ig, affectant le locus des chaînes lourdes en 14q32 ou des chaînes légères en 2p12 ou 22q11 (Bastard *et al.*, 1994 ; Lo Coco *et al.*, 1994 ; Ye *et al.*, 1993). Cependant, les réarrangements de *LAZ3/BCL6* se produisent également et ce, à une moindre fréquence, dans plusieurs types de LNH sans impliquer les gènes d'Ig. D'autres partenaires sont identifiés en 4p11-13 (Dallery *et al.*, 1995), 6p22 (Akasaka *et al.*, 1997), 11q23 (Galiègue-Zouitina *et al.*, 1996), 13q14 (Galiègue-Zouitina *et al.*, 1999) et douze autres loci restent encore à caractériser.

Parmi ces réarrangements du gène *LAZ3/BCL6*, la t(3;4)(q27;p11-13) initialement observée dans la lignée cellulaire VAL (Kerckaert *et al.*, 1993) a retenu notre attention. C'est à partir des observations faites par Christian Bastard, du laboratoire de Génétique Oncologique de Rouen, sur cette lignée cellulaire et au laboratoire par l'équipe de Jean-Pierre Kerckaert qu'a débuté ce travail de thèse.

## **OBJECTIFS**

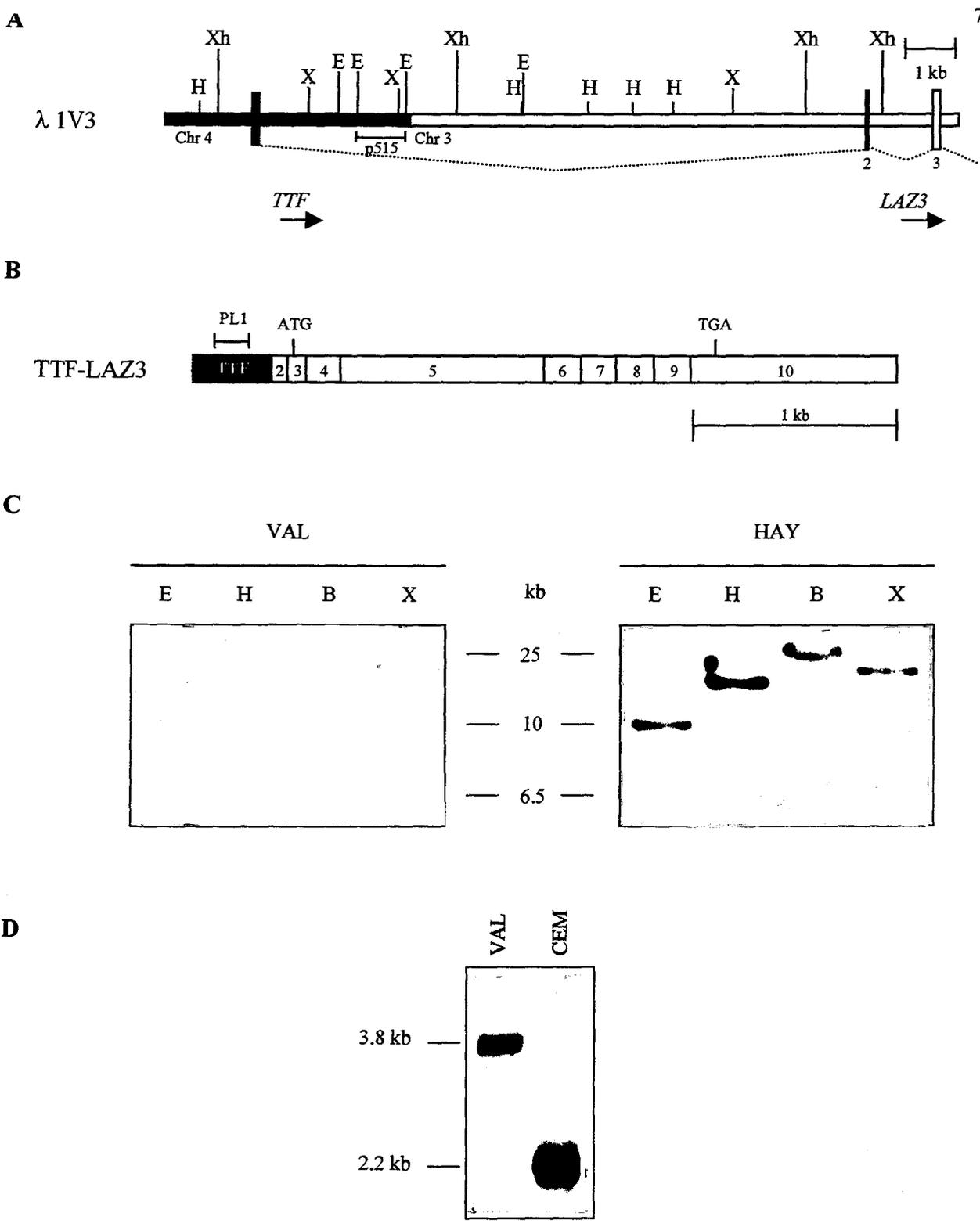
Notre travail consiste en l'étude de la translocation t(3;4)(q27;p11-13), clonée au laboratoire, dans la lignée cellulaire VAL. Cette lignée établie par C. Bastard a pour origine un LNH diffus. Le point de cassure de cette translocation est situé dans le MTC du gène *LAZ3* à 9 nucléotides de celui de la t(3;14)(q27;q32). Dans ces 2 cas, le gène *LAZ3* est décapité de son 1<sup>er</sup> exon et de ses séquences régulatrices (Kerckaert *et al.*, 1993).

Ces données suggèrent donc que dans la t(3;4) le gène *LAZ3* doit être dérégulé par une unité transcriptionnelle de la région 4p11-13 située à proximité du point de cassure.

Le point de cassure de la translocation t(3;4) sur le chromosome dérivé 3 a été cloné par l'équipe de Jean-Pierre Kerckaert, dans la lignée cellulaire VAL. Un fragment *EcoRI* de 1 kb (p515, Fig. O1) a été isolé à partir du clone d'ADN génomique  $\lambda$ 1V3, contenant la jonction 3-4, afin de cribler une banque d'ADN génomique (Kerckaert *et al.*, 1993). En parallèle, un transcrit de fusion a été isolé à partir d'ARNm VAL à l'aide de la technique de RACE (pour l'anglais : « *Rapid Amplification of cDNA Ends* »). L'analyse de la séquence nucléotidique de ce clone a montré que le gène *LAZ3* était interrompu au niveau du site accepteur d'épissage du second exon, provoquant ainsi la substitution des séquences en 5' par une nouvelle unité transcriptionnelle appelée *TTF* (pour l'anglais : « *Translocation Three Four* »).

A partir de ce transcrit de fusion, une sonde spécifique de la région 4p11-13 a été préparée par digestion enzymatique à l'aide de l'endonucléase *HpaII* (sonde PL1, Fig. O1, partie C). Par technique de *Southern Blot*, cette sonde met en évidence le réarrangement des fragments *HindIII* et *BamHI* dans l'ADN génomique VAL. La sonde F372 de la région 3q27 (Deweindt *et al.*, 1993) s'hybride également sur ces fragments, confirmant le réarrangement du gène *LAZ3* avec le locus *TTF*.

Sur *Northern Blot*, la sonde PL1 détecte un transcrit majeur de 2.2 kb dans la lignée lymphocytaire T CEM, plus faiblement détecté dans la lignée VAL. Le transcrit de 3.8 kb observé dans la lignée VAL correspond au transcrit de fusion *TTF/LAZ3* (Fig. O1, partie D).



**Figure O1** : Mise en évidence d'une unité transcriptionnelle en 4p11-13. A : Carte de restriction du clone génomique  $\lambda$ 1V3. La boîte noire représente un exon de *TTF*, les boîtes blanches représentent les exons 2 et 3 de *LAZ3*. Les flèches correspondent au sens de transcription des gènes *LAZ3* et *TTF*. B : Représentation schématique du transcrit de fusion *TTF-LAZ3*. Les rectangles noir et blanc représentent les exons de *TTF* et de *LAZ3*, respectivement. C : Hybridation de la sonde PL1 sur *Southern Blot* à partir des ADN génomiques VAL et HAY (témoin normal). Les bandes anormales dans la lignée VAL sont indiquées par les flèches noires. D : Hybridation de la sonde PL1 sur *Northern Blot*. Les enzymes de restriction sont : *Bam*HI (B) ; *Eco*RI (E) ; *Hind*III (H) ; *Xba*I (X) ; *Xho*I (Xh).

A partir des premiers résultats de l'équipe de Jean-Pierre Kerckaert, le but de notre travail est de caractériser le locus *TTF* en 4p11-13 à proximité du point de cassure de la t(3;4)(q27;p11-13). Cette caractérisation consiste :

- en l'isolement de clones d'ADNc de cette nouvelle unité transcriptionnelle
- en l'identification du produit correspondant
- au clonage du gène *TTF* et à la caractérisation moléculaire de la translocation (3;4)
- en la détermination de l'organisation génomique de *TTF*
- en l'étude de l'expression de ce gène

Les résultats obtenus sont présentés dans la première partie du chapitre **RESULTATS**.

Ensuite, nous avons étudié la récurrence des anomalies en 4p13 dans le LNH et le myélome multiple. Les résultats obtenus sont décrits dans la deuxième partie du chapitre **RESULTATS**.

Les rôles des protéines Rho sont étudiés activement depuis plusieurs années. La mise en évidence et la caractérisation de nouveaux membres permettent de mieux comprendre le rôle de cette famille dans les fonctions biologiques cellulaires. Dans ce travail, la caractérisation de la protéine TTF consiste tout d'abord en l'étude de sa localisation subcellulaire. Ensuite, afin d'étudier ses propriétés biochimiques, c'est à dire son activité GTPasique et sa capacité d'échanger le GDP par le GTP, la production de la protéine par le système « baculovirus » a été engagée. Et enfin, afin de pouvoir obtenir un outil permettant l'étude de l'expression de la protéine TTF chez les patients présentant une translocation impliquant le gène, nous avons entrepris la production d'un anticorps spécifique de cette protéine. L'ensemble de ces résultats forme la troisième partie du chapitre **RESULTATS**.

## **RESULTATS**

## A. LE GENE *TTF*

Les premières données nous montrent qu'il existe une unité transcriptionnelle en 4p11-13 (Fig. O1). Il est donc intéressant d'étudier la nature de ce gène à partir de sa séquence nucléotidique.

### I. Caractérisation de *TTF*, une nouvelle unité transcriptionnelle en 4p11-13

#### I.1 Isolement des transcrits *TTF*

Dans un premier temps, la banque d'ADNc Karpas 422 a été criblée à l'aide de la sonde exonique PL1. Ceci a permis l'isolement d'un clone contenant un fragment d'ADNc de 1.4 kb (ADNc Ka) (Dallery *et al.*, 1995). L'analyse de la séquence nucléotidique de ce clone nous a alors révélé l'existence d'un cadre de lecture ouvert qui s'étend sur 574 nucléotides (Fig. R1 page ).

Dans un deuxième temps, l'ADNc Ka a été utilisé pour cribler la banque d'ADNc Raji et a ainsi permis d'isoler 2 autres clones : les clones 1cR7 et 1cR8 contenant respectivement des fragments de 0.737 kb et de 0.290 kb. La comparaison de ces clones est schématisée sur la figure R2.

Ce schéma nous montre que :

- les clones 1cR7 et 1cR8 ont en commun leur partie 5', que nous appelons région A.
- la partie 3' du clone 1cR8 est commune à la partie 5' du clone Ka (région B). Dans le clone 1cR8, une délétion de 70 bp est retrouvée au niveau du site d'épissage entre les régions A et B.
- la partie 3' du clone 1cR7 est commune à la partie centrale du clone Ka (région C), elle comprend une portion de la partie codante.
- la partie 3' du clone Ka n'a aucune séquence commune avec les autres clones. Cette partie a été appelée région D.

Cette comparaison nous permet d'orienter les clones entre eux mais aussi de montrer que le gène fait très certainement l'objet d'épissage alternatif.

```

1           CTGCCCCACACACACTAACCCAACCATCTTGGGGTGGAC
40  TCCCTGCCAGCCCAACTGTTGTATTTTCAGTTCCTCCAGTGTGAATCAGTTAATATTCTC
100 GGAACGAGGGAGAGGTTGATCCTATGAGGAAATCAACCACAGTGAAAAGGCTTGGGCCG
160 CTTTTGTTTTCGCCTCCTTTTGTGAACAAATTTGATTTCCGGAGTCAGTCATTTTACTG
220 TCAAGACATTTCTTCGGCATTCTGCAACAGTTTCCAACATGGCTAGATCCATCAGAACT
280 GAAGCCGTGGAGAACGCTCTCGGGGCCTTTGCCACTTCTTGGAGTAGAAGCCGACAGAGA
340 GCTGTTTGGAACTTCTCCTTCACACACCAGTTGAAGACTAGGCTTTGGAGGTTTCAA
400 GCAGACGGTGCTTGGATGGGCAGGGAGAAAGTAACATTCTGCAAATCGCCGTCAGAGGTCC
460 TGAGGACACAGACCTACCTGGCTTGCAATCCCCTTGCTGAATGGCGTGTGCTGCAGCTGC
520 CCACTGAGGGCTCTTTTCCCTGGGATTCTGGACTTCAAGTAGGACAGCAGGCTGGGAAG
580 ATGCTGAGTTCATCAAGTGCCTGTTGGTGGGCGACTCTGCTGTGGGAAAACCTCTCTG

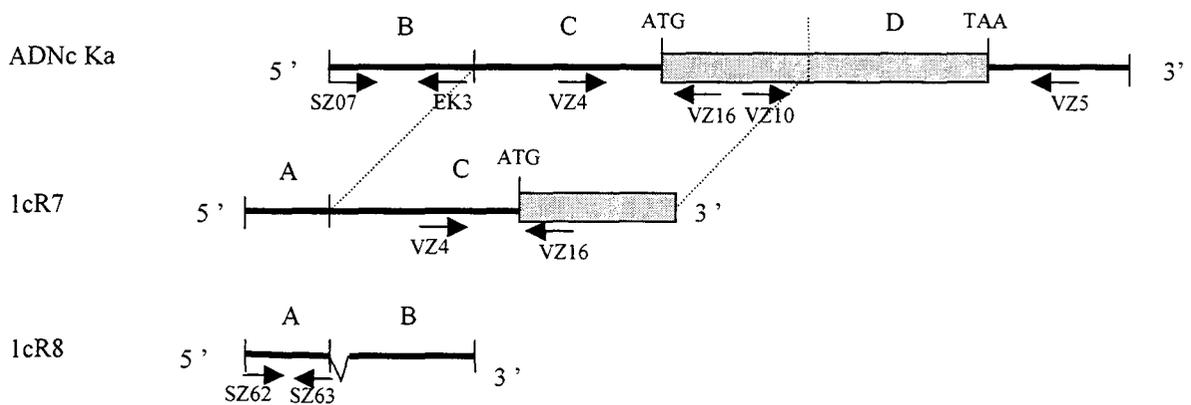
    M L S S I K C V L V G D S A V G K T S L

20

640  TTGGTGCCTTCACCTCCGAGACCTTCCCGAGGCCTACAAGCCCACAGTGTACGAGAAC
    L V R F T S E T F P E A Y K P T V Y E N      40
700  ACAGGGGTGGACGTCTTCATGGATGGCATCCAGATCAGCCTGGGCCTCTGGGACACAGCC
    T G V D V F M D G I Q I S L G L W D T A      60
760  GGCAATGACGCCTTCAGAAGCATCCGGCCCCTGTCTACCAGCAGGCAGACGTGGTGCTG
    G N D A F R S I R P L S Y Q Q A D V V L      80
820  ATGTGCTACTCTGTGGCCAACCATAACTCATTCTGAACTTGAAGAACAAGTGGATTGGT
    M C Y S V A N H N S F L N L K N K W I G      100
880  GAAATTAGGAGCAACTTGCCCTGTACCCCTGTGCTGGTGGTGGCCACCCAGACTGACCAG
    E I R S N L P C T P V L V V A T Q T D Q      120
940  CGGGAGATGGGGCCCCACAGGGCCTCCTGCGTCAATGCCATGGAAGGGAAGAACTGGCC
    R E M G P H R A S C V N A M E G K K L A      140
1000 CAGGATGTCAGAGCCAAGGGCTACCTGGAGTGCTCAGCCCTTAGCAATCGGGGAGTACAG
    Q D V R A K G Y L E C S A L S N R G V Q      160
1060 CAGGTGTTTGTAGTGCGCCGTCCGAACTGCCGTCAACCAGGCCAGGAGACGAAACAGAAG
    Q V F E C A V R T A V N Q A R R R N R R      180
1120 AGGCTCTTCTCCATCAATGAGTGAAGATCTTCTAAACCCCAAGAGACTTCACACAACAC
    R L F S I N E C K I F ***      191
1080 TTATGTATGCACCCCAAAGACTAATGGGGAGAGGGAGGGCCGGGAAGCCAGGAAAGCTTG
1240 GTGTTTTCTCTGGGTACACCCCAAGCAGCGTCTCCGTTTTGGATACAGTTATTGATGAGG
1300 CTTGGCCACTGGATGTTTTCACTAACTACACTCTACAAGTGAAGTCTTGGCCAGGCCAG
1360 TTAGAAAATCCCTTGGGGAACTGTGATGAATATTCCATCTTTGATTAAAAAAGTGAAAT
1420 GTCTCCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

**Figure R1** : Séquences nucléotidique et protéique du clone d'ADNc Ka. La numérotation des nucléotides est à gauche et celle des acides aminés à droite.



**Figure R2** : Schéma de l'alignement des clones d'ADNc *TTF*. Le clone d'ADNc Ka a été isolé dans la banque d'ADNc Karpas 422. Les clones 1cR7 et 1cR8 proviennent de la banque d'ADNc Raji. La partie codante du gène est représentée par la boîte grisée. La position des amorces utilisées pour la PCR est figurée par les flèches. La ligne pointillée verticale sépare les régions C et D dans l'ADNc Ka.

Des sondes spécifiques de chaque région ont été préparées par PCR. Pour la région A, la PCR a été réalisée sur le clone 1cR8 à l'aide des amorces SZ62-SZ63 ; pour la région B le clone 1cR7 a été utilisé comme matrice avec les amorces SZ07-EK3. Les régions C et D ont été amplifiées à partir du clone Ka à l'aide des couples d'amorces VZ4-VZ16 et VZ10-VZ5, respectivement. Ces sondes seront nécessaires par la suite pour la détermination de l'organisation génomique du gène *TTF* ( cf § A-II-2, page 87).

## I.2 Le gène *TTF* code une protéine homologue aux protéines Ras

A partir du cadre de lecture mis en évidence dans l'ADNc Ka, la séquence protéique de *TTF* a été déduite de la séquence nucléotidique à l'aide du logiciel PCGENE. L'analyse de cette séquence nous montre que la protéine possède différents acides aminés et/ou séquences consensus retrouvés dans les domaines nécessaires à la fonction biologique des petites protéines G comme (Fig. R3) :

- la Lysine en position 17, la Phénylalanine en position 29 et la Thréonine en position 36 correspondant respectivement à la Lysine en position 16, la Phénylalanine en position 28 et la Thréonine en position 35 chez p21 Ras, ces acides aminés étant nécessaires à la liaison du GTP/GDP ;
- les 4 domaines impliqués dans la liaison et l'hydrolyse du GTP qui sont représentés par les acides aminés 11-17, 58-63, 115-119, 148-153 correspondant aux acides aminés 10-16, 57-62, 116-120, 147-152 chez p21 Ras ;
- la séquence C-terminale Cys-Lys-Ile-Phe (Cxxx-COOH) impliquée dans l'ancrage de la protéine dans la membrane.

Un alignement de la séquence protéique de TTF avec d'autres séquences disponibles dans les banques de données montre que cette protéine possède des homologies avec les protéines de la super-famille Ras. TTF possède 27 % d'identité avec HRas, 30 % avec Rab1A, 43 % avec Rac1, 44 % avec RhoB, 45 % avec Cdc42Hs, et 44 % avec la protéine de levure Rho2. Le plus haut degré d'identité est retrouvé avec la protéine Cdc42Hs (45 %).

Ainsi, le gène d'une nouvelle petite protéine G appartenant à la super-famille Ras a été cloné à partir d'une translocation chromosomique, retrouvée dans une lignée cellulaire établie à partir d'un patient atteint d'un lymphome non-hodgkinien.

### **I.3 TTF appartient à la famille Rho**

L'alignement de la séquence protéique de TTF avec les séquences des autres protéines de la super-famille Ras révèle que TTF possède des séquences caractéristiques des protéines Rho telles que (Fig. R4) (Chardin, 1993) :

- (i) une insertion d'acides aminés au nombre de 5 à partir de la position 123. Chez toutes les protéines Rho, ce nombre est de 12, à l'exception de la protéine Rho2 de levure chez laquelle on retrouve une insertion de 9 acides aminés.
- (ii) une délétion d'un acide aminé entre les positions 103 et 104.

des acides aminés « Rho spécifiques » comme les Thréonines en position 18 et 25, la Valine en position 37, l'Asparagine en position 41 (site d'ADP ribosylation par la C3- ribosyl-

transférase), l'Arginine en position 121, l'Alanine en position 145 et la Cystéine en position 151.

(iv) deux séquences « Rho Spécifiques » comme Arg-Pro-Leu-Ser-Tyr (résidus 69 à 73 dans TTF) et Asp-Val (résidus 77-78 dans TTF).

La présence de toutes ces caractéristiques suggère que TTF appartient à la famille Rho à l'intérieur de la super-famille Ras.

```

1   MetLeuSerSerIleLysCysValLeuValGlyAspSerAlaValGlyLysThrSerLeu
21  LeuValArgPheThrSerGluThrPheProGluAlaTyrLysProThrValTyrGluAsn
41  ThrGlyValAspValPheMetAspGlyIleGlnIleSerLeuGlyLeuTrpAspThrAla
61  GlyAsnAspAlaPheArgSerIleArgProLeuSerTyrGlnGlnAlaAspValValLeu
81  MetCysTyrSerValAlaAsnHisAsnSerPheLeuAsnLeuLysAsnLysTrpIleGly
101 GluIleArgSerAsnLeuProCysThrProValLeuValValAlaThrGlnThrAspGln
121 ArgGluMetGlyProHisArgAlaSerCysValAsnAlaMetGluGlyLysLysLeuAla
141 GlnAspValArgAlaLysGlyTyrLeuGluCysSerAlaLeuSerAsnArgGlyValGln
161 GlnValPheGluCysAlaValArgThrAlaValAsnGlnAlaArgArgArgAsnArgArg
181 ArgLeuPheSerIleAsnGluCysLysIlePhe

```

**Figure R3** : Séquence en acides aminés de la protéine TTF. Les acides aminés nécessaires à la liaison du GTP/GDP sont soulignés. Les résidus impliqués dans la liaison et l'hydrolyse du GTP sont écrits en rouge ; ceux nécessaires à l'ancrage de la protéine dans la membrane sont représentés en bleu.

#### I.4 TTF forme un nouveau groupe à l'intérieur de la famille Rho

Afin de déterminer la position de la protéine TTF à l'intérieur de la famille Rho, un arbre phylogénétique a été réalisé. Pour cela, les séquences des 15 membres de la famille Rho ont été sélectionnées et modifiées. En effet, les séquences N-terminales (résidus 1 à 4 dans HRas) et C-terminale (à partir du résidu 165 dans HRas) de chaque protéine ont été éliminées (Valencia *et al.*, 1991). Au moment de la publication de ces travaux, l'arbre phylogénétique nous montrait que la protéine TTF formait un nouveau sous-groupe avec les protéines CRL1, Rho4 et Rho2 de levure à l'intérieur de la famille Rho (Dallery *et al.* 1995). Depuis, plusieurs nouvelles protéines ont été sous-clonées : RhoD (Shimizu *et al.*, 1997), RhoE (Foster *et al.*, 1996), Rho6/Rnd1, Rho7/Rnd2 et Rho8/Rnd3 (Nobes *et al.*, 1998). Leurs séquences ont été insérées dans notre étude. Ainsi, un nouvel arbre phylogénétique est présenté ici avec les séquences de toutes les protéines Rho de mammifères et la protéine H-Ras humaine, à l'aide du programme ClustalW (Fig. R5 page 83) (Thompson *et al.*, 1994).

La comparaison de ces séquences dans ce programme permet de définir 6 sous-familles :

- (i) les protéines Rac1, 2 et 3 avec la protéine RhoG
- (ii) les protéines Cdc42 et TC10
- (iii) les protéines RhoA, B et C
- (iv) les protéines RhoE, Rho6, 7 et 8
- (v) la protéine RhoD
- (vi) la protéine TTF qui a divergé très tôt dans l'évolution.

Cet arbre nous montre que comme la protéine RhoD, la protéine TTF forme un nouveau groupe à l'intérieur de la famille Rho.

```

H-Ras      1-----MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYRKQV
Rac1      1-----MQAIKGVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFFGEDIPTVFDNYSANV
Rac2      1-----MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFFGEYIPTVFDNYSANV
Rac3      1-----MQAIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNAFFGEYIPTVFDNYSANV
RhoA      1-----MAAIRKKLVI VGDGACGKTCLLIVFSKQDFPEVYVPTVFENYVADI
RhoB      1-----MAAIRKKLVVVDGACGKTCLLIVFSKDFPEVYVPTVFENYVADI
RhoC      1-----MAAIRKKLVI VGDGACGKTCLLIVFSKQDFPEVYVPTVFENYIADI
RhoD      1-----MNASQVAGEEAPQSGHSVKVVLVGDGGCGKTSLMMVFAKGAFFESYSPTVFERYNATL
RhoE      1-----MDPNQNVKCKI VVVGDSQCCKTALLHVFAKDCFPENYVPTVFENYTSF
RhoG      1-----MQSIKCVVVDGAVGKTCLLICYTTNAFFKEYIPTVFDNYSAQSS
Rho6/Rnd1 1-----MKERRAPQPVVARCKLVLVGDVQCCKTAMLVLAQDCYPTVYVPTVFENYTAFL
Rho7/Rnd2 1-----ME-GQSGRCKI VVVGDAECGKTAALLQVFAKDAYPGSYVPTVFENYTSF
Rho8/Rnd3 1-MKERRASQKLSKSIKIMDPNQNVKCKI VVVGDSQCCKTALLHVFAKDCFPENYVPTVFENYTSF
Cdc42     1-----MQTIKCVVVDGAVGKTCLLISYTTNKFPSEYVPTVFENYAVTV
TC10     1-----MPGAGRSSMAHGPALMLKCVVVDGAVGKTCLLMSYANDAFPEYVPTVFDHYAVSV
TTF      1-----MLSSI KCVLVGDSAVGKTSLLVRFSTSETFPEAYKPTVYENTGVDDV

H-Ras      45 VIDGETCLLDLDTAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHQYREQIKRVKDSDDV
Rac1      45 MVDGKLVNLGLWNTAGQEDYDRLRPLSYPTDVFLLICFSLVSPASFENVLAKWYPEVRHHC-PNT
Rac2      45 MVDGKLVNLGLWNTAGQEDYDRLRPLSYPTDVFLLICFSLVSPASFENVRAKWYPEVRHHC-PST
Rac3      45 MVDGKLVNLGLWNTAGQEDYDRLRPLSYPTDVFLLICFSLVSPASFENVRAKWYPEVRHHC-PHT
RhoA      47 EVDGKQVELALWNTAGQEDYDRLRPLSYPTDVFLLICFSLVSPASFENVRAKWYPEVRHHC-PNV
RhoB      47 EVDGKQVELALWNTAGQEDYDRLRPLSYPTDVFLLICFSLVSPASFENVRAKWYPEVRHHC-PNV
RhoC      47 EVDGKQVELALWNTAGQEDYDRLRPLSYPTDVFLLICFSLVSPASFENVRAKWYPEVRHHC-PNV
RhoD      59 QMKGKPVHLQIWDTAGQDDYDRLRPLFYPDANVLLLCFDVNTNPNPSFDNVSNRWYPEVTHFC-KGV
RhoE      50 EIDTQRIELSLWNTAGQEDYDRLRPLSYPTDVFLLICFSLVSPASFENVRAKWYPEVRHHC-PNT
RhoG      45 AVDGRVNLNLWNTAGQEEYDRLRPLSYPTDVFLLICFSLVSPASFENVRHKKWPEVCHHC-PDV
Rho6/Rnd1 55 ETEBQRVELSLWNTAGQEDYDRLRPLSYPTDVFLLICFSLVSPASFENVRHKKWPEVCHHC-PST
Rho7/Rnd2 49 EIDKRRIELNMWNTAGQEDYDRLRPLSYPTDVFLLICFSLVSPASFENVRHKKWPEVCHHC-PNA
Rho8/Rnd3 65 EIDTQRIELSLWNTAGQEDYDRLRPLSYPTDVFLLICFSLVSPASFENVRHKKWPEVCHHC-PNT
Cdc42     45 MIGGEPYTLGLFDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVFLLICFSLVSPASFENVRHKKWPEVCHHC-PKT
TC10     59 TVGGKQYLLGLYDTAGQEDYDRLRPLSYPTDVFLLICFSLVSPASFENVRHKKWPEVCHHC-PNV
TTF      46 FMDGIQISLGLWNTAGNDAFRSIRPLSYQQADVLLMCMYVANHNSFLNLRKKNKWIERSNL-PCT

H-Ras      110 PMVLVGNKCDLA-----ARTVESRQAQDLARSYG-IPYIETSAK-TRQGVEDAFYTL
Rac1      109 PIIILVGTKLDLRDDKDTIEKLEKELKLAIPITYPQGLAMAKEIGAVKYLECSAL-TQRGLKTVFDEA
Rac2      109 PIIILVGTKLDLRDDKDTIEKLEKELKLAIPITYPQGLALAKEIDSVKYLECSAL-TQRGLKTVFDEA
Rac3      109 PIIILVGTKLDLRDDKDTIERLRDKLAPITYPQGLAMAREIGSVKYLECSAL-TQRGLKTVFDEA
RhoA      111 PIIILVGNKDLRNDDEHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECSAK-TKDGVRVFEA
RhoB      111 PIIILVANKDLRSDEHVRTELARMKQEPVTRDDGRAMAVRIQAYDYLECSAK-TKEGVRVFEA
RhoC      111 PIIILVGNKDLRQDEHTRRELAKMKQEPVSRSEGRDMANRISAFGYLECSAK-TKEGVRVFEA
RhoD      123 PIIIVGCKIDLKDKVLVNNLRKRLPEVPTYHRGHDMAARSVGAVAYLECSAR-LHDNVEAVFQEA
RhoE      114 KMLLVGCKSDLRDTVSTLVELSNHRRPVSVDQGANMAKQIGAAITYIECSALQSENSVRDIFHVA
RhoG      109 PIIILVGTKDLRQAPDTRRLRLEKQAPITPQQGQALAKQIHAVRYLECSAL-QQDGVRVFEA
Rho6/Rnd1 119 RVLLIGCKTDLRDTLSTLMELSHQKQAPISYEQQCAIAKQLGAEIYLEGSAFTSEKSIHSIFRTA
Rho7/Rnd2 113 KVVLVGCKLDMRTDLATLRELSKQLI PVTHEQGTVLAQVGAVSVECSRSRSEERSVRDVFHVA
Rho8/Rnd3 129 KMLLVGCKSDLRDTVSTLVELSNHRRPVSVDQGANMAKQIGAAITYIECSALQSENSVRDIFHVA
Cdc42     109 PFIILVGTQIDLRDDPSTIEKLAKNKQKPIPETAEKLRDLKAVKYVECSAL-TQKGLKTVFDEA
TC10     123 PFIILIGTQIDLRDDPKTLARLNDMKEKPICVCEQKLAKEIGACCYVECSAL-TQKGLKTVFDEA
TTF      110 PVLVVATQTDQR-----EMGPHRASCVNAMEGKLLAQDVRKAGYLECSAL-SNRGVQQVFCEA

H-Ras      160 VREIRQHKLRLKLN-----PDESGPG-----CMSCKCVLS
Rac1      173 IRAVLCPPPVKKR-----KRR-----CPLL
Rac2      173 IRAVLCPPQTRQQ-----KRA-----CSLL
Rac3      173 IRAVLCPPPVKKP-----GKK-----CTVF
RhoA      175 TRAAALQARRGKK-----KSG-----CLVL
RhoB      175 TRAAALQKRYGSON-----GCIN-----CCKVL
RhoC      175 TRAGLQVRKNKR-----PRG-----CPIL
RhoD      187 AEVALSSRRHNF-----RRITQN-----CCLAT
RhoE      179 TLACVNKNTKNVKNRKSQRATKRISHMPSRPELSAVAT-DLRKDKAKSCTVM
RhoG      173 VRAVLNPTPIKR-----GRS-----CILL
Rho6/Rnd1 184 SMLCLNKPSPLPQKSPVRSLSKRLHLHPSRSE-LISS-TFKKEKAKSCSIM
Rho7/Rnd2 178 TVASLGRGHRQLRRTDSRRGMQRSALSGRPDRGNEG-EIHKDRAKSCNLM
Rho8/Rnd3 194 TLACVNKNTKNVKNRKSQRATKRISHMPSRPELSAVAT-DLRKDKAKSCTVM
Cdc42     173 ILAALPEPEPK-----SRR-----CVLL
TC10     187 IIAITPKKHTVK-----KRIGSRCI-----NCCLIT
TTF      167 VRTAVNQARRNR-----RRLFSIN-----ECKIF

```

**Figure R4** : Alignement des séquences protéiques de H-Ras et des membres de la famille Rho d'eucaryotes supérieurs.

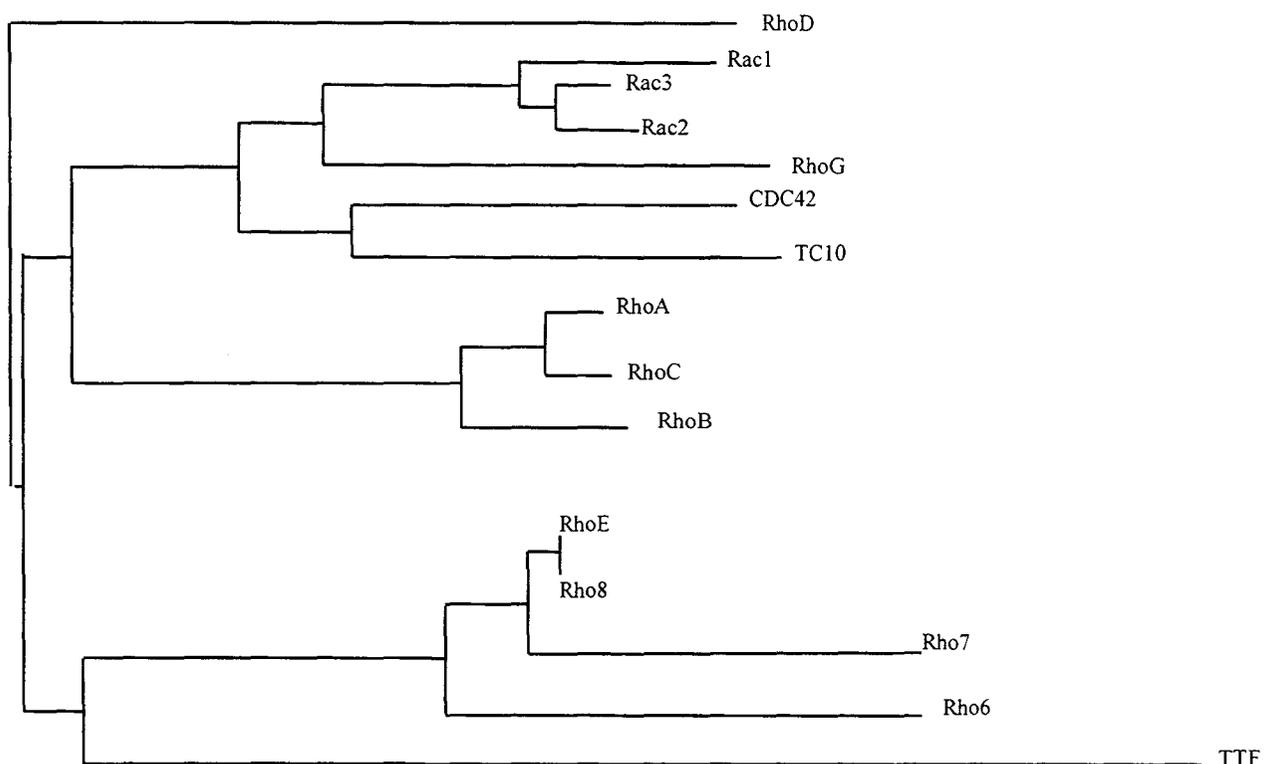
### I.5 Expression spécifique de tissu de *TTF*

Les gènes *Rho* n'ont en général pas de spécificité d'expression, les protéines correspondantes sont retrouvées dans tous les tissus à l'exception de la protéine Rac2 qui est exprimée uniquement dans les tissus hématopoïétiques (Reibel *et al.*, 1991) ainsi que 2 isoformes de la protéine Cdc42, l'une étant spécifique du cerveau (Cdc42B) et l'autre spécifique du placenta (Cdc42P) (Munemitsu *et al.*, 1990 ; Shinjo *et al.*, 1990).

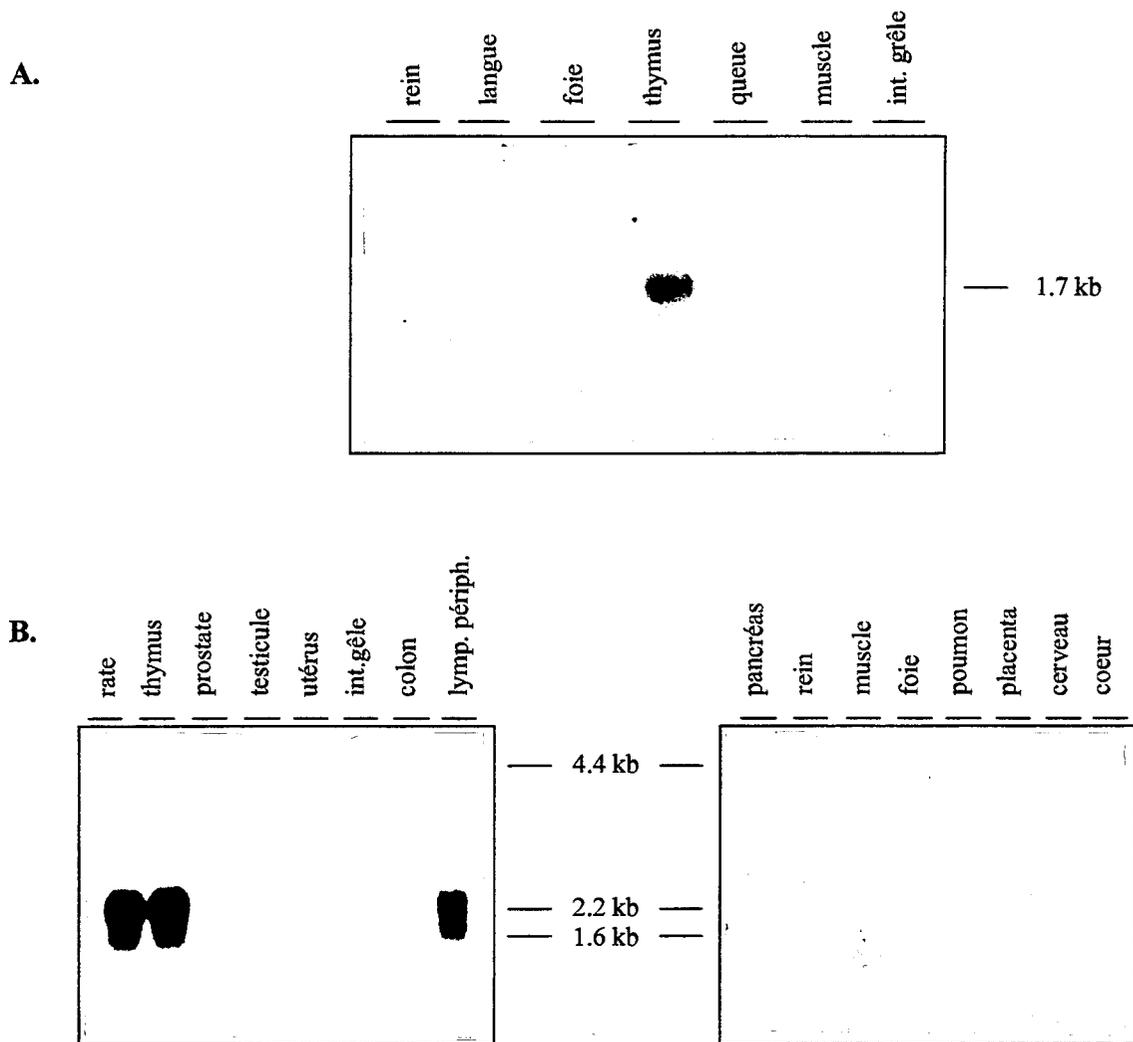
L'expression du gène *TTF* a été étudiée. Pour cela, la sonde d'ADNc Ka a été hybridée sur des *Northern Blots* préparés au laboratoire, comportant différentes lignées hématopoïétiques et non hématopoïétiques d'origine humaine. Trois *Northern Blots* multi-tissus ont également été utilisés, le premier préparé au laboratoire, contient de l'ARN d'origine murine et les deux autres comportent de l'ARNm d'origine humaine (Clontech).

Comme le montre la figure R6, le gène *TTF* s'exprime chez la souris sous la forme d'un transcrit de 1.7 kb, uniquement dans le thymus (Fig R6 A). Sur les *Northern* multi-tissus d'origine humaine, la sonde d'ADNc Ka met en évidence 2 transcrits, un mineur d'environ 4.4 kb (très légèrement visible) et un majeur de 2.2 kb, présents uniquement dans les lignées et les tissus d'origine hématopoïétique (Fig. R6 B). La présence de transcrit dans l'intestin grêle est expliquée par la colonisation de cet organe par des lymphocytes. Une troisième bande peut être observée au niveau de l'ARNm de lymphocytes circulants qui correspond à un transcrit de 1.6 kb (Fig. R6 B).

La sonde d'ADNc Ka a également été hybridée sur des *Northern Blots* préparés au laboratoire comportant de l'ARN de différentes origines (lignées cellulaires). Le tableau R1 présente toutes les lignées testées au laboratoire. Il est intéressant de noter que le gène *TTF* s'exprime uniquement dans les lignées hématopoïétiques.



**Figure R5** : Arbre phylogénétique des protéines Rho. Arbre réalisé à l'aide du programme ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) après suppression des séquences N- et C-terminales.



**Figure R6 :** Expression du gène *TTF*. *Northern Blots* multi-tissus d'origine murine (A) et d'origine humaine (B) hybridés avec la sonde d'ADNc Ka.

LIGNEES HEMATOPOÏTIQUES	Précurseur lymphoïde	REH	++
	Cellules T	HSB2	+++++
		CEM	++++
		JURKAT 193	+++
		JURKAT CD3	+++
		1301	+++
	Cellules B	REC	+
		RAJI	++++
		PRI	++
		KARPAS 422	+++
KARPAS 231		++	
VAL		++	
HO		++++	
NAMALWA		+	
Cellules Myéloïdes	HL60	-	
Cellules Erythroïdes	K 562	++	
	HEL	+	
	BV 173	++	
LIGNEES NON HEMATOPOÏTIQUES	Tumeurs : Sein	BT 20	-
		MCF7	-
		MDA-1BX231	-
		T47D	-
		HEP G2	-
		A 431	-
		Hela	-
		SA 1	-
		CaCO 2	-
		HT 29	-
	A 549	-	
	Poumon Embryonnaire	L 132	-
	Sein Normal	HBL 100	-
VHB 1		-	

**Tableau R1** : Récapitulatif de l'expression de *TTF* dans des lignées cellulaires testées au laboratoire.

## II. Etude structurale du gène *TTF*

Les fonctions biologiques et biochimiques des protéines Rho font l'objet de nombreuses études. Cependant, peu de données sont décrites dans la littérature concernant les gènes de cette famille : seules les localisations chromosomiques de RhoA (3p21), RhoB (2pter), RhoC (1p13-p21) (Cannizaro *et al.*, 1990), RhoG (11p15.5) (Worris *et al.*, 1993), Rac2 (22q12) et Rac3 (17qter) (Courjal *et al.*, 1997) sont déterminées. De même, très peu d'études sont réalisées sur la structure de ces gènes à l'exception de celle des gènes *RhoG* (Le Gallic and Fort, 1997) et *Rac2* (Courjal *et al.*, 1997).

Le nom des gènes dont la localisation chromosomique est déterminée, doit répondre à la nomenclature « HUGO », c'est pourquoi, lors de la publication de nos travaux dans la revue *Genomics* (Dallery-Prudhomme *et al.*, 1997), le comité du GDB (pour l'anglais : « *Genome Database* ») a rebaptisé le locus du gène *TTF* selon cette nomenclature sous le nom de « *ARHH* » (*ARH* pour l'anglais : « *Aplysia Related Homology* »). Le gène *ARHH* code une protéine de la famille Rho, il nous a donc été conseillé de nommer ce gène *RhoH*. Par un souci de simplicité, le gène *RhoH/TTF* (*ARHH*) sera désormais appelé ***RhoH*** tout au long de ce manuscrit.

### II.1 Localisation chromosomique du gène *RhoH*

Le gène *RhoH* étant impliqué dans la translocation (3;4), récurrente dans certains cas de lymphomes non-hodgkiniens folliculaires (Roumier *et al.*, 1997), la détermination de sa structure et de sa localisation chromosomique est importante, afin d'évaluer son implication potentielle dans de nouveaux cas. Le clonage du gène complet a été effectué (cf § A.II.2 page 87) et les clones isolés au cours de cette étude constituent un matériel d'intérêt pour la technique d'hybridation *in situ* encore appelée technique FISH (pour l'anglais : « *Fluorescence in situ Hybridization* »). Cette technique de cytogénétique moléculaire permet de localiser précisément les gènes et les points de cassure des translocations.

La technique FISH a été réalisée dans notre équipe par Christophe Roumier, qui a utilisé comme sonde un mélange de 3 des clones génomiques (cf § A.II.2 page 87) recouvrant

le locus complet (sur environ 60 kb) et permettant la localisation précise du gène *RhoH* (Dallery-Prudhomme *et al.*, 1997).

Suite à des observations de cytogénétique classique, peu précises, ce gène avait été localisé dans la région p11 du bras court du chromosome 4. L'hybridation d'une sonde constituée d'un mélange des trois clones génomiques, sur des métaphases puis des prométaphases de cellules hématopoïétiques en mitose, a permis de préciser la localisation de *RhoH* à l'intérieur de la bande 4p13. Sur la figure R7 A, on distingue 2 paires de spots verts sur le bras court du chromosome 4 près du centromère indiquant la position du gène *RhoH*. Cette position est précisée en 4p13 par l'hybridation sur prométaphase (Fig. R7 B).

La technique FISH est maintenant utilisée de façon systématique après le diagnostic d'un lymphome non-hodgkinien chez les patients dont le caryotype présente une translocation touchant le bras court du chromosome 4, afin de déterminer l'éventuelle implication du gène *RhoH* dans ces cas.

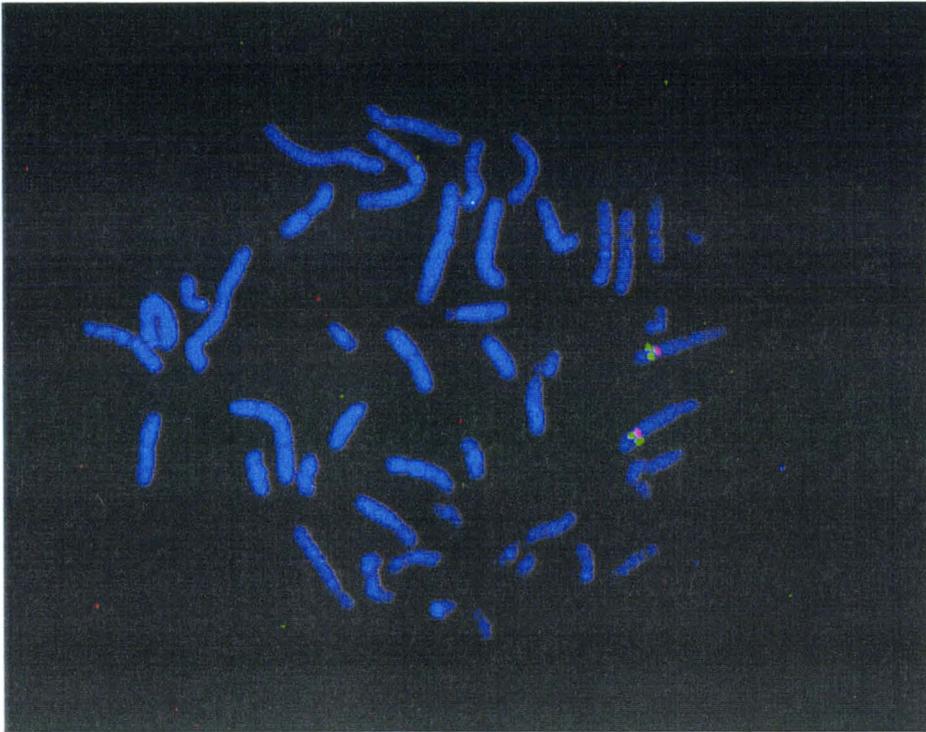
## **II.2 Caractérisation complète du locus *RhoH* et de la translocation : clonage de la région 4p13 germinale et de la jonction 3q27-4p13 du der 4**

Afin de réaliser le clonage complet du locus du gène *RhoH* et de compléter la caractérisation moléculaire de la translocation (3;4), des clones contenant des séquences germinales du locus *RhoH* ainsi qu'un clone contenant la jonction 3-4 du der 4 ont été isolés, ceci par la méthode de marche sur le chromosome. Cette technique se révèle difficile à mettre en œuvre dans ce cas, car cette région de la sous-bande 4p13 comporte de nombreuses séquences répétitives, rendant délicate la préparation de sondes spécifiques. Dans un premier temps, cette marche sur le chromosome a été réalisée à l'aide des fragments non répétitifs issus des clones génomiques isolés et, dans un deuxième temps, à l'aide de l'ADNc Ka.

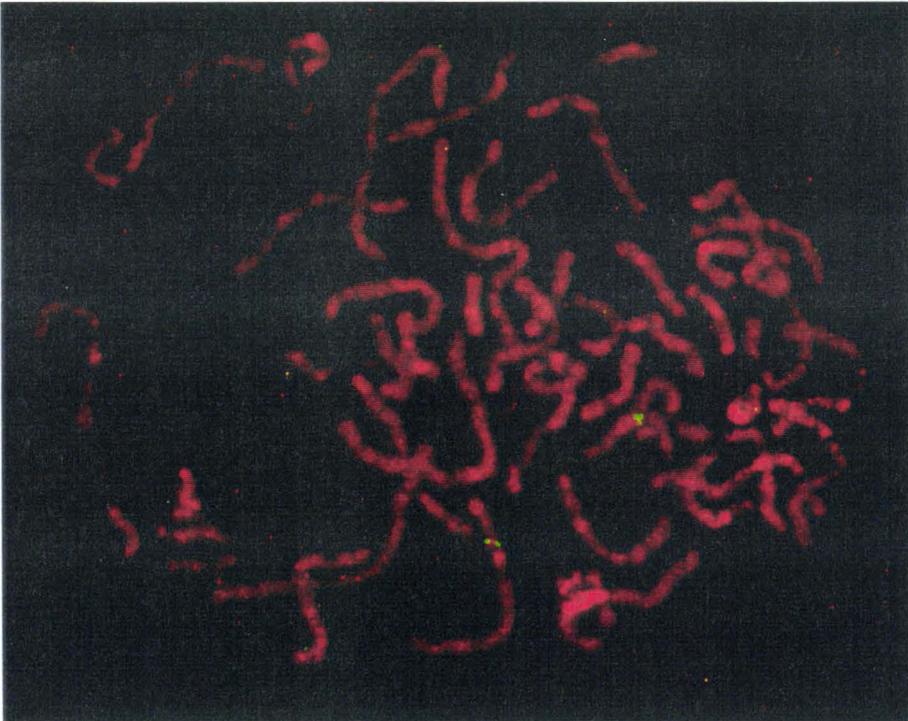
### *II.2.a Sondes génomiques*

Le fragment d'ADN génomique p515, appartenant au locus *RhoH* sur le chromosome 4, et isolé à partir du clone  $\lambda IV3$  (der 3, Fig. O1 page 72), a été le point de départ de cette marche sur le chromosome (Kerckaert *et al.*, 1993). En effet, la sonde génomique p515 a permis d'isoler plusieurs clones ( $\lambda 2V18$ ,  $\lambda 2V20$  et  $\lambda 4V3$ ) par criblage de la banque d'ADN

A.



B.



**Figure R7** : Localisation chromosomique de *RhoH*. A : FISH sur métaphase, contre-coloration au DAPI. sondes : sonde spécifique du centromère du chromosome 4 (marquée en orange) (VYSIS) ; sonde *RhoH* marquée à la biotine et détectée par l'avidine-FITC (marquage vert). B : FISH sur prométaphase, coloration à l'iodure de propidium ; sonde *RhoH* (marquée vert).

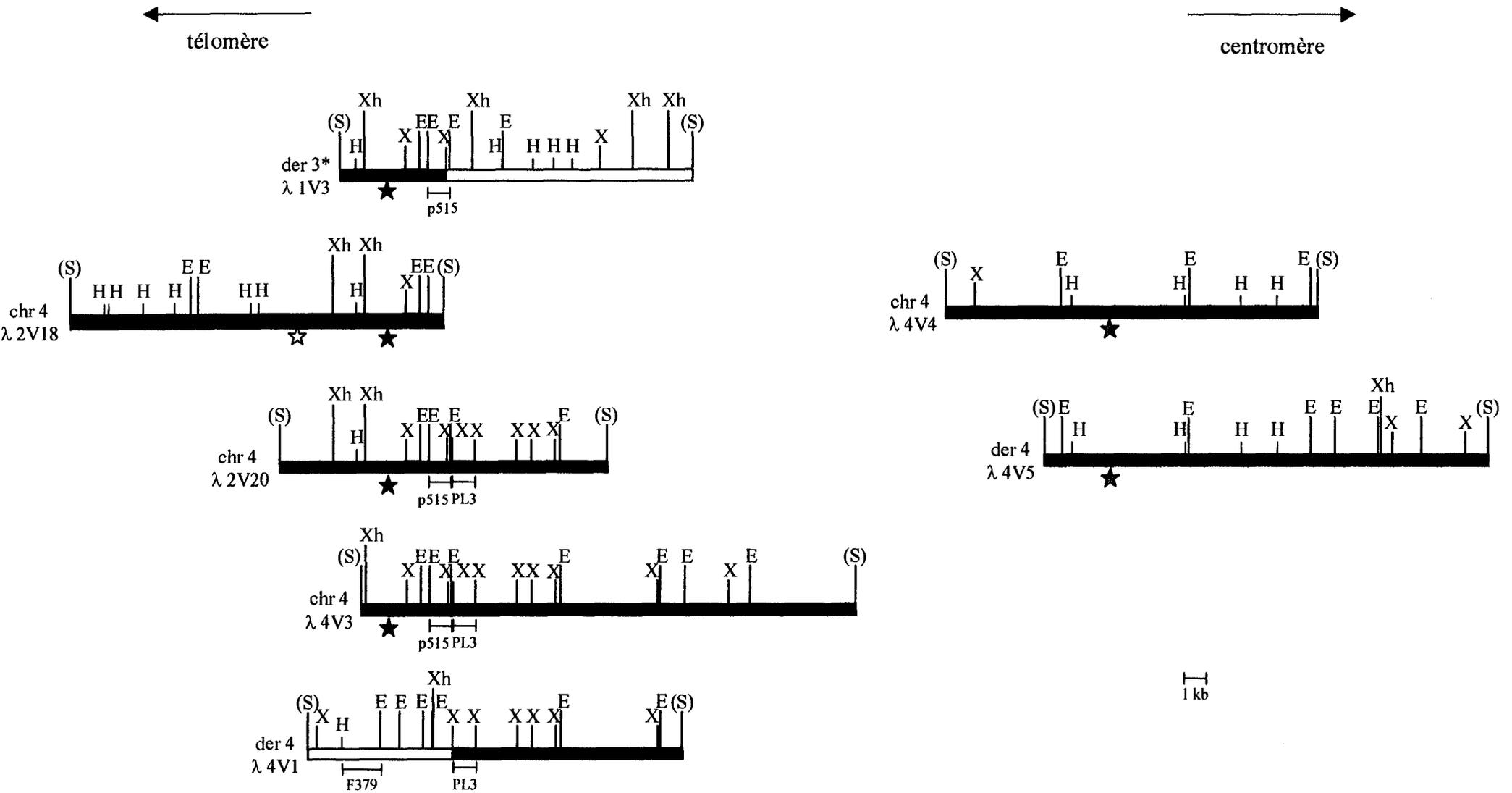
génomique VAL. Les cartes de restriction de ces clones ont été construites et alignées avec le clone  $\lambda IV3$  (Fig. R8). Leur comparaison nous montre que ces clones sont chevauchants mais qu'il existe une divergence, par rapport au clone  $\lambda IV3$ , à partir d'un site *EcoRI* correspondant à l'extrémité 3' de la sonde p515 (Fig. R8). De plus des sondes spécifiques de la région 3q27 ne s'hybrident pas avec les séquences de ces nouveaux clones. Les clones  $\lambda 2V18$ ,  $\lambda 2V20$  et  $\lambda 4V3$  sont donc spécifiques de la région 4p13.

A partir du clone  $\lambda 4V3$ , le fragment *XbaI* de 1.3 kb non répétitif (PL3) a été préparé. Cette sonde PL3, par criblage de la banque d'ADN génomique VAL, nous a permis d'isoler le clone  $\lambda 4V1$ . L'alignement de la carte de restriction du clone  $\lambda 4V1$  avec les clones précédemment isolés permet de mettre en évidence une divergence à partir d'un site *XbaI* correspondant à l'extrémité 5' de la sonde PL3 (Fig. R8). De plus, une sonde d'ADN génomique spécifique de la région 3q27, côté télomérique (F379), hybride avec certains fragments de restriction du clone  $\lambda 4V1$ , ceci montre qu'il contient la jonction 3q27-4p13 du der 4.

Le point de cassure de la t(3;4) a été positionné avec précision. Pour cela, la séquence encadrant le point de cassure sur le der4 (fragment *XbaI-XhoI* de 1.2 kb du clone  $\lambda 4V1$ ) a été déterminée après sous-clonage de ce fragment dans un plasmide (Fig. R8). La séquence du chromosome 4 germinale correspondante, a été obtenue par séquençage direct de l'ADN du phage  $\lambda 4V3$  (fragments p515, PL3 et au-delà, 2 kb en 3'). Ces séquences ont été alignées avec celles du  $\lambda IV3$  (der3) et du chromosome 3 germinale (Kerckaert *et al.* 1993). Nous avons pu déduire de cet alignement la position exacte de la jonction 3q27-4p13 (Fig. R9) dans la lignée VAL et avons également pu noter l'existence de part et d'autre du point de cassure de séquences consensus « heptamère-nonamère » reconnues dans certaines translocations par la recombinaison des immunoglobulines (Larsen *et al.*, 1994 ; Akasaka *et al.*, 1998). L'analyse des séquences nucléotidiques encadrant le point de cassure du der 4 et du chromosome 4 germinale nous a également révélé l'existence d'une délétion de 7 nucléotides au niveau du der 4.

### II.2.b. Sonde exonique

Les fragments susceptibles d'être utilisés comme sondes pour continuer la marche sur le chromosome étant tous répétitifs, la banque d'ADN génomique VAL a été criblée à l'aide de la sonde d'ADNc Ka. Cette sonde a permis d'isoler les clones  $\lambda 4V4$  et  $\lambda 4V5$ . L'analyse des



**Figure R8 :** Clonage du gène *RhoH*. Carte de restriction des clones isolés par criblage de la banque génomique VAL. Le chromosome 3 est représenté en blanc, le chromosome 4 en noir. Les enzymes de restriction sont *EcoRI* (E), *HindIII* (H), *XbaI* (X), *XhoI* (Xh), et les sites de clonage *SalI* sont figurés entre parenthèse [(S)]. Les sondes utilisées pour le criblage sont représentées par un segment sous les clones. Les étoiles correspondent à la position des « régions » exoniques (région A : étoiles blanches ; région B : étoiles noires ; régions C et D : étoiles grises).

A.

télomère  
←

chr 4 CCCCATTCCACTCTCTAGGTTATAAATATTTTTTTGGATTA  
 der 3 CCCCATTCCACTCTCTAGGTTATAAATATTTTTTTGGATTA

chr 4 AAAGCCTCCTTTAAAAAATACAAATCCACCTGGCATGTTA  
 der 3 AAAGCCTCCTTTAAAAAATACAAATTTGTAGTCGAGGGAGTC  
 chr 3 ACTTTGAAAATTATTCTTTCTTGGTTGTAGTCGAGGGAGTC

der 3 .....180 bp.....TGGCCGCTGCGGTGTTTGTATTTGGG  
 chr 3 .....180 bp.....TGGCCGCTGCGGTGTTTGTATTTGGG

der 3 CGCTGCGTGACTCTGTGTTGGCTCCCAATGGCTGTTGCCTC  
 chr 3 CGCTGCGTGACTCTGTGTTGGCTCCCAATGGCTGTTGCCTC

centromère  
→

B.

télomère  
←

chr 3 CCCTGTGTTTTGGGGAGCTTGGGGGCGGGGATGTTGAACA  
 der 4 CCCTGTGTTTTGGGGAGCTTGGGGGCGGGGATGTTGAACA

chr 3 CTTTGAAAATTATTCTTTCTTGGTTGTAGTCGAGGGAGTC  
 der 4 CTTTGAAAATTATTCTTTCTTGG-----TGGCATGTTA

chr 4 AAGCCTCCTTTAAAAAATACAAATCCACCTGGCATGTTA

der 4 .....100 bp.....GGAGCTTTGTGTATGAAAGGGATGGGCAC  
 chr 4 ... 100 bp.....GGAGCTTTGTGTATGAAAGGGATGGGCAC

der 4 AAGTCAGGATGGGGTGCACAGGTGGAGGCTGGGAGGCAGC  
 chr 4 AAGTCAGGATGGGGTGCACAGGTGGAGGCTGGGAGGCAGC

centromère  
→

**Figure R9** : Point de cassure de la translocation t(3;4)(q27;p13). Alignement des séquences génomiques encadrant le point de cassure du der3 (A) et du der4 (B) et des chromosomes 3 (en rouge) et 4 (en noir) germinaux. Représentation des séquences heptamères (jaune) et nonamères (bleu).

cartes de restriction de ces clones nous a montré qu'ils possédaient des séquences communes entre eux, mais aucune avec les clones précédemment isolés (Fig. R8 page 90). Les clones  $\lambda 4V4$  et  $\lambda 4V5$  sont plus centromériques que les clones précédemment identifiés.

Comme les parties situées en 5' des clones  $\lambda 4V4$  et  $\lambda 4V5$  ne contiennent pas de fragments non répétitifs pouvant être utilisés comme sonde, nous avons été contraints d'abandonner cette marche sur le chromosome.

### II.3 Organisation génomique de *RhoH*

La détermination de la structure des gènes appartenant à une même famille permet d'évaluer l'évolution de cette famille au cours du temps. C'est ainsi que les études effectuées sur les gènes de la famille Ras montrent que cette famille est apparue et s'est diversifiée très tôt au cours de l'évolution, car les seules structures connues, celles des gènes *K-* et *H-Ras*, *GEM*, *RhoG*, *Rac 2* et *3* sont très différentes.

L'organisation génomique partielle de *RhoH* a été déterminée à l'aide des différentes sondes correspondant aux « régions » délimitées arbitrairement dans les clones d'ADNc. Pour cela, les sondes A, B, C et D (cf § A-I-1 page 75) ont été hybridées sur les Southern Blots des différents clones génomiques de la région 4p13 (Fig. R8 page 90). Les résultats montrent que :

- la sonde A s'hybride avec le fragment *XhoI-HindIII* de 3.3 kb du clone  $\lambda 2V18$ .
- la sonde B s'hybride avec le fragment *EcoRI-SalI* de 2.7 kb du clone  $\lambda 4V3$ . Ce fragment est sous-cloné dans le pKS, et dénommé PL11.
- les sondes C et D s'hybrident avec le fragment *EcoRI* de 5.5 kb dans les clones  $\lambda 4V4$  et  $\lambda 4V5$ . Ce fragment sous-cloné dans le pKS est appelé PL34.

Des réactions de PCR ont ensuite été mises en œuvre en vue de déterminer le nombre d'exons constituant le gène *RhoH* et leur position précise sur les cartes de restriction. Le tableau R2 résume les résultats obtenus. Il précise également le couple d'amorces choisi, le type de réaction utilisé, soit une PCR classique, soit une LD-PCR (pour l'anglais : « *Long Distance-Polymerase Chain Reaction* ») et enfin la taille des produits d'amplification obtenus.

En ce qui concerne la région A, la réaction I permet la production d'un ampligène de 123 bp à partir de l'ADN génomique du clone  $\lambda 2V18$  et également à partir du clone 1cR7 (Tableau R2). Ce résultat démontre que la région A correspond à un seul exon appelé exon 1a.

Le fragment *XhoI-HindIII* du clone  $\lambda 2V18$  n'étant pas sous-cloné dans le pKS, la position de cet exon est déterminée par rapport à la position de la région B à l'aide d'une réaction de LD-PCR (réaction II) réalisée sur de l'ADN génomique (Boehringer). La taille de l'intron est estimée à 5 kb (Tableau R2, Fig. R10).

En ce qui concerne la région B, la réaction III réalisée sur le fragment d'ADNc Ka, sous-cloné dans le pKS, et sur le plasmide PL11 permet la synthèse de 2 ampligènes de même taille. Ceci prouve que la région B contient un seul exon que nous appelons exon 1b (Tableau R2).

Les réactions IV et V permettent de situer le début supposé de l'exon 1b à 1.4 kb du site *SaI* et la fin à 900 bp du site *EcoRI* (Fig. R10).

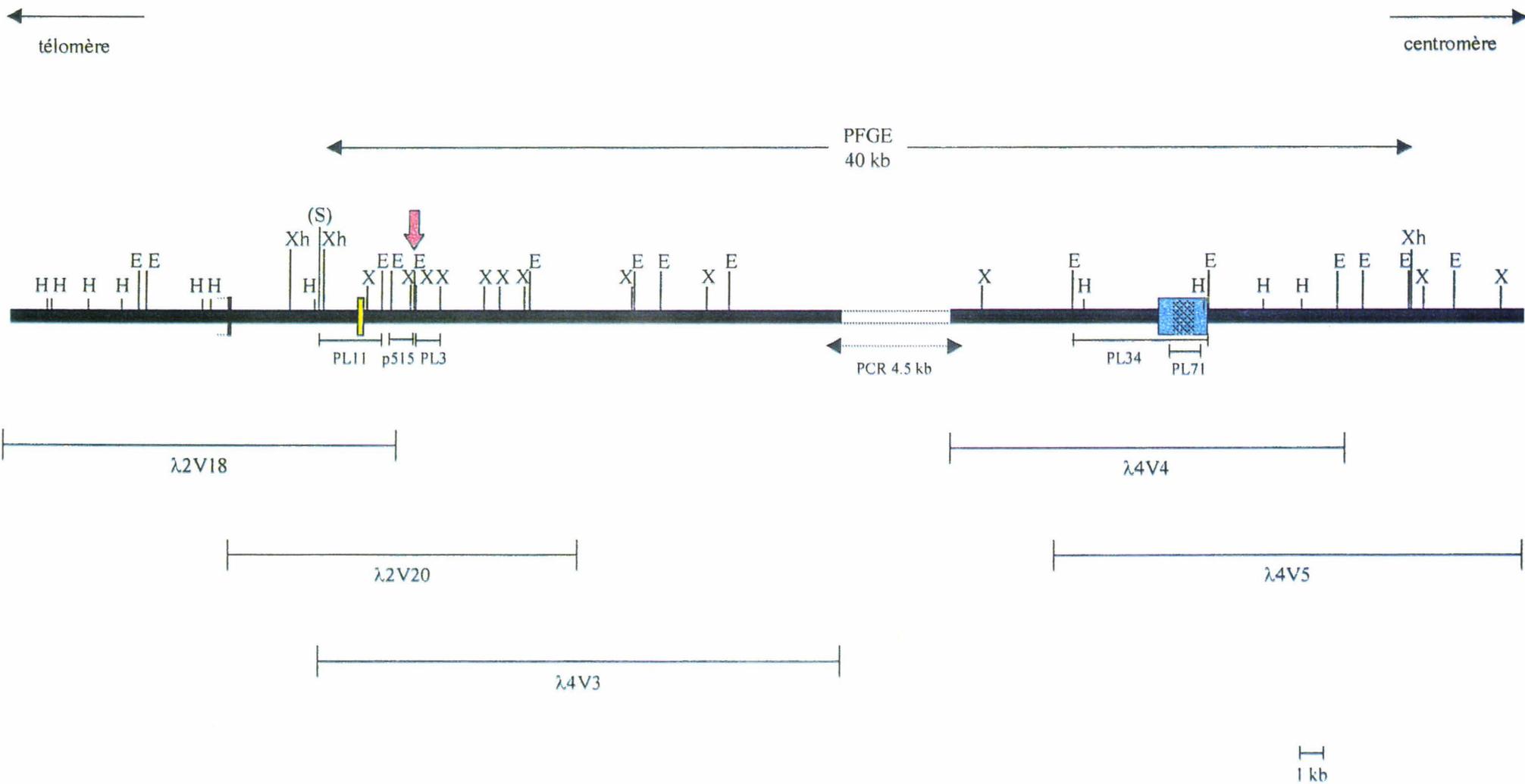
Les réactions VI et VII réalisées sur le plasmide PL34 et l'ADNc Ka permettent de démontrer que les régions C et D ne contiennent qu'un seul exon. Les régions C et D s'hybrident toutes les 2 sur le même fragment génomique (PL34), une réaction de PCR à l'aide des amorces VZ4(S), de la région C, et VZ5(AS), de la région D, est réalisée sur l'ADNc Ka et sur le PL34 (réaction VIII, Tableau R2). Les produits de PCR obtenus dans les 2 cas sont de même taille. Ceci démontre que les régions C et D correspondent à un même exon appelé exon 2.

La position de cet exon 2 est déterminée grâce aux réactions IX et X : le début est situé à 3.2 kb du site *EcoRI* le plus télomérique, et le site de polyadénylation est à 100 bp de l'autre site *EcoRI* (Fig. R10).

Afin d'estimer la taille de l'espace non cloné, et donc indirectement la taille de l'intron situé entre les exons 1b et 2, la technique d'électrophorèse en champ pulsé a été utilisée dans notre équipe. Pour cela, après digestion d'ADN génomique inclus en blocs d'agarose, par l'enzyme de restriction *XhoI* qui génère dans cette région des fragments d'ADN relativement grands, des sondes situées aux 2 extrémités de la zone étudiée ont été hybridées sur le Southern Blot correspondant : la sonde PL3, située dans les clones  $\lambda 2V18$ ,  $\lambda 2V20$  et  $\lambda 4V3$ , et la sonde PL71 située dans les clones  $\lambda 4V4$  et  $\lambda 4V5$ . Ces 2 sondes s'hybrident sur un même fragment *XhoI* de 40 kb. Des réactions de LD-PCR ont été mises en œuvre pour confirmer de

REACTION n°	TYPE	MATRICE	COUPLES D'AMORCES	ORIGINE	SEQUENCES DES AMORCES	TAILLE AMPLIGENE
I	PCR	λ2V18 et 1cR7	SZ62(S) + SZ63(AS)	région A	5'-GTG AGG CTG TGA GAT GGG AGA ATC-3'	123 bp
				région A	5'-TGC AGT GTT CAC TTC AGA GGT CCC-3'	
II	LD-PCR	ADN génomique	SZ62(S) + EK2(AS)	région A	5'-GTG AGG CTG TGA GAT GGG AGA ATC-3'	5 000' bp
				région B	5'-CCT TAC CTG TTG CAG AAT GCC GAA G-3'	
III	PCR	PL11 et ADNc Ka	SZ07(S) + EK3(AS)	région B	5'-GGT GGA CTC CCT GCC AGC CCA ACT GTT G-3'	220 bp
				région B	5'-CCT GTT GCA GAA TGC CGA AGA AAT G-3'	
IV	PCR	PL11	T3 + CV2B(AS)	pKS	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'	1 400 bp
				région B	5'-GAT GGT TGG GTT AGT GTG TGT GGG GCA G-3'	
V	PCR	PL11	T7 + CV3(S)	pKS	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'	900 bp
				région B	5'-GCC GCT TTT GTT TTC GCC TCC T-3'	
VI	PCR	PL34 et ADNc Ka	VZ4(S) + VZ16(AS)	région C	5'-TGC TTG GAT GGG CAG GGA GAA GTA ACA-3'	290 bp
				région C	5'-TCG TAC ACT GTGGCTTGTAGGCC-3'	
VII	PCR	PL34 et ADNc Ka	VZ10(S) + VZ5(AS)	région D	5'-TCAGAAGCATCCGGCCCCTGTC-3'	540 bp
				région D	5'-GGC CAA GCC TCA TCA ATA AC-3'	
VIII	PCR	PL34 et ADNc Ka	VZ4(S) + VZ5(AS)	région C	5'-TGC TTG GAT GGG CAG GGA GAA GTA ACA-3'	580 bp
				région D	5'-GGC CAA GCC TCA TCA ATA AC-3'	
IX	PCR	PL34	VZ9(S) + T7	région C	5'-GAG TGC AAG ATC TTC TAA ACC C-3'	400 bp
				pKS	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'	
X	LD-PCR	PL34	T3 + VZ2(AS)	pKS	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'	3 300 bp
				région C	5'-CTT CTA CTC CAA GAA GTG GCA AAG GCC C-3'	

**Tableau R2 :** Organisation génomique du gène *RhoH* . Récapitulatif des réactions de PCR ou de LD-PCR réalisées pour déterminer la position des exons.



**Figure R10 :** Organisation génomique partielle du gène *RhoH*. Les exons sont représentés par les boîtes : le trait vertical avec les pointillés (début de l'exon indéterminé) correspond à l'exon 1a, la boîte jaune à l'exon 1b et la boîte bleu à l'exon 2 avec la partie codante représentée par la boîte grisée. Les enzymes de restriction sont *EcoRI* (E), *HindIII* (H), *XbaI* (X), *XhoI* (Xh), et les sites de clonage *SalI* sont figurés entre parenthèse [(S)]. Les segments représentent les différents clones génomiques du locus *RhoH* utilisés pour construire cette carte. La position du point de cassure de la t(3;4) dans la lignée VAL est représentée par la flèche rouge.

façon indirecte cette distance. Des amorces situées l'une à l'extrémité 3' du clone  $\lambda 4V3$  et l'autre à l'extrémité 5' du clone  $\lambda 4V4$  ont permis d'amplifier un fragment d'environ 4.5 kb (Fig. R10) (Dallery-Prudhomme *et al.*, 1997). Ceci nous montre que le second intron a une taille d'environ 30 kb.

Les jonctions exon-intron du gène *RhoH* ont été déterminées par séquençage, soit de l'ADN génomique sous-cloné dans le pKS, ce qui est le cas du PL11 et du PL34 pour les exons 1b et 2, respectivement ; soit à partir de l'ADN génomique inséré dans le phage  $\lambda 2V18$  pour l'exon 1a. Ces jonctions sont représentées sur la figure R11.

L'étude de l'organisation génomique de *RhoH* nous a permis de mettre en évidence que la translocation t(3;4)(q27;p13) ne provoque pas la formation de protéine de fusion. En effet, le point de cassure dans le gène *RhoH* est situé bien en amont de l'exon 2 contenant la partie codante (Fig. R10), et sur le gène *LAZ3*, le point de cassure est également localisé en amont de l'exon 2, la partie codante de ce gène se situant dans les exons 3 à 10. Cette translocation a donc pour conséquence l'échange des séquences régulatrices de chaque gène (Dallery *et al.*, 1995).

L'orientation du gène *RhoH* : télomère-5'-3'-centromère est déterminée par rapport à celle du gène *LAZ3/BCL6* dans la translocation (3;4)(q27;p13).

Cette étude nous montre que :

- (i) le gène *RhoH* impliqué dans la translocation (3;4)(q27;p13) code une protéine de la famille Rho. La construction d'un arbre phylogénétique nous permet de préciser que la protéine RhoH constitue un nouveau groupe à l'intérieur de cette famille;
- (ii) l'organisation génomique du gène *RhoH* est différente de celles de la majorité des autres gènes de la super-famille Ras, mais proche de celle du gène *RhoG* (Courjal *et al.*, 1997) ;
- (iii) le gène *RhoH* a une spécificité d'expression hématopoïétique ;
- (iv) la translocation (3;4)(q27;p13) dans la lignée VAL provoque la fusion des gènes *RhoH* et *LAZ3/BCL6*, sans entraîner la formation de protéine de fusion.

	<b>Exon 1a</b>	<b>(&gt;130 bp)</b>		Taille de l'intron ~ 5 kb
.....TGGGACCTCTGAAGTGAACACTGCAGGGCCATTTG			gtgagtgtgctctggc	
	<b>Exon 1b</b>	<b>(249 bp)</b>		~ 30 kb
attcggattgctcctg	CTGCCCCACA.....TCTGCAACAG		gtaaggattttgcttc	
	<b>Exon 2</b>	<b>(1250 bp)</b>		
ttcttgtttcttgag	TTTCCAACAT.....AAATAGTCTCCATAA			

**Figure R11** : Séquences des jonctions exon-intron du gène *RhoH*. Les introns sont représentés en minuscule, les exons en majuscule.

## **B. RECURRENCE DES ANOMALIES EN 4p13 IMPLIQUANT LE GENE *RHOH* DANS LE LNH ET LE MYELOME MULTIPLE**

Le gène *RhoH* a été cloné à partir de la translocation chromosomique (3;4)(q27;p13) retrouvée dans la lignée cellulaire VAL, établie à partir d'un patient atteint d'un LNH. Comme cela est le cas pour toute anomalie chromosomique associée à une pathologie, nous nous sommes posés la question de la récurrence de ce réarrangement en 4p13 impliquant le gène *RhoH*. Ceci est réalisé sur des patients présentant une anomalie en 4p13, principalement à l'aide de la technique de FISH, et pour les patients dont nous disposons de suffisamment de matériel, les techniques de *Northern Blot* et de RT-PCR ont également été utilisées. Comme dans le cas de la détermination de la localisation chromosomique du gène *RhoH*, ces expériences de FISH ont été réalisées par Christophe Roumier.

### **I. Etude de la récurrence des anomalies en 4p13 par la technique FISH**

L'analyse cytogénétique a permis de mettre en évidence des réarrangements de la bande 4p11-13 chez 5 patients : 4 d'entre eux (patients 1 à 4), atteints de LNH folliculaire, présentent une t(3;4)(q27;p13), et le patient 5, atteint de myélome multiple, possède une anomalie unique : une t(4;14)(p13;q32). Les caryotypes de ces patients (cf tableau M1 page) montrent que la t(3;4)(q27;p13) y est toujours associée à la t(14;18)(q32;q21), anomalie primaire caractéristique de ce type de LNH (cf Généralités, § I.2 : le gène *BCL2*), et à d'autres anomalies secondaires.

#### **I.1 Réalisation de la technique FISH sur les patients présentant une t(3;4)(q27;p13)**

Pour la détection du gène *RhoH*, nous avons employé la même sonde que celle utilisée lors de l'étude de la localisation chromosomique du gène ; cette sonde (marquée en vert) est constituée d'un mélange des 3 phages  $\lambda$ 2V18,  $\lambda$ 4V3 et  $\lambda$ 4V5, isolés par criblage de la banque d'ADN génomique VAL. Une sonde spécifique du centromère du chromosome 4 (marquée en orange) et une spécifique du centromère du chromosome 3 (marquée en vert) ont également été utilisées. Afin de contrôler l'efficacité de la technique, des tests de cohybridation ont été

effectués sur des chromosomes en métaphase, de lymphocytes normaux et de la lignée VAL qui possède la  $t(3;4)(q27;p13)$  (non montré). Sur les lymphocytes des patients 1 à 4, la cohybridation des 3 sondes révèle que le signal du gène *RhoH* en 4p13 se scinde en 2 : une partie reste sur le bras court du chromosome 4 et l'autre partie est retrouvée sur le bras long du chromosome dérivé 3 (Fig. R12 A). Au moins 10 métaphases avec des signaux anormaux ont été observées pour chaque patient. Une autre expérience de FISH a été réalisée avec une sonde fluorescente du gène *LAZ3/BCL6* (Roumier *et al.*, 1999, sous presse) et dans les 4 cas nous observons un réarrangement de ce gène (non montré).

### **I.2. Réalisation de la technique FISH sur le patient présentant une $t(4;14)(p13;q32)$**

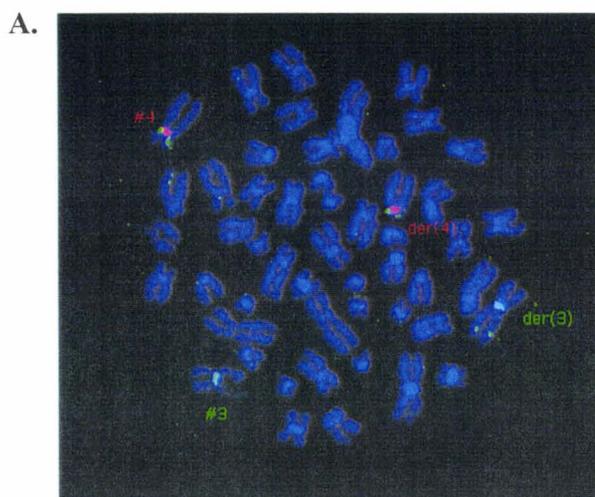
Dans ce cas, la sonde *RhoH* (marquée en vert) est cohybridée avec une sonde spécifique du centromère du chromosome 4 (marquée en orange) et une sonde marquant le centromère du chromosome 14 (fluorochrome rouge) sur des chromosomes en métaphase du patient 5. La figure R12 B nous montre que le chromosome dérivé 14 présente 2 spots verts correspondant à la sonde *RhoH* qui est scindé.

Afin de confirmer l'implication du chromosome 14 dans cette translocation, la sonde reconnaissant le centromère du chromosome 14 s'hybridant également sur le centromère du chromosome 22, une expérience de « peinture du chromosome 14 » (*painting* en anglais, signal orange) a été réalisée. Le résultat obtenu confirme l'échange de matériel entre le chromosome 4 et le chromosome 14 (Fig. R12 C).

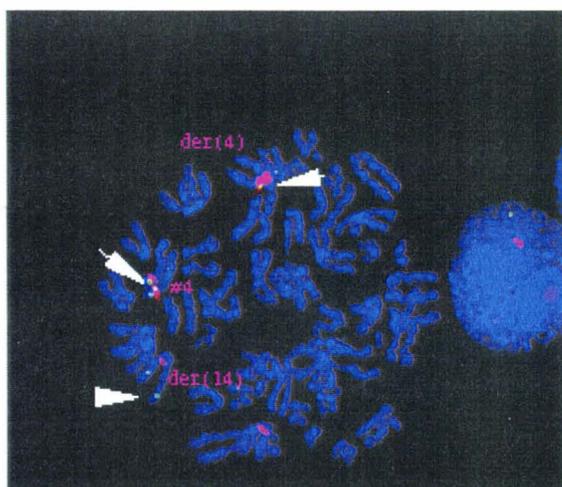
## **II. Etude de la fusion des gènes *RhoH* et *LAZ3* par *Northern Blot* et RT-PCR, chez certains patients**

Cette étude moléculaire n'a été possible que pour 2 patients (patients 1 et 3) pour lesquels nous possédions de l'ARN en quantité suffisante. Les lignées Raji et VAL ont été utilisées comme contrôles négatif (Raji) et positif (VAL).

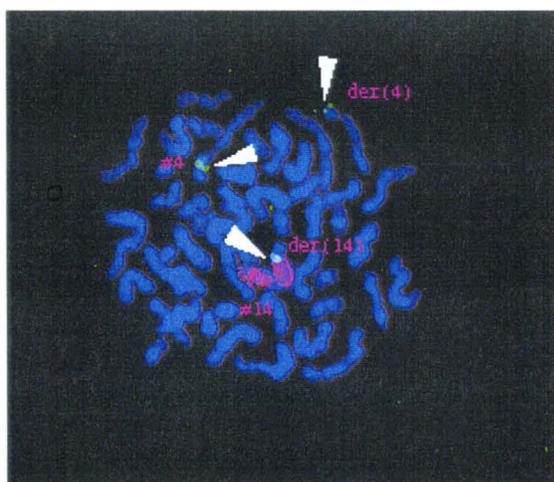
Nous recherchons d'abord la présence de transcrits de fusion des gènes *RhoH* et *LAZ3/BCL6* à l'aide de la technique de RT-PCR qui permet de détecter la production de ces transcrits à partir des 2 chromosomes dérivés der 3 et der 4. Dans le patient 1, nous avons mis



B.



C.



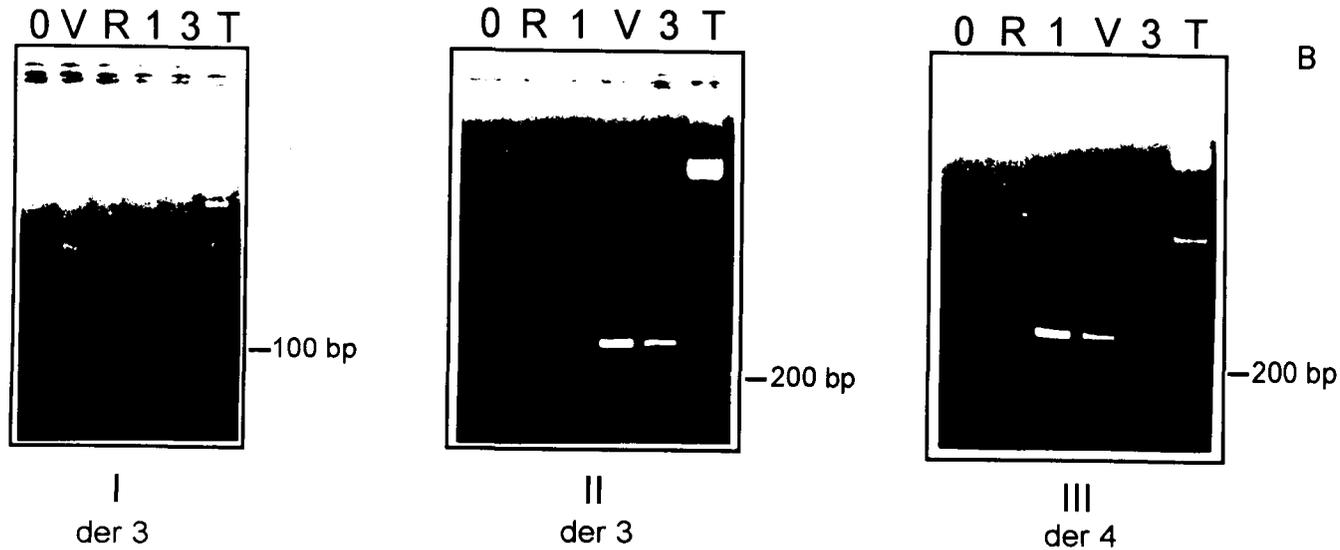
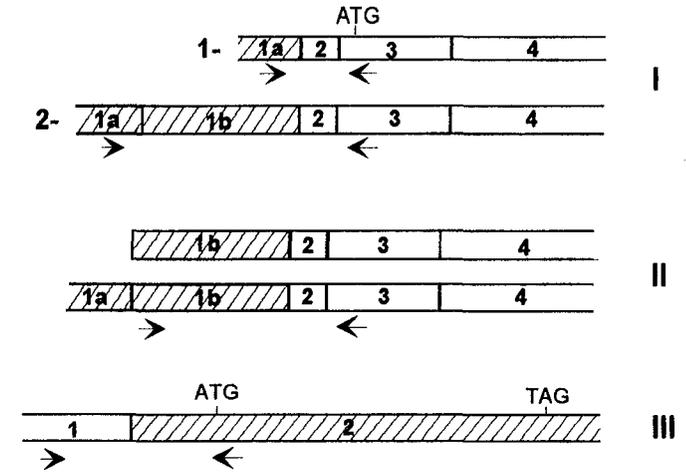
**Figure R12** : FISH sur métaphase des patients présentant une  $t(3;4)$  (A) et une  $t(4;14)$  (B et C) ; contre-coloration au DAPI. Sondes utilisées en A : sonde *RhoH* marquée à la biotine et révélée par l'avidine-FITC (marquée en vert) ; sondes spécifiques du centromère du chromosome 4 (marquée en orange) et du centromère du chromosome 3 (marquée en vert). Sondes utilisées en B : sonde *RhoH* ; sondes spécifiques du centromère du chromosome 4 (marquée en orange) et du centromère du chromosome 14 (marquée en rouge). Sondes utilisées en C : sonde *RhoH* ; sonde spécifique du bras long du chromosome 14 (marqué en orange).

en évidence la présence de 2 transcrits de fusion : (i) un transcrit *RhoH(1a)-LAZ3* contenant une jonction exonique fusionnant l'exon 1a de *RhoH* à l'exon 2 de *LAZ3* (Fig. R13, essai I, produit 1) et (ii) un transcrit réciproque *LAZ3-RhoH* correspondant à la fusion des séquences régulatrices de *LAZ3* (exon 1a) avec l'exon 2 de *RhoH*, contenant toute la partie codante (Fig. R13, essai III). Ce transcrit réciproque est également présent dans la lignée VAL mais est absent chez le patient 3. Chez ce patient 3, un autre transcrit, *RhoH(1a-1b)-LAZ3* a été identifié, fusionnant les exons 1a et 1b de *RhoH* avec l'exon 2 de *LAZ3* (Fig. R13, essai I, produit 2). Ce transcrit est retrouvé dans la lignée VAL mais est absent chez le patient 1. Ceci montre qu'il existe une hétérogénéité dans l'expression des transcrits de fusion chez les différents patients et la lignée VAL.

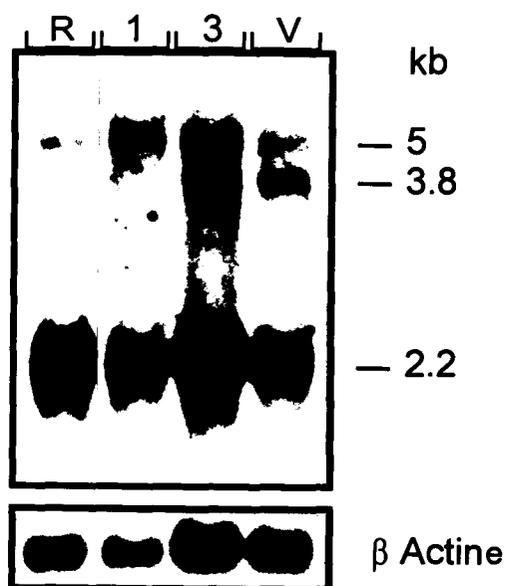
L'hybridation de la sonde d'ADNc Ka, contenant les exons 1b et 2, sur un *Northern Blot* d'ARN totaux des patients n°1 et 3 et des lignées cellulaires Raji et VAL a mis en évidence la présence du transcrit majeur de 2.2 kb de *RhoH* (Fig. R14). Un autre transcrit de 3.8 kb (de même taille que le transcrit de *LAZ3*) a été détecté chez le patient n°3 ainsi que dans la lignée VAL. En accord avec les données de RT-PCR, ce dernier pourrait correspondre au transcrit *RhoH(1b)-LAZ3* (ou au transcrit *RhoH(1a-1b)-LAZ3*) (exon 1a de *RhoH* : 133 bp au minimum, exon 1b de *RhoH* : 250 bp, exon 1a de *LAZ3* : 550 bp).

Cette étude nous a permis de montrer que le gène *RhoH* est réarrangé de façon récurrente dans les LNH folliculaires et le myélome multiple.

Couples d'amorces	Transcrits de fusion	Amplification (bp)	Raji	VAL	1	3
I- SZ60-PC8	der 3 :					
	1- <i>RhoH(1a)</i> -LAZ3 2- <i>RhoH(1a-1b)</i> -LAZ3	150 350	- -	+ +	+ -	+ +
II- CV1-PC8	der 3 :					
	<i>RhoH(1b)</i> -LAZ3 ou <i>RhoH(1a-1b)</i> -LAZ3	320	-	+	-	+
III- SZ17-SZ18	der 4 :					
	LAZ3- <i>RhoH</i>	274	-	+	+	-



**Figure R13** : Analyse par RT-PCR de la t(3;4). Les réactions de RT-PCR ont été réalisées pour les patients 1 et 3, les lignées Raji (contrôle négatif) et VAL (contrôle positif). A : représentation schématique des différents transcrits de fusion *RhoH-LAZ3* et *LAZ3-RhoH* avec un tableau indiquant la taille de produits de PCR obtenus. Les boîtes hachurées correspondent aux exons de *RhoH* et les boîtes blanches aux exons *LAZ3*. B : migration électrophorétique des 3 différents essais de RT-PCR. 0 : sans ARN, R : lignée Raji, 1 : patient 1, V : lignée VAL, 3 : patient 3.



**Figure R14** : Analyse par *Northern Blot* de la t(3;4). Hybridation de la sonde d'ADNc Ka sur l'ARN des lignées Raji et VAL et des patients 1 et 3. L'expression de l'actine est testée afin d'évaluer la qualité et la quantité d'ARN.

## C. LA PROTEINE RHOH

De nombreuses études sont réalisées sur les protéines Rho. Ces protéines par leur implication dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, qu'elles ont un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires. Elles sont également impliquées dans la transduction du signal nécessaire à la régulation de la prolifération cellulaire et de l'expression des gènes, et dans la transformation cellulaire.

En ce qui concerne l'étude de la protéine RhoH, nous avons mis en évidence sa localisation subcellulaire et avons entrepris la production d'une protéine RhoH recombinante et d'un anticorps spécifique, ceci en vue de l'étude de certaines de ses fonctions biochimiques et biologiques.

### I. Localisation subcellulaire

Les protéines GAP, GEF et GDI régulent l'activité des protéines Rho en contrôlant leur cycle GTP/GDP. Au cours de ce cycle, suite au remplacement de la molécule de GDP par le GTP, les protéines sont transloquées du cytoplasme vers la membrane. Toutes les protéines Rho se situent au niveau de la membrane interne de la cellule à l'exception de RhoB qui est localisée au niveau des endosomes précoces et des compartiments pré-lysosomiaux (Adamson *et al.*, 1992).

L'étude de la localisation subcellulaire de RhoH a été réalisée au Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, en collaboration avec le Docteur P. Chavrier, à l'aide d'un système d'expression transitoire des formes sauvage (RhoH-Wt), supposée activée (RhoH-L62) et supposée dominante négative (RhoH-N18) de RhoH. Les conséquences des mutations réalisées dans la partie codante de RhoH n'ayant jamais été étudiées, nous supposons que les formes mutées sont, soit constitutivement actives, soit dominante négative. Le vecteur d'expression utilisé permet l'expression de protéines comportant, en N-terminal, l'épitope de la glycoprotéine du VSV (pour l'anglais : « *Vesicular Stomatitis Virus* ») reconnu par l'anticorps monoclonal anti-VSVG (clone P5D4, Sigma). L'expression des protéines VSVG-RhoH-Wt, -L62 et -N18 est ainsi visualisée par réaction d'immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un dérivé de la fluorescéine (FITC pour

l'anglais : « *Fluoresceine Isothiocyanate* ») qui reconnaît l'anticorps anti-VSVG. Afin de mettre en évidence un rôle potentiel de la protéine RhoH sur l'organisation du cytosquelette, les filaments d'actine sont mis en évidence par la phalloïdine couplée au Texas-Red. Le double signal est analysé en microscopie confocale.

La localisation subcellulaire de RhoH a été étudiée dans 3 lignées cellulaires différentes : les cellules épithéliales HeLa (non montré) et BHK et les basophiles de rat (RBL-2H3). Dans les cellules BHK, la sur-expression de la protéine RhoH-Wt et RhoH-L62 induit la formation de vésicules à la périphérie des cellules, phénomène appelé « *blebbing* » en anglais (Fig. R15 A, B). Les protéines RhoH-Wt et RhoH-L62 sont localisées au niveau de la membrane plasmique et dans le cytoplasme de ces cellules et colocalisent avec les filaments d'actine dans les vésicules à la périphérie (Fig. R15 A, B). La sur-expression de la protéine RhoH-N18 ne provoque pas ce phénotype, mais la protéine mutée supposée dominante négative est également retrouvée au niveau de la membrane plasmique et dans le cytoplasme (Fig. R15 C).

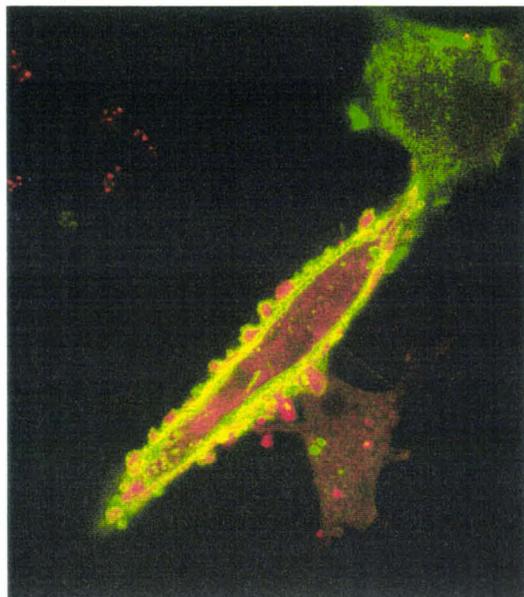
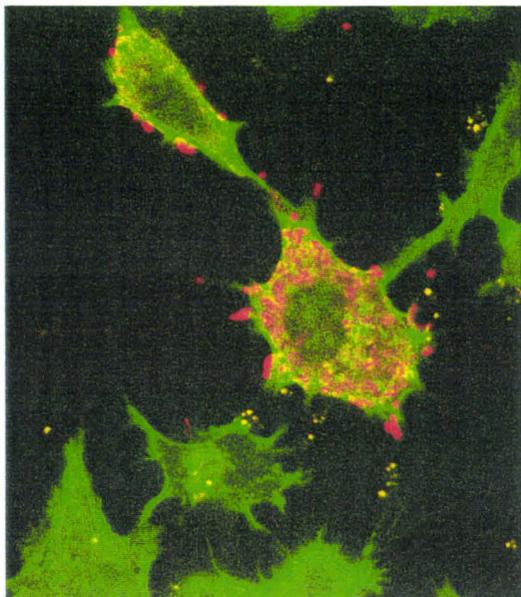
Les cellules hématopoïétiques semi-adhérentes RBL-2H3 exprimant RhoHL62 présentent un réseau d'actine ponctué en leur centre (Fig. R16). De plus, ces cellules sont plus grandes et plus étalées que les cellules n'exprimant pas RhoH. Dans ce type cellulaire, la protéine RhoH possède également une localisation membranaire et cytoplasmique.

Ainsi, la sur-expression de la protéine RhoH provoque la réorganisation du cytosquelette d'actine.

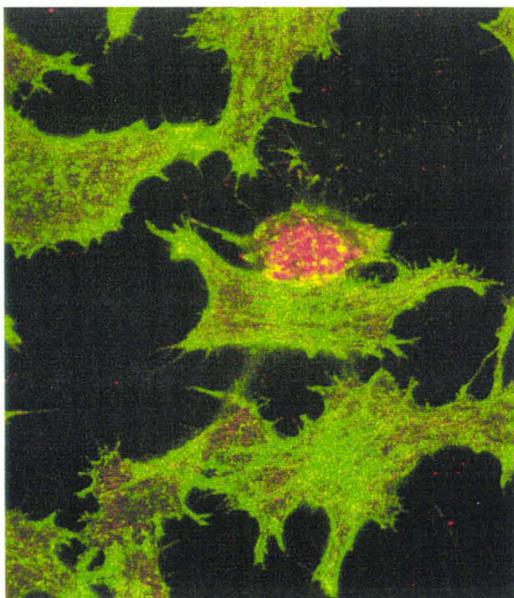
## II. Production de la protéine RhoH

Les protéines Rho ont une activité GTPasique intrinsèque et sont capables d'échanger la molécule de GDP fixée par une nouvelle molécule de GTP. Ces activités sont plus ou moins élevées et elles sont stimulées par les protéines GEF, GDI et GAP. En général, l'étude de ces propriétés est réalisée *in vitro*, à l'aide de protéines recombinantes produites en système procaryote sous forme de protéine de fusion avec la GST. Ces protéines recombinantes peuvent également être utilisées pour la micro-injection des cellules eucaryotes afin d'étudier leurs fonctions biologiques (Paterson *et al.*, 1990 ; Ridley and Hall, 1992 ; Ridley *et al.*, 1992 ; Kozma *et al.*, 1995 ; Nobes and Hall, 1995). Et enfin la recherche de protéines

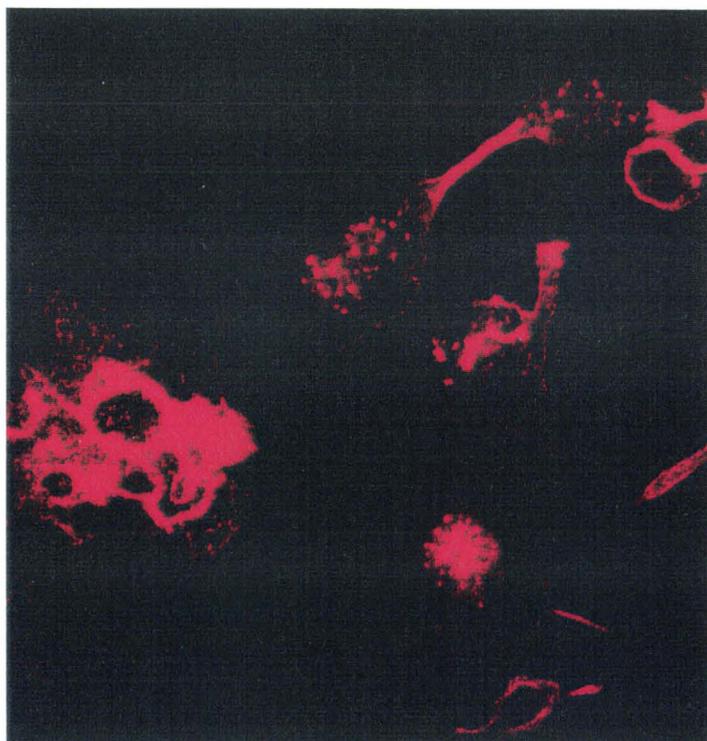
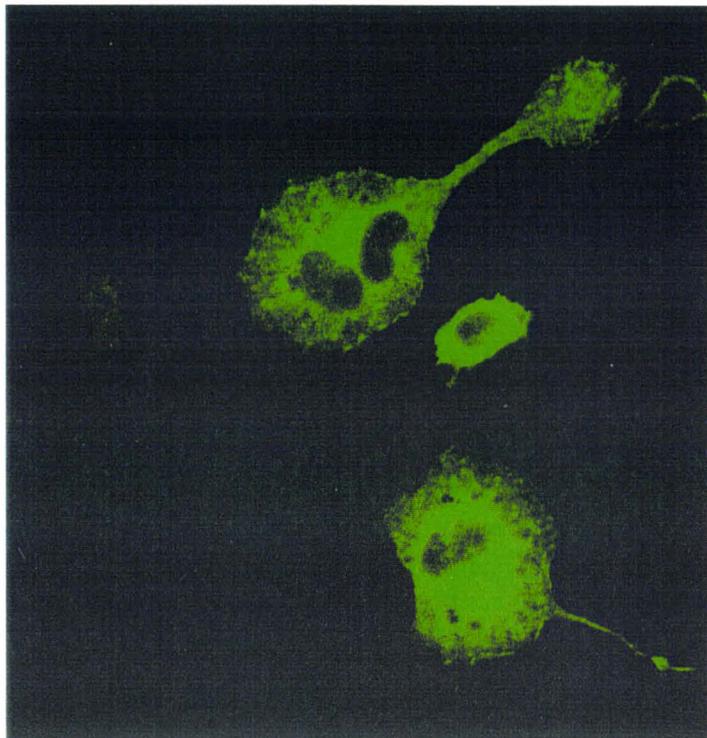
B.



C.



**Figure R15** : Localisation subcellulaire de la protéine VSVG-RhoH dans les cellules épithéliales BHK. En vert : anti-VSVG qui détecte les protéines VSVG-RhoH-Wt (A), VSVG-RhoH-L62 (B) et VSVG-RhoH-N18 (C). En rouge : les filaments d'actine (A, B, C).



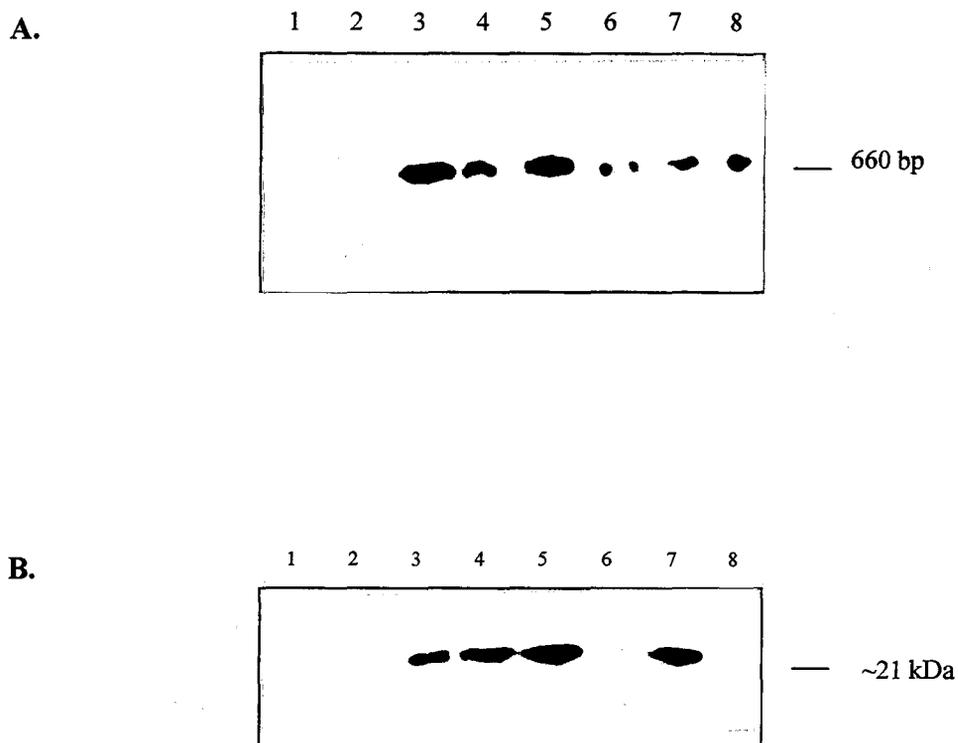
**Figure R16** : Localisation subcellulaire de la protéine VSVG-RhoH dans les cellules RBL-2H3. A : anti-VSVG (clone P5D4) ; B : phalloïdine.

interagissant avec les protéines Rho peut être réalisée en criblant des banques d'expression à l'aide de ces protéines radio-marquées.

La production de la protéine RhoH recombinante a été engagée à l'aide de différents vecteurs d'expression procaryote (pGEX-2T, pET-11a). Cependant, en accord avec l'équipe de Settleman aux Etats-Unis (Settleman, communication personnelle), nous avons constaté que la protéine RhoH n'était pas exprimée dans les bactéries recombinantes. Le système « baculovirus » (« *BacPAK Baculovirus Expression System* » commercialisé par Clontech) a donc été utilisé. Ce système a comme avantage l'utilisation de cellules eucaryotes (cellules d'insectes SF9) qui possèdent le système enzymatique nécessaire à la modification post-traductionnelle des protéines, contrairement aux cellules procaryotes.

La production de la protéine RhoH recombinante a pour but d'étudier son activité GTPasique, d'étudier les conséquences des mutations en position 62 et 18 sur cette activité GTPasique et de rechercher les protéines interagissant avec elle, par criblage d'une banque d'expression. Ceci nécessitait l'utilisation d'une protéine radio-marquée ; c'est pourquoi, nous avons choisi d'insérer en N-terminal de la protéine VSVG-RhoH, un domaine de phosphorylation (domaine K) par la sous-unité catalytique d'une protéine kinase AMPc dépendante (Kaelin *et al.*, 1992). Ceci a été réalisé pour chaque forme de protéine : nous avons ainsi construit les vecteurs pBacPAK9 contenant les phases codantes des protéines K-VSVG-RhoH-Wt, K-VSVG-RhoH-N18 et K-VSVG-RhoH-L62.

L'utilisation de virus implique de nombreuses précautions lors de leur manipulation. Afin d'éviter tous problèmes de contamination entre les virus recombinants, les différentes protéines doivent être produites séparément. Dans un premier temps, la protéine K-VSVG-RhoH-L62 a été préparée. Pour cela, les cellules d'insectes SF9 ont été co-transfectées avec le vecteur pBacPAK9-K-VSVG-RhoH-L62 et de l'ADN de baculovirus linéarisé (BacPAK6-*BsuI*). Six clones de baculovirus (B<sub>1</sub>L62 à B<sub>6</sub>L62) ont été isolés à l'aide de la technique d'isolement en gel d'agarose. La purification de l'ADN de cellules infectées par les différents clones a permis de vérifier la présence de l'ADNc codant la protéine K-VSVG-RhoH-L62 à l'aide de la technique de *Southern Blot* en utilisant l'ADNc Ka comme sonde (Fig. R17 A).



**Figure R17** : Expression de protéines recombinantes dans les cellules d'insectes SF9.  
Southern Blot : 1, cellules non infectées ; 2, cellules infectées avec le virus parental, 3-8, cellules infectées avec les clones viraux B<sub>1</sub>L62 à B<sub>6</sub>L62. (B) Western Blot : 1, cellules non infectées ; 2, cellules infectées avec le virus parental, 3-8, cellules infectées avec les clones viraux B<sub>1</sub>L62 à B<sub>6</sub>L62.

Dans un deuxième temps, la technique de *Western Blot* a permis de vérifier la production de protéines par ces cellules. Cette production est visualisée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-VSVG (Fig. R17 B).

Le clone B<sub>1</sub>L62 a été amplifié et a ensuite été utilisé pour produire une grande quantité de protéines. Pour diverses raisons (problème de contamination bactérienne ou parfois contamination des cellules souches par les virus sauvages), cette production a pris du retard et nous ne sommes pas en mesure de vous présenter les résultats obtenus avec cette protéine dans ce manuscrit. La purification est poursuivie par notre équipe en collaboration avec le Docteur P. Lefebvre de l'Unité 459 INSERM de Lille, à l'aide de la technique de FPLC selon le protocole décrit par l'équipe de Takai (Mizuno *et al.*, 1991).

### **III. Production d'un anticorps spécifique de la protéine RhoH**

L'étude des fonctions des protéines Rho est en général basée sur la sur-expression de protéines couplées à un épitope, ce dernier permettant de vérifier la production de la protéine d'intérêt par réaction immunologique spécifique. Afin de palier aux problèmes causés par la sur-expression de la protéine, l'anticorps spécifique représente un outil d'étude intéressant. De plus, dans notre cas, cet anticorps nous permettrait en particulier une l'expression de la protéine RhoH dans les cellules des patients présentant un réarrangement en 4p13 impliquant le gène *RhoH*.

#### **III.1 Le choix du peptide**

Les séquences primaires des protéines Rho sont divisées en 5 domaines : la partie N-terminale, le domaine de liaison du phosphate, le domaine de liaison de la guanine, le domaine C terminal et enfin la séquence CAAX (Fig. G1 page 21). Le domaine le moins conservé est le domaine C terminal. Les anticorps spécifiques des protéines RhoA et RhoB sont dirigés vers ce domaine (résidus 119-132) (Adamson *et al.*, 1992).

Dans un premier temps, nous avons choisi un peptide recouvrant tout ce domaine (résidus 103 à 147). Après production du peptide chez *E. coli* et purification par électro-élution, nous avons confié la production d'anticorps à la société Eurogentec. Les anticorps

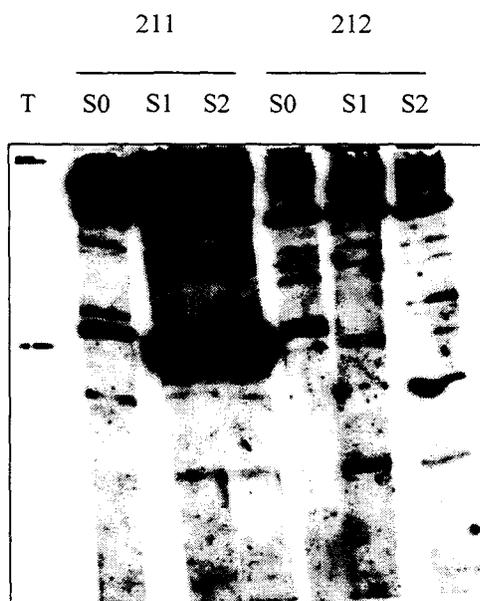
produits n'étaient pas spécifiques, ceci étant certainement dû à la taille trop importante du peptide choisi.

Afin d'obtenir un anticorps spécifique de la protéine RhoH, nous avons donc sélectionné un autre peptide de 15 acides aminés (résidus 121 à 135 : REMGPHRASCVNAME) à l'intérieur de ce domaine C terminal à l'aide du programme SCAN PROT. L'antigénicité de ce peptide a été vérifiée à l'aide du programme EPIPLOTE. Ce peptide de synthèse a été utilisé pour l'immunisation de 2 lapins (référéncés 211 et 212) en collaboration avec le Docteur D Lefrancq.

### **III.2 Analyse de la production d'anticorps**

La production d'anticorps a été testée sur des lysats de cellules SF9 exprimant la protéine K-VSVG-RhoH par la technique de *Western Blot*. L'anticorps monoclonal anti-VSVG a été utilisé comme contrôle positif. La figure R18 montre que dans les sera (S1 et S2), récupéré après la première et la deuxième injection du peptide au lapin 211, apparaît un signal. Ce signal est absent dans le puits correspondant au sérum avant injection du peptide (S0). Par contre, le lapin 212 ne produit aucun anticorps.

Au moment de la rédaction de ces résultats, nous sommes dans l'attente de l'anticorps purifié afin de vérifier plus précisément sa spécificité.



**Figure R18** : Analyse de la production d'anticorps. T : incubation anti-VSVG sur un lysat de cellules SF9. S0 : incubation du sérum avant première injection du peptide au lapin, S1 et S2 : incubation des sera après la première et la deuxième injection.

## **DISCUSSION**

Nous avons démontré que dans la lignée VAL, la translocation t(3;4)(q27;p13) provoque la fusion du gène *RhoH* au gène *LAZ3/BCL6*.

Le gène *LAZ3/BCL6*, situé en 3q27, code un facteur répresseur de transcription à doigt de zinc, homologue à la protéine *tramtrack* de *Drosophila* (Kerckaert *et al.*, 1993 ; Ye *et al.*, 1993 ; Miki *et al.*, 1994).

Le gène *RhoH* code, lui, une protéine de la super-famille Ras qui peut-être divisée en 6 familles :

- Ras/Ral, Rap impliquée dans la prolifération et la division cellulaire (Ellis *et al.*, 1981 ; Lowe *et al.*, 1987 ; Pizon *et al.*, 1988 ; Chardin and Tavitian, 1989) ;

- Rab impliquée dans le transport des vésicules intracellulaires (Touchot *et al.*, 1987 ; Bacon *et al.*, 1989 ; Van der Sluijs *et al.*, 1991 ; Chavrier *et al.*, 1999) ;

- Rho (Madaule and Axel, 1985 ; Polakis *et al.*, 1989) impliquée dans l'organisation du cytosquelette (Chardin *et al.*, 1989 ; Paterson *et al.*, 1990 ; Ridley and Hall, 1992) la prolifération cellulaire (Yamamoto *et al.*, 1993 ; Olson *et al.*, 1995) et la régulation de la transcription des gènes (Coso *et al.*, 1995 ; Minden *et al.*, 1995 ; Olson *et al.*, 1995 ; Bagrodia *et al.*, 1995 ; Zhang *et al.*, 1995 ; Roux *et al.*, 1997) ;

- Ran/TC4 impliquée dans le transport nucléocytoplasmique et dans l'organisation des microtubules (Drivas *et al.*, 1990 ; Melchior *et al.*, 1993 ; Nishimoto, 1999) ;

- ARF impliquée dans le transport des vésicules (Donaldson and Klausner, 1994 ; Franco *et al.*, 1998 ; Monier *et al.*, 1998) ;

- Rad and GEM (Reynet and Kahn, 1993 ; Maguire *et al.*, 1994) ;

- Rin/Rit (Wes *et al.*, 1996) ;

- Rheb (Yamagata *et al.*, 1994).

Sur *Northern Blot*, la sonde exonique ADNc Ka nous révèle que le gène *RhoH* a une spécificité d'expression hématopoïétique (Fig. R6 page 84, Tableau R1 page 85). Les membres de la famille Rho sont exprimés dans tous les tissus à l'exception de la protéine Rac2 qui est retrouvée uniquement dans les cellules hématopoïétiques (Reibel *et al.*, 1991). Les protéines Rac1 et Rac2 étant très proches l'une de l'autre, la protéine Rac2 pourrait être un isoforme de la protéine Rac1. De même, la protéine Cdc42Hs possède 2 isoformes, l'une spécifique du cerveau (Cdc42B), l'autre spécifique du placenta (Cdc42P) (Munemitsu *et al.*, 1990 ; Shinjo *et al.*, 1990). Nous pouvons imaginer que *RhoH* soit l'isoforme d'une protéine exprimée dans tous les types cellulaires.

L'hybridation de la sonde ADNc Ka sur les *Northern Blots* nous montre que le gène *RhoH* s'exprime sous la forme de 2 transcrits : 2.2 et 1.6 kb (Fig. R6 page 84). Bien qu'un autre transcrit mineur, de 4.4 kb, soit présent dans les préparations d'ARN cellulaires totaux et dans celles des ARNm, nous supposons que cette bande, très faiblement visible, représente un ARN immature ou un ARN ribosomal contaminant les préparations. La taille du transcrit majeur (2.2 kb) étant supérieure à la somme des tailles des fragments d'ADNc isolés dans les banques d'ADNc Karpas 422 et Raji (~1.6 kb ; Fig. R2 page 77), la totalité des séquences exoniques n'est pas clonée. Le transcrit de 1.6 kb, présent uniquement dans les lymphocytes circulants (Fig. R6 page 84) serait peut-être un ARN produit à partir d'un promoteur spécifique des lymphocytes.

Nous avons isolé 3 clones d'ADNc différents dans les banques d'ADNc Karpas 422 et Raji (Fig. R2 page 77) :

- le clone ADNc Ka isolé à l'aide de la sonde exonique PL1 (Fig. O1 page 72) contient les exons 1b et 2
- le clone 1cR7 isolé à l'aide de la sonde ADNc Ka comporte les exons 1a (partiel) et la partie 5' de l'exon 2
- le clone 1cR8 également isolé à l'aide de la sonde d'ADNc Ka est constitué des exons 1a (partiel) et 1b, ce dernier étant alors délété de 69 bp dans sa partie 5' (site d'épissage interne).

La comparaison des clones 1cR7 et 1cR8 nous révèle que l'exon 1b est utilisé de manière alternative. Le clone 1cR8 ne contient pas de séquence codante, il ne devrait donc pas exister physiologiquement. L'exon 2 a dû être éliminé au moment de la construction de la banque d'ADNc, tout comme la partie 3' de l'exon 2 dans le clone 1cR7.

La comparaison des 3 clones suggère l'existence possible de 2 promoteurs. En effet, le clone ADNc Ka débute par l'exon 1b, alors que les autres débutent par l'exon 1a. Ainsi, le premier promoteur dirigerait l'expression des transcrits 1a-1b-2 et 1a-2 et le second du transcrit 1b-2. Cependant, ce clone d'ADNc Ka pourrait aussi être le résultat d'une rétrotranscription incomplète, ce qui annulerait l'hypothèse de l'existence de 2 promoteurs. Des réactions de RT-PCR, réalisées sur l'ARN de différentes lignées cellulaires hématopoïétiques à l'aide d'amorces « sens » situées dans l'exon 1a ou 1b et d'amorces « anti-sens » localisées dans l'exon 2, ne permettent pas de lever l'ambiguïté (non montré). En effet, les réactions utilisant les amorces « sens » dans l'exon 1b et « anti-sens » dans l'exon 2 ne permettent pas de distinguer des transcrits 1a-1b-2 d'éventuels transcrits 1b-2. Le

séquençage des différents produits de PCR nous a révélé l'existence de 2 sites d'épissage internes en 5' de l'exon 1b et 1 en 5' de l'exon 2. Ces sites sont également utilisés chez les patients avec t(3;4). Des expériences d'extension d'amorces, de RNase protection et de RACE 5' et 3' seraient plus appropriées pour trancher quant à l'existence ou non du transcrit 1b-2 et pour identifier les séquences non clonées.

Les propriétés biochimiques et biologiques des protéines Rho sont bien documentées, cependant très peu d'études sont faites concernant la localisation et la structure génomiques des membres de cette famille. Seules les structures génomiques de *RhoG* (2 exons) (Le Gallic and Fort, 1997) et de *Rac2* (7 exons) (Courjal *et al.*, 1997) ont été déterminées. De par l'implication du gène *RhoH* dans une pathologie, la détermination de sa structure et de sa localisation chromosomique sont des éléments importants pour l'étude de son implication éventuelle dans de nouveaux cas de LNH. Nous avons montré que le gène *RhoH*, qui recouvre environ 40 kb, est constitué de 3 exons ; le deuxième exon est alternatif et le troisième comporte la partie codante entière du gène. Comme le gène *RhoG*, *RhoH* possède un très grand premier intron, de taille supérieure à 20 kb.

Les loci des protéines de la famille Rho sont très variables en taille et en structure. En effet, le gène *RhoG* s'étend sur 25 kb, celui de *Rac2* sur 18 kb, celui de *RhoH* sur 40 kb. De même, les gènes de cette famille ont été localisés, de manière plus ou moins précise, sur tous les chromosomes : *RhoA* en 3p21, *RhoB* en 2pter, *RhoC* en 1p13-p21 (Cannizaro *et al.*, 1990), *RhoG* en 11p15.5 (Worris *et al.*, 1993) et *RhoH* en 4p13 (Dallery-Prudhomme *et al.*, 1997). La comparaison de la structure et de la localisation de ces gènes montre que cette famille s'est diversifiée très tôt dans l'évolution. Cette hypothèse est confirmée par l'homologie des séquences protéiques des membres de la famille Rho clonés dans des espèces animales très différentes comme le mollusque, la levure et les mammifères, mais également dans les organismes végétaux. Au cours de notre travail, nous avons cloné, en collaboration avec le Dr D. Haggège de Brest, 3 gènes de la super-famille Ras dans la betterave sucrière dont le gène *rho1Bv* qui possède 64 % d'identité avec la protéine Rac2 humaine (Cf Annexe II ; Dallery *et al.*, 1996).

L'analyse moléculaire des points de cassure de la t(3;4) sur les chromosomes dérivés 3 et 4 a permis de mettre en évidence la présence de séquences spécifiques pouvant suggérer un mécanisme possible intervenant dans la genèse de cette translocation. En effet, l'analyse des séquences de jonction de la t(3;4)(q27;p13) dans la lignée VAL a révélé l'existence de

séquences heptamère-nonamère « *like* » au voisinage des points de cassure (Fig. R9 page 91). Dans un certain nombre de LNH de type B, la présence de ces séquences similaires à celles présentes dans la région V-D-J des gènes d'Ig et du TCR, suggère une recombinaison illégitime entre le locus des Ig et le gène partenaire, effectuée par la VDJ recombinase (Larsen *et al.*, 1994). Cependant, les points de cassure ne sont pas toujours associés à ces séquences et d'autres motifs cibles de recombinaison peuvent être recherchés. Nous citerons les séquences « *chi-like* », les séquences de liaison de la nucléase 45 bp, et les séquences Alu (Galiègue-Zouitina *et al.*, 1996 ; Stomatopoulos *et al.*, 1999 ; Akasaka *et al.*, 1996).

La séquence protéique de RhoH déduite de la séquence nucléotidique nous révèle que cette protéine possède les domaines nécessaires à la liaison et à l'hydrolyse du GTP caractéristiques des protéines de la super-famille Ras (Fig. R3 page 79). Il est intéressant de noter que la protéine RhoH possède surtout les motifs caractéristiques des membres de la famille Rho comme les résidus Tyr en 18 et en 24, Asn en 40, les séquences ArgProLeuSerTyr entre les positions 69 et 73 et Asp-Val en 77-78, Arg en 121, Ala en 145 et Cys en 151, la délétion en 103 par rapport à Ras, une insertion de 5 acides aminés (au lieu de 12 chez les autres membres de la famille Rho) entre les résidus 122 et 123 chez Ras, ce qui nous a permis de classer cette protéine RhoH dans la famille Rho (Chardin, 1989). Cependant, il existe dans cette séquence protéique quelques substitutions. Les résidus Gly-Gly en position 12 et 13 dans la protéine Ras sont remplacés par les résidus Ser-Ala en position 13 et 14 dans la protéine RhoH. Une autre particularité de la protéine RhoH est la présence d'un résidu Thr en position 41 (40 chez la protéine Ras) remplaçant la Tyr présente chez les autres membres de la famille Rho. Dans le deuxième domaine très conservé (DTAGQE), la protéine RhoH possède 2 modifications de séquence par rapport aux protéines de la super-famille Ras. En effet, en position 62 et 63, la séquence Asn-Asp remplace Gln-Glu. Dans le troisième domaine (NKxDL dans la protéine Ras), il existe quelques variations chez les membres de la famille Rho. Chez la protéine RhoH, la modification du premier et du deuxième résidu est en accord avec les variations observées chez les autres membres de la famille Rho (Valencia *et al.*, 1991), mais la protéine RhoH, comme la protéine Rho7/Rnd2, présente une substitution en position 120 (cinquième résidu du troisième domaine) (Gln pour RhoH et Met pour Rho7).

Certaines de ces substitutions chez Ras telles celles en position 12, 13 et 61 provoquent une diminution de l'activité GTPasique de cette protéine ce qui conduit à son activation oncogénique (Seeburg *et al.*, 1984 ; Fasano *et al.*, 1984). Ces acides aminés sont également substitués chez certains membres de la famille Rho récemment isolés : RhoE,

Rho6/Rnd1, Rho7/Rnd2 et Rho8/Rnd3 (Chardin, 1999). Ces protéines possèdent des propriétés biologiques et biochimiques différentes des autres protéines Rho (Nobes *et al.*, 1998 ; Guasch *et al.*, 1998). Il apparaît que les protéines RhoE et Rnd1 ne possèdent pas d'activité GTPasique intrinsèque et sont insensibles à la stimulation par les GAPs (Foster *et al.*, 1996 ; Nobes *et al.*, 1998). La comparaison des séquences protéiques de RhoH et de RhoE laisse supposer que ces protéines posséderaient les mêmes caractéristiques. De plus, un arbre phylogénétique, établi à partir de cette comparaison de séquences, permet de mettre en évidence que les protéines RhoE, Rho6, Rho7, Rho8 et RhoH doivent dériver d'un même gène ancestral (programme Clustal W, Thompson *et al.*, 1994). Cet arbre (Fig. R5 page 83) nous montre également que la famille Rho est constituée de 6 sous-familles comprenant les protéines:

- (i) Rac1, Rac2, Rac3 et RhoG
- (ii) Cdc42, TC10
- (iii) RhoA, RhoB, RhoC
- (iv) RhoE, Rho6, Rho7, Rho8
- (v) RhoH
- (vi) RhoD

Nous avons ainsi mis en évidence que la protéine RhoH est le membre unique d'une nouvelle sous-famille. Cet arbre est différent de celui construit par Zohn et collaborateurs en 1998. En effet, dans leur arbre phylogénétique, construit également à l'aide du programme Clustal W, la protéine RhoH appartient à la même sous-famille que RhoD. Néanmoins, la comparaison des 2 arbres nous révèle que ces 2 protéines divergent très tôt au cours de l'évolution par rapport aux autres protéines Rho.

La définition de ces 6 sous-familles reflète en général les fonctions des protéines Rho. Les protéines RhoA, RhoB et RhoC sont toutes les 3 capables d'induire la formation de fibres de stress (Rubin *et al.*, 1988 ; Paterson *et al.*, 1990 ; Ridley and Hall, 1992), les protéines RhoE, Rnd1 et Rnd3 induisent la dissociation des fibres de stress (Nobes *et al.*, 1998 ; Guasch *et al.*, 1998), et enfin, la protéine RhoD possède des fonctions différentes des autres protéines Rho (Murphy *et al.*, 1997). Dans notre étude, nous avons montré que la protéine RhoH dériverait du même gène ancestral que la protéine RhoE et ses dérivés. Les fonctions biologiques de la protéine RhoH sont encore méconnues. Nous avons cependant mis en évidence que la sur-expression de la protéine RhoH dans les cellules épithéliales (Hela et

BHK) ne provoquait pas la formation de fibres de stress. Dans les cellules Hela, la sur-expression de la forme activée de RhoH provoque la formation de structures ressemblant aux filopodes induits par la protéine Cdc42 dans les cellules SWISS3T3 (non montré), mais ces structures ne contiennent pas d'actine ni de vinculine. Nous ne trouvons pas d'explications quant au rôle d'une telle structure dans les fonctions d'une cellule épithéliale. Dans les cellules BHK, la sur-expression de la forme activée de la protéine RhoH induit la formation autour de la cellule, de vésicules contenant de l'actine et dans lesquelles est localisée la protéine RhoH (Fig. R15 page 100). Ce phénotype ressemble à celui d'une cellule en apoptose, les vésicules rappelant les corps apoptotiques. Certaines études ont révélé que la protéine Rho d'*Aplysia* est impliquée dans ce phénomène de mort cellulaire quand certaines conditions sont réunies (Jiménez *et al.*, 1995). Cependant, la coloration des noyaux des cellules BHK exprimant RhoH par la technique de Hoescht ne révèle aucune destruction de la chromatine. De même, des tests d'apoptose réalisés à l'aide du kit « *in situ cell death detection* » (Boehringer Mannheim) dans les cellules Hela exprimant RhoH se sont avérés négatifs (non montré).

L'expression de la protéine RhoH étant restreinte aux tissus hématopoïétiques, nous pouvons imaginer que les cellules épithéliales ne possèdent pas la ou les protéine(s) effectrice(s) nécessaire(s) à la transduction du signal *via* la protéine RhoH. Ceci expliquerait peut-être les phénotypes peu communs observés dans les cellules Hela. Nous avons observé l'effet de la sur-expression de la protéine RhoH dans les cellules hématopoïétiques semi-adhérentes : les basophiles de rat RBL-2H3 (Fig. R16 page 107). Il a été montré que dans ces cellules, la sur-expression de la forme dominante négative de Cdc42 diminue l'adhésion des cellules et que la forme dominante négative de Rac1 inhibe la formation des replis membranaires (Guillemot *et al.*, 1997). Le phénotype observé suite à la sur-expression de la forme activée (RhoH-L62) de RhoH est similaire à celui induit par la sur-expression de Cdc42-V12. Les cellules RBL-2H3 exprimant RhoH présentent un réseau d'actine ponctué en leur centre. De plus, elles sont plus grandes et plus étalées que les cellules n'exprimant pas RhoH. Ceci serait dû à une adhésion plus importante des cellules au support. Les protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 sont impliquées dans le phénomène d'adhésion des cellules hématopoïétiques sur la matrice extracellulaire des cellules endothéliales nécessaire à la migration des leucocytes vers le point d'infection (Aepfelbacher *et al.*, 1994 ; Laudanna *et al.*, 1996 ; D'Souza-Schorey *et al.*, 1998). Nous pouvons imaginer que la protéine RhoH serait peut-être également impliquée dans ce processus.

Aucune protéine Rho n'a été directement impliquée dans une pathologie. La protéine RhoH représente donc l'unique membre de cette famille dont le gène participe à une translocation chromosomique, associée à une hémopathie maligne. La translocation t(3;4)(q27;p13) a initialement été identifiée par le Dr C. Bastard dans la lignée cellulaire VAL qui dérive des cellules d'un patient atteint d'un lymphome non-Hodgkinien (LNH). L'obtention de sondes génomiques utilisables en FISH a permis de rechercher de façon systématique l'implication du gène *RhoH* chez les patients présentant une anomalie chromosomique au niveau du bras court du chromosome 4. Et il s'est avéré que ce gène *RhoH* est réarrangé de façon récurrente dans le LNH (4 cas, patients 1 à 4) et le myélome multiple (1 cas, patient 5). Les réarrangements de *RhoH* ont été observés à l'aide de 3 techniques différentes pour 3 des 5 patients. Par manque de matériel, il n'a pas été possible de réaliser la RT-PCR pour les patients 2 et 4. Dans chaque cas, la qualité des marquages obtenus ainsi que le nombre de métaphases analysées permettent d'affirmer le réarrangement du gène *RhoH* dans les 5 cas. De plus, les jonctions génomiques (3-4) ont été clonées au laboratoire, chez 3 patients.

Le partenaire de *RhoH* dans les translocations (3;4) est le gène *LAZ3/BCL6*. Nous avons émis l'hypothèse, avec d'autres équipes que la conséquence des translocations impliquant le gène *LAZ3/BCL6* serait une substitution des séquences régulatrices de ce gène par les éléments régulateurs du gène partenaire (Dallery *et al.*, 1995 ; Galiègue-Zouitina *et al.*, 1996 ; Akasaka *et al.*, 1997) ce qui provoquerait la dérégulation transcriptionnelle de *LAZ3/BCL6* (Ye *et al.*, 1995 ; Chen *et al.*, 1998). Dans ce travail, nous avons analysé les transcrits de fusion des gènes *RhoH* et *LAZ3* chez 2 patients présentant une t(3;4) et pour le patient 1, nous avons mis en évidence la dérégulation probable des 2 gènes par échange de promoteur. En effet, dans ce cas, 2 produits de fusion sont observés : (i) un transcrit de fusion *RhoH(1a)-LAZ3* produit à partir du chromosome dérivé 3 et (ii) un transcrit de fusion réciproque *LAZ3-RhoH* produit à partir du chromosome dérivé 4. Ainsi, dans ce cas, chaque gène se retrouve sous l'influence du promoteur du gène partenaire. Par contre, pour l'autre patient étudié (patient 3), seul le gène *LAZ3* semble être dérégulé par échange de promoteur (absence du transcrit de fusion réciproque *LAZ3-RhoH*).

D'autre part, chez ce patient 3 comme dans la lignée VAL, 2 transcrits de fusion *RhoH-LAZ3* sont détectés : l'un comportant la jonction de l'exon 1a de *RhoH* avec l'exon 2 de *LAZ3* et l'autre comprenant les exons 1a et 1b de *RhoH* fusionnés avec l'exon 2 de *LAZ3*. Chez le patient 1, le transcrit *RhoH(1a)-LAZ3* seul est observé. Comme nous l'avons indiqué

précédemment, la position précise des points de cassure à l'intérieur du gène *RhoH* a été récemment déterminée chez les patients (C. Pucalowski, DEA Juillet 1999). Il ressort de cette étude la mise en évidence de 2 zones de points de cassure à l'intérieur du gène *RhoH*, l'une située entre les 2 exons 1a et 1b (patient 1) et l'autre en 3' de l'exon 1b (lignée VAL, patients 2 et 3). La fonction des 2 premiers exons non codants de *RhoH* n'est pas connue, nous avons seulement montré qu'un épissage alternatif existe dans les transcrits normaux de ce gène. Ainsi le pseudo épissage alternatif observé chez les patients, dû à la position des points de cassure, pourrait provoquer une dérégulation du gène *LAZ3* différente entre les 2 cas. Ceci relance l'intérêt de l'étude fondamentale de la régulation du gène *RhoH* et en particulier du rôle des 2 exons non codants.

Cette étude nous montre qu'il existe 2 cas de figure chez ces patients : (i) soit les 2 gènes partenaires *RhoH* et *LAZ3* sont dérégulés, (ii) soit seul le gène *LAZ3* est dérégulé et dans les 2 cas, il semble pouvoir l'être de 2 manières différentes puisqu'il existe dans le gène *RhoH* 2 points de cassure possibles dont l'un a pour conséquence l'élimination d'un des 2 exons non codants.

La t(4;14) retrouvée chez le patient 5 porteur de MM a été observée par cytogénétique classique comme une anomalie chromosomique unique. Dans ce cas, nous avons montré que le partenaire de *RhoH* est le gène des chaînes lourdes d'immunoglobulines (*IgH*) (Fig. R13 page 102). Nous avons recherché la présence d'un éventuel transcrit de fusion *IgH-RhoH* à l'aide de la technique de RACE 5' en utilisant une amorce située dans l'exon 2 de *RhoH* et une amorce complémentaire de l'ancre ligaturée en 5', sans succès. Ceci peut être dû à la faible représentation de ce transcrit dans l'ARN du patient ou à son absence.

L'apparition d'une tumeur peut être due à de nombreux événements moléculaires qui peuvent aboutir soit à l'expression d'une forme activée d'une protéine, soit à la sur-expression d'une forme sauvage. Dans certaines conditions, les protéines Rho sont capables de provoquer la transformation cellulaire. De nombreuses études réalisées dans les fibroblastes NIH3T3 ou Rat1 montrent que la sur-expression des protéines Rac1, Cdc42 ou RhoG induit une prolifération anarchique des cellules (Qiu *et al.*, 1995a; 1997; Roux *et al.*, 1997). Néanmoins, les fibroblastes transformés par les protéines Cdc42 et RhoG ne possèdent pas tous les caractères de transformation qui sont : l'altération de la morphologie cellulaire, la croissance accélérée, la réduction de la dépendance au sérum, la perte de l'inhibition de

contact, l'altération de la régulation de l'expression des gènes, la possibilité de croître en milieu semi-solide et enfin, la formation de tumeurs *in vivo*.

En ce qui concerne la protéine RhoA, les avis sont plus controversés. Il apparaît qu'il est nécessaire d'avoir une très forte expression de la protéine RhoA activée (RhoA-V14) ou de la forme sauvage pour obtenir un phénotype transformé (Avraham *et al.*, 1989 ; Perona *et al.*, 1993 ; Prendergast *et al.*, 1995).

Plusieurs hypothèses sont émises afin d'expliquer le mécanisme de transformation des cellules par les protéines Rho. Les protéines Rho étant impliquées dans la régulation de l'expression des gènes et dans la prolifération, l'activation constitutive de ces protéines pourrait être responsable de la dérégulation de certains gènes et entraînerait la prolifération incontrôlée des cellules. L'activation constitutive des protéines Rho pourrait être due à une mutation dans la phase codante au niveau d'un acide aminé indispensable pour l'activité GTPasique de la protéine. Cependant, aucune étude n'a, jusqu'à présent, permis de mettre en évidence ce phénomène dans les tumeurs (Moscow *et al.*, 1994). L'activation des protéines Rho par la protéine Ras ou par les protéines régulatrices GEF serait donc plus probable. D'une part, les premières données concernant le pouvoir transformant de la protéine Ras montrent que les cellules NIH3T3 transformées par Ras possèdent un phénotype proche de celui des cellules sur-exprimant les protéines Rho (Bar-Sagi and Feramisco, 1986). De plus, des études plus récentes prouvent que les protéines RhoA, Rac1, Cdc42 et RhoG sont nécessaires à la transformation des cellules par Ras (Khosravi-Far *et al.*, 1995 ; Prendergast *et al.*, 1995 ; Qiu *et al.*, 1995a ; 1995b ; Roux *et al.*, 1997). D'autre part, les facteurs d'échange ou GEF, responsables de l'activation des protéines Rho par échange du GDP par du GTP, sont pour la plupart d'entre eux le produit de proto-oncogènes (Cerione and Zheng, 1996). La forme oncogénique de ces protéines, correspondant à la forme tronquée de leur partie N-terminale, pourrait provoquer une transformation cellulaire par activation constitutive des protéines Rho (van Leeuwen *et al.*, 1995 ; Westwick *et al.*, 1998).

Dans notre cas, l'implication de la protéine RhoH dans la pathologie est loin d'être démontrée. Aucune mutation n'a été détectée dans la partie codante du gène *RhoH* dans un échantillonnage d'une trentaine de LNH (E. Bouffet-Klein, DEA Juillet 1999), laissant supposer que l'implication de cette protéine dans la pathologie serait plutôt due à une dérégulation de l'expression du gène, comme le suggèrent les analyses des transcrits de fusion chez les patients présentant un réarrangement en 4p13. Nous pouvons également imaginer que la protéine RhoH, suite à la dérégulation du gène chez certains patients, aurait un rôle dans

l'évolution de la maladie. En effet, les observations cytogénétiques chez les patients porteurs d'une t(3;4) mettent en évidence que ce réarrangement, secondaire, est toujours associé à la t(14;18) considérée comme événement primaire dans ce type de lymphome (folliculaire). Il est peut-être possible de suggérer que les patients porteurs des 2 anomalies développeraient progressivement un LNH plus agressif que ceux ne présentant que la t(14;18). Cependant, ceci doit être avancé avec prudence car le caryotype de ces patients présente également d'autres anomalies secondaires (cf Tableau M1 page 130). De plus, nos travaux très récents et encore préliminaires sur l'étude du pouvoir transformant de la protéine RhoH dans un modèle murin (lignée hématopoïétique DA1, IL3 dépendante) montrent que cette protéine est capable de lever la dépendance de ces cellules vis à vis de l'IL3 et que l'injection à des souris syngéniques (C3H), des cellules DA1 exprimant RhoH provoque la mort de ces animaux (cf Annexe I). Il serait donc très intéressant d'étudier un plus grand nombre de patients afin de rechercher une éventuelle corrélation entre le phénotype pathologique (évolution clinique du lymphome) et le réarrangement de *RhoH*. Dans cette étude, l'anticorps spécifique de RhoH que nous avons mis au point permettrait l'analyse de l'expression de la protéine dans les cellules tumorales des patients.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

De par leur rôle dans de nombreuses fonctions biologiques, les protéines Rho représentent une famille de petites GTPases suscitant un intérêt de plus en plus important.

Nous avons mis en évidence, pour la première fois, l'implication directe d'un gène codant un membre de la famille Rho dans une pathologie. En effet, nous avons cloné le gène *RhoH/TTF* à partir de la translocation chromosomique t(3;4) retrouvée chez un patient présentant un lymphome non-Hodgkinien (LNH). Ce gène présente la particularité de ne s'exprimer que dans les cellules et les tissus hématopoïétiques. L'organisation génomique de *RhoH* montre qu'il est constitué de 3 exons, le deuxième étant utilisé de manière alternative et le dernier contenant toute la partie codante du gène. Nous avons montré qu'il code une protéine possédant, comme les protéines Rnd, des substitutions d'acides aminés importants pour son activité biochimique intrinsèque, ceci laissant supposer que la protéine RhoH posséderait les mêmes caractéristiques que ces protéines Rnd. D'ailleurs, un arbre phylogénétique a révélé que ces protéines seraient issues d'un même gène ancestral.

La localisation chromosomique du gène *RhoH* a été déterminée avec précision en 4p13, à l'aide de la technique FISH, en utilisant comme sonde 3 clones d'ADN génomique du locus *RhoH*. Cette sonde a également permis de mettre en évidence l'implication de ce gène de façon récurrente, dans le LNH [t(3;4)] et le MM [t(4;14)]. Des analyses moléculaires effectuées sur des patients porteurs de translocation (3;4) montrent que cette anomalie aurait pour conséquence une possible dérégulation de l'expression des 2 gènes partenaires, *RhoH* et *LAZ3/BCL6* puisque chez un patient, et dans la lignée VAL, nous observons la présence des 2 transcrits de fusion réciproques. Il est important de noter que l'épissage alternatif observé pour le gène *RhoH* dans son expression normale est également détecté chez les patients, suggérant ainsi une dérégulation différente du gène *LAZ3* par l'exon 1a seul ou les exons 1a et 1b de *RhoH*, selon les cas.

Nous avons également montré que la protéine RhoH se trouve localisée au niveau de la membrane interne des cellules eucaryotes et qu'elle aurait un rôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Nous sommes actuellement en train de caractériser son activité GTPasique et de produire un anticorps spécifique de cette protéine.

Ce travail ouvre la voie sur la caractérisation de l'unique membre de la famille Rho dont le gène est impliqué de façon récurrente dans certaines hémopathies malignes, en particulier les LNH folliculaires. Il serait tout d'abord intéressant d'étudier les propriétés biochimiques de la protéine RhoH à l'aide des protéines recombinantes produites en système « baculovirus » et de savoir sous quelle forme se trouve la protéine *in vivo*. Ensuite, il faudrait

approfondir l'étude du rôle normal de cette protéine dans les cellules hématopoïétiques, au niveau de l'organisation du cytosquelette, de l'adhésion cellulaire, mais aussi au niveau des cascades de transduction du signal impliquées dans la transcription des gènes et dans le cycle cellulaire.

Il faudrait également rechercher l'implication éventuelle de la protéine RhoH dans la pathologie. Pour cela, nous avons engagé l'étude de son possible pouvoir transformant dans une lignée murine hématopoïétique (DA1 IL3 dépendante) *in vitro* et *in vivo*. L'approfondissement de ce travail devrait nous permettre de conclure si oui ou non la sur-expression de la protéine pourrait avoir un rôle dans la transformation cellulaire, soit de manière directe, soit indirectement en influant sur l'évolution de la progression tumorale.

Il nous semble aussi très important d'envisager l'étude de la régulation du gène *RhoH* pour déterminer le rôle des exons 1a et 1b, afin d'essayer d'appréhender les conséquences des réarrangements chromosomiques en 4p13 chez les patients. D'autre part, l'anticorps spécifique de RhoH représente un outil non négligeable qui nous permettrait de visualiser la protéine endogène chez ces patients, afin de rechercher s'il existe une corrélation entre le phénotype pathologique observé et l'expression de la protéine RhoH.

## **MATERIELS ET METHODES**

## A. MATÉRIELS

### I. Les cellules eucaryotes

La lignée cellulaire BHK dérive de cellules épithéliales de rein de hamster. Cette lignée est utilisée pour l'étude de la localisation subcellulaire de la protéine RhoH. Elle a été cultivée dans le laboratoire du Dr P. Chavrier à Marseille.

La lignée RBL-2H3 dérive de basophiles de rat. Cette lignée est utilisée pour l'étude de la localisation subcellulaire de la protéine RhoH. Elle a été cultivée dans le laboratoire du Dr P. Chavrier à Marseille.

La lignée cellulaire SF9 dérive de cellules d'insectes *Spodoptera frugiperda* (Clontech). Elle est utilisée pour la production de protéines recombinantes.

La lignée cellulaire VAL, établie par le Dr C. Bastard, dérive d'un patient atteint de lymphome non-Hodgkinien. Cette lignée hématopoïétique de type B possède le caryotype suivant : 49, XX, dup(2)(p11;p15), t(3;4)(q27;p13), t(8;14;18)(q24;q32;q21), +8, +ider(8)-t(8;14;18)(q24;q32;q21), +der(12)t(1;12)(q24;q24).

La lignée cellulaire Karpas 422 nous a été fournie par le Dr Karpas de Cambridge.

La lignée cellulaire Raji est une lignée hématopoïétique de type B commercialisée par l'ATCC (pour l'anglais : « *American Tissue Culture Collection* »).

### II. Les échantillons des patients

Entre janvier 1993 et mars 1997, des analyses cytogénétiques ont été réalisées sur des prélèvements frais de 272 cas de LNH de type B non traités diagnostiqués dans 5 hôpitaux du Nord de la France (Centre Hospitalier Universitaire de Lille, collaboration Dr J-L Lai, Centres Hospitaliers de Dunkerque, de Lens, de Seclin et de Valenciennes, collaboration A. Daudignon) et 165 cas de Myélome Multiple (MM) diagnostiqués à Lille. Sur ces 410 cas, 4 de LNH et 1 cas de MM présentant un réarrangement en 4p13 ont été sélectionnés. Le tableau

M1 présente les caractéristiques cliniques et cytogénétiques des 5 patients sélectionnés pour cette étude.

### III. Les bactéries

La souche XL1-Blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*[F', *proAB*, *lacI<sup>q</sup>ZΔM15*, *Tn10* (Tet<sup>r</sup>)] est déficiente en système de restriction et de recombinaison *E. coli*, ce qui permet le maintien stable des transgènes dans les plasmides recombinés. Elle est donc utilisée pour l'amplification et de maintien de tous les plasmides. Elle est également déficiente en activité β-galactosidase suite à des délétions dans la copie génomique et épisomale du gène *lacZ*. La copie épisomale est déléetée de la région correspondant au peptide-α. L'introduction dans cette souche d'un plasmide exprimant le peptide-α permet la restauration de l'activité β-galactosidase, qui peut-être visualisée par l'utilisation d'un substrat chromogène : le X-gal donnant un coloration bleue après catalyse. Ceci permet la sélection rapide des clones recombinés : après étalement sur des boîtes de Pétri contenant du LB gélosé en présence de l'inducteur (IPTG) et du substrat X-gal, les bactéries contenant le plasmide d'origine vont donner des colonies de couleur bleue alors que les bactéries contenant le plasmide recombiné dont le peptide-α a été inactivé vont donner des colonies de couleur blanche.

La souche C600 (*e14<sup>(McrA<sup>-</sup>)</sup>*, *supE44*, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*) est utilisée pour le maintien des phages *λgt10*.

### IV. Les banques

La banque d'ADNc Raji, établie à partir d'ADN extrait de cellules hématopoïétiques, est commercialisée par la société Clontech.

La banque d'ADNc Karpas 422 a été construite au laboratoire à partir de l'ADN génomique extrait de la lignée cellulaire Karpas 422 dans le bactériophage *λgt10*.

La banque d'ADN génomique VAL a été construite au laboratoire à partir de l'ADN génomique extrait de la lignée VAL dans le bactériophage *λEMBL3*.

Patient	Age	Sexe	Type de lymphome et stade*	Matériel	Caryotypes
1	39	F	Folliculaire stade III	M	49-50, X del X (p21), dic(1,12)( ?p21;q24), t(3;4)(q27;p13), + i (6) (p10), t(14;18)(q32;q21), i (17)(q10), + (0-1) add (19)(q13), der(21) t(1;21)(q11;p11), + mar1 x 2. <b>(15)</b> .
2	70	F	Folliculaire stade IV	GL	48, XX, + X x 2, t(3;4)(q27;p13), del (6) (q12), t(14;18)(q32;q21), del (18)(q21). <b>(20)</b> .
3	52	F	Folliculaire stade III	GL	45, XX, add (1)(p36), - 6, der(8) t(8;8)(p22;q13), t(14;18)(q32;q21). <b>(6)</b> . 45, idem, t(3;4) (q27;p13). <b>(4)</b> .
4	53	F	Folliculaire stade III	GL	46, XX, t(3;4)(q27;p13), i (6) (p10), t(14;18)(q32;q21). <b>(5)</b> . 47, idem, + mar 1. <b>(5)</b> .
5	62	F	Myélome multiple	M	46, XX, t(4;14)(p13;q32). <b>(3)</b> . 46, XX. <b>(18)</b> .

M : moëlle

GL : ganglion lymphatique

\* Classification Ann Harbor

**Tableau M1** : Caractéristiques cliniques et cytogénétiques des patients n°1 à n°5.

## V. Les vecteurs

Le pBluescript KSII a été utilisé pour la plupart des sous-clonages de fragments nécessaires à la marche sur le chromosome. Ce vecteur est un phagemide contenant un site multiple de clonage interrompant la portion du gène *lacZ* fournissant l' $\alpha$ -complémentation, ce qui permet une sélection aisée des clones recombinants par leur couleur. Il comporte également les séquences des amorces T3 et T7 qui permettent le séquençage des fragments insérés. Ce vecteur est commercialisé par la société Stratagène, sa carte est représentée sur la figure M1.

Le pCRII a été utilisé pour le clonage des produits de PCR en vue de leur purification et/ou de leur séquençage. Ce vecteur contient un site unique de clonage situé également dans le fragment du gène codant le peptide  $\alpha$  de *lacZ*. Il permet le clonage des produits de PCR qui possèdent en 3' une déoxyadénosine ajoutée par l'ADN polymérase au moment de l'amplification. Il est commercialisé dans le kit « *TA Cloning* » de la société InVitrogen Corporation (USA), sa carte est représentée sur la figure M1.

Le pBacPAK9 a été utilisé pour le sous-clonage de la partie codante des formes sauvage et mutantes de *RhoH* en vue de la production des protéines correspondantes dans les cellules d'insectes. Ce plasmide est un vecteur de transfert contenant un site multiple de clonage au sein de séquences virales nécessaires à la recombinaison homologue entre ce vecteur et de l'ADN viral. Ce vecteur est commercialisé dans le kit « *BacPAK Baculovirus Expression System* » de la société Clontech, sa carte est représentée sur la figure M1.

Le pSR $\alpha$ -VSVG fourni par le Dr P. Chavrier, a été utilisé pour le sous-clonage de la partie codante des formes sauvage et mutantes de *RhoH* en vue des études de localisation subcellulaire de la protéine. Ce plasmide est un vecteur d'expression dans les cellules eucaryotes, il comporte un site multiple de clonage en aval de la séquence codant le peptide VSV-G. Il permet l'expression d'une protéine hybride que l'on peut visualiser par immunodétection à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre le *flag*. La carte de ce vecteur est représentée sur la figure M1.



## VI. Les anticorps

L'anti-VSVG (clone P5D4) est un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'épitope de la glycoprotéine du VSV (pour l'anglais : « *Vesicular Stomatitis Virus* »). Cet anticorps est commercialisé par la société Sigma.

L'anticorps secondaire de lapin anti-souris utilisé pour les *Immuno-Western Blot* est commercialisé par la société DAKON.

## B. METHODES

### I. Techniques d'analyse et de purification

#### I.1 Electrophorèse en gel d'agarose.

L'ADN plasmidique est digéré par des endonucléases de restriction à raison de 5 unités enzymatiques par  $\mu\text{g}$  d'ADN dans les conditions stipulées par le fabricant. Dans le cas d'ADN génomique, celui-ci est digéré par 10 unités enzymatiques par  $\mu\text{g}$  d'ADN pendant 1 nuit à 37 °C puis par 5 unités enzymatiques par  $\mu\text{g}$  une heure à 37 °C. Les produits de digestion sont mélangés à une solution de BB $\Phi$  (0.02 M EDTA; 50 % (v/v) glycérol; 1 % (p/v) bleu de bromophénol; 2 % (p/v) FICOLL 400) à raison de 5 volumes pour un volume puis déposés sur gel d'agarose de 0.8 à 2 % selon la taille des fragments attendus. La migration se fait sous une tension de 100 V en tampon TBE (Tris 0.135 M; acide orthoborique 0.045 M; EDTA 0.0025 M, [pH 8.3]). L'ADN est visualisé sous rampe UV (366 nm) grâce au bromure d'éthidium (BrEt) contenu dans le gel (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), et la taille des bandes est évaluée à l'aide de marqueurs de taille couvrant une échelle de 100 bp à 11 kb (Pharmacia).

## I.2 Southern blot

### I.2.a Transfert

Cette technique consiste en un transfert d'ADN contenu dans un gel d'agarose sur une membrane de nitronylon (Hybond-C Extra, AMERSHAM), sous l'influence d'un courant d'absorption d'un tampon de transfert.

Après migration, l'ADN est soumis à une dénaturation (NaOH 0.2 N ; NaCl 0.6 M) pendant 2 fois 20 min puis à une neutralisation (Tris-HCL 0.5 M [pH 7.5] ; NaCl 1.5 M) pendant 2 fois 20 min également. Il est nécessaire de noter que dans le cas d'un transfert d'ADN génomique (fragments de taille supérieure à 20 kb), il est nécessaire d'effectuer une dépurination (HCl 0.25 N) pendant 15 min avant de procéder à la dénaturation.

Le transfert a lieu dans une solution de SSC 6X (1) pendant une nuit. L'ADN est alors fixé à la membrane par chauffage à 80 °C pendant 1 h.

### I.2.b Marquage des sondes

Le marquage des sondes a été effectué à l'aide du kit *rediprime DNA labelling system* (Amersham). Cette technique repose sur l'hybridation d'hexanucléotides de façon aléatoire sur une matrice d'ADN dénaturée, suivie d'une extension d'amorces réalisée par l'ADN polymérase fragment de Klenow. En substituant le dCTP par le  $\alpha^{32}\text{P}$  dCTP (3000 Ci/mmol) dans le mélange réactionnel, l'ADN néosynthétisé sera radiomarqué. Pour cela, après dénaturation par chauffage de 25 ng de fragments d'ADN, la réaction de marquage est réalisée pendant 10 min à 37 °C dans les conditions décrites par le fabricant. La sonde est utilisée après purification par gel filtration sur colonnes Sephadex G50 (*Quick Spin Columns*, Boehringer), dénaturation par la soude 0.3 N, et comptage au compteur à scintillation.

### I.2.c Hybridation

La membrane est préhybridée dans le tampon suivant : Formamide désionisée 50 %,

(1) SSC 20X : NaCl 3M ; Citrate Trisodique 0.3M

solution de Denhart's 0.1 % (1), SSPE 5X (2), SDS 1 %, ADN dénaturé de sperme de saumon (200 µg/ml), pendant une heure à 42 °C. L'hybridation des sondes radiomarquées est réalisée à 42 °C pendant 12 heures dans le même tampon. L'hybridation non spécifique est éliminée par deux lavages successifs à la température ambiante avec une solution : SSC 0.1 X ; SDS 0.1 %, et un dernier lavage à 55 °C. Les résultats sont visualisés à l'aide du *PhosphorImager*.

### **I.3 Clonage des fragments d'ADN en vecteur plasmidique**

#### **I.3.1 Purification et ligation des fragments d'ADN**

##### *I.3.1.a Préparation des fragments à cloner*

Les fragments d'ADN séparés par électrophorèse en gel d'agarose sont purifiés à l'aide du filtre Spin-X (COSTAR, acétate de cellulose 0.22 µm). Une série de congélations/décongélations successives (passage de -80 °C à 42 °C) suivie d'une centrifugation de 10 min à 12000 g permettent d'éluer le fragment d'ADN. A partir de l'éluat, l'ADN est purifié par extraction au phénol/chloroforme et précipité (cf § II.A.2.a). Après séchage sous vide, l'ADN est repris dans une solution de TE 1X (Tris/HCl 0.01 M ; EDTA 0.001 M, pH 8) et dosé sur gel d'agarose par comparaison avec une gamme de concentration d'un plasmide.

##### *I.3.1.b Préparation du vecteur*

4 µg du vecteur sont digérés par 20 U d'enzymes de restriction pendant 1 heure dans les conditions décrites par le fabricant. Les enzymes sont choisies afin d'obtenir des extrémités cohésives avec celles des fragments à sous-cloner. Le vecteur est ensuite déphosphorylé par 20 U de Phosphatase alcaline (Boehringer) lors d'une incubation de 30 min à 37 °C. La phosphatase alcaline est inactivée par un chauffage de 10 min à 65 °C et par addition de 4.5 µl d'EGTA (0.25 M). L'ADN est purifié par extraction au phénol/chloroforme et précipité. Le culot repris dans une solution de TE 1X est dosé sur gel d'agarose.

(1) Solution de Denhart 100X : Ficoll 2 % ; Polyvinylpyrrolidone 2 % ; BSA 2 %

(2) SSPE 20X : NaCl 3.6 M ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 M ; EDTA 0.02 M ; pH 8.3

### *I.3.1.c Ligation*

Le vecteur linéarisé et le fragment sont mélangés dans un rapport molaire de 1/3. La ligation se fait dans un volume réactionnel de 10  $\mu$ l en présence de 1 à 3 unités de la ligase du bactériophage T4 (Boehringer), pendant une nuit à 4 °C.

### **I.3.2 Transformation bactérienne**

Cette transformation bactérienne consiste à faire pénétrer de l'ADN plasmidique dans une bactérie en vue de son amplification. Elle a pour principe de perméabiliser de manière transitoire la paroi bactérienne par traitement au chlorure de rubidium froid.

Les bactéries compétentes (100  $\mu$ l pour 5  $\mu$ l de ligation) sont mises en contact avec l'ADN plasmidique pendant 30 min sur la glace. Elles subissent un choc thermique (90 sec à 42 °C puis 1 min à 4 °C) et sont remises en culture sous agitation pendant 30 min en présence de milieu enrichi en glucose. Une partie aliquote de cette culture est enfin étalée sur une boîte de LB gélosé additionné de l'antibiotique de sélection (ex : ampicilline à 125  $\mu$ g/ml), et incubée une nuit à 37 °C. Si le vecteur utilisé possède l' $\alpha$ -complémentation, de l'IPTG (0.0004 M) et du X-Gal (80  $\mu$ g/ml) sont également additionnés.

### **I.3.3 Identification des clones recombinants**

Les clones bactériens résistants au marqueur de sélection et/ou blancs sont mis en culture dans 5 ml de LB contenant l'antibiotique pendant une nuit à 37 °C, sous agitation. L'ADN plasmidique est ensuite extrait à l'aide du kit MiniPrep de chez Qiagen (USA) selon le protocole décrit par le fabricant. Les clones porteurs du plasmide sont identifiés par hydrolyse enzymatique et électrophorèse en gel d'agarose.

L'ADN plasmidique obtenu par cette technique peut être utilisé pour le séquençage nucléotidique du fragment inséré.

Pour obtenir de l'ADN en plus grande quantité, nous utilisons le kit « MidiPrep » de chez Qiagen à partir d'une culture de 100 ml.

## I.4 Séquençage nucléotidique

Nous avons utilisé la technique de séquençage reposant sur la méthode de terminaison de chaîne (Sanger *et al.*, 1977) pour de nombreuses applications : (i) pour identifier les ADNc que nous avons isolés par criblage des banques, (ii) pour vérifier la séquence des produits d'amplification par PCR en vue de la production de protéines en bactéries et en cellules eucaryotes (iii) pour les clonages de la partie codante de *RhoH* dans les différents vecteurs d'expression afin de vérifier l'existence du bon cadre de lecture.

Nous avons tout d'abord effectué la réaction à l'aide du kit *sequenase version 2.0* (United States Biochemical, USB) dans les conditions stipulées par le fabricant. En résumé, cette technique consiste en une dénaturation de l'ADN double brin par un mélange de NaOH (0.2 M) et de EDTA (0.0002 M) à 37 °C, suivie d'une précipitation à l'éthanol à raison de 2 volumes pour un volume initial en présence d'un dixième de volume d'acétate de sodium. Après un lavage du culot par de l'éthanol à 70 %, intervient l'hybridation à 65 °C des amorces appropriées sur l'ADN simple brin suivie d'un refroidissement très lent du mélange. Enfin, la *sequenase* (variant génétique de l'ADN polymérase du bactériophage T7, exempte d'activité 3'-5' exonucléasique) resynthétise le brin complémentaire en présence d'ATP ( $\alpha^{35}\text{S}$ ) et d'un des 2', 3' di-désoxynucléotides (ddCTP ou ddGTP ou ddATP ou ddTTP) qui permettent d'arrêter la polymérisation. Après une dernière dénaturation à 80 °C, les polymères sont séparés par un mélange d'acrylamide/bisacrylamide dénaturant à 6 % et visualisés en autoradiographie.

Depuis peu, le laboratoire s'est équipé d'un séquenceur automatique de la société Perkin Elmer Applied Biosystem : l'ABI PRISM 310. La technique repose sur l'utilisation de désoxyynucléotides couplés à un fluorochrome. Chaque nucléotide est couplé à un fluorochrome différent émettant à une longueur d'onde qui lui est propre.

## I.5 Les réactions de polymérisation en chaîne ou PCR

### I.5.a PCR « classique »

Les amplifications classiques sont réalisées sur une quantité d'ADN comprise entre 1 et 100 ng dans un volume réactionnel de 10  $\mu\text{l}$  recouvert par 20  $\mu\text{l}$  d'huile minérale (Sigma). Le mélange réactionnel pour un essai est composé de 20 à 50 pmol d'amorces, de 200  $\mu\text{M}$  de

chaque dNTP (Pharmacia). L'ADN polymérase thermostable utilisée est la Taq polymérase (Appligene) avec le tampon fourni par le fabricant. Le témoin négatif est réalisé en excluant la matrice du mélange réactionnel.

Les réactions d'amplification commencent par une dénaturation de l'ADN double-brin à 94 °C pendant 4 min suivie de 35 cycles composés chacun d'une dénaturation des produits d'amplification à 94 °C pendant 1 min, d'une hybridation des amorces appropriées pendant 1 min à une température déterminée pour chaque couple d'amorce, et enfin de la polymérisation à 72 °C pendant 2 min. Les 35 cycles sont suivis d'une dernière étape d'extension à 72 °C pendant 8 min qui permet une synthèse complète des produits d'amplification.

Les résultats sont visualisés sur gel d'agarose.

### *1.5.b Long-distance PCR (LD-PCR)*

Cette technique permet une amplification de fragments plus grands que ceux obtenus au cours d'une réaction de PCR classique ; jusqu'à 27 kb si la matrice utilisée est de l'ADN génomique, et 40 kb à partir d'ADN plasmidique ou de phage. Elle a été mise au point au laboratoire par Sylvie Zouitina et Christine Pucalowsky, et utilisée par Marie-Paule Hildebrand dans le cas de la détermination de l'organisation génomique de *RhoH*.

Les réactions ont été mises en œuvre à l'aide du kit *Expand Long Template PCR System* (Boehringer). Ce système utilise 2 polymérases thermostables : la Taq polymerase et la Pwo polymerase.

## **II. Techniques d'analyse et de purification d'ADN de phages**

### **II.1 Criblage des banques d'ADN**

Nous avons criblé des banques d'ADN génomique préparées au laboratoire et d'ADNc (Clontech) afin de cloner le gène *RhoH*. Cette expérience consiste à rechercher dans une banque la bactérie qui a intégré le vecteur recombinant contenant ce gène ou une partie de ce gène.

La première étape consiste en l'infection des bactéries par les phages dilués en présence de  $Mg^{2+}$  (0.1 M) pendant 15 min à 37 °C sans agitation. On détermine tout d'abord le titre de la banque. Pour cela, compte tenu de son titre supposé, les phages sont dilués et

plusieurs étalements sont réalisés afin d'obtenir une gamme de plages de lyse comprise entre 100 et 500 plages de lyse par boîte de pétri. Un tapis bactérien est obtenu par étalement des bactéries infectées dans du LB contenant 0.8 % (p/v) d'agarose. Les plages de lyse sont comptées après une nuit d'incubation à 37 °C.

Il suffit ensuite de multiplier le nombre de plages de lyse par le facteur de dilution pour déterminer le titre de la banque.

Après titration de la banque, les phages sont dilués afin d'obtenir environ 50 000 plages de lyse par boîte. Après une incubation d'une nuit à 37 °C, on réalise une empreinte de chaque boîte sur une membrane de nitrocellulose (Gelman Sciences). Un traitement par une solution de soude (0.2 M) et de NaCl (1.5 M) permet de détruire la capsid des phages et de séparer les brins d'ADN phagique, ensuite celui-ci est immobilisé sur la membrane à l'aide d'un mélange de NaCl (1.5 M) et de Tris (0.5 M, pH 7.5). Cette fixation deviendra irréversible après irradiation aux UV pendant 2 min.

Après ce traitement, la membrane est hybridée avec une sonde radioactive du gène dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le *Southern Blot* (cf § B.I.2).

Seuls les clones possédant une séquence complémentaire à la sonde donnent un signal en autoradiographie, ce qui permet de les repérer sur la boîte et de les isoler. Pour cela, les phages sont récupérés à l'aide d'un cure-dent et remis en suspension dans du LB/Mg<sup>2+</sup> (0.1 M). Ils sont ensuite dilués afin d'obtenir des plages de lyse bien séparées sur le tapis bactérien.

Après le repérage des clones intéressants, un cure-dent est piqué dans la plage de lyse et mis en contact avec 200 µl de bactéries en phase exponentielle de croissance, ceci en présence de Mg<sup>2+</sup>. Après adsorption du phage par les bactéries (15 min à 37 °C), une culture de 10 ml est incubée. Les bactéries sont infectées par le phage qui va se multiplier, et finalement, provoquer un éclatement des bactéries hôtes. Après addition d'1/10 de volume de chloroforme, les débris bactériens sont éliminés par centrifugation et le surnageant est stocké à +4 °C.

## II.2 Analyse des clones

### II.2.a Purification de l'ADN des phages

A partir du surnageant obtenu après centrifugation et contenant les phages, on procède à une purification de l'ADN. Tout d'abord, un traitement à la RNase A (170 ng/ml) et à la DNase I (50 ng/ml) permet de détruire les ADN et ARN bactériens. Ensuite les capsides des phages sont détruites par la protéinase K (110 ng/ml) en présence d'un détergent : le sarcosyl 1 %. La purification de l'ADN phagique est réalisée par extraction volume à volume au phénol (2 fois), au phénol/chloroforme (1/1) et au chloroforme, suivie d'une précipitation par 2 volumes d'éthanol absolu et 1/10 de volume d'acétate de sodium 2 M. Après une centrifugation à 12 000g pendant 30 min à 4 °C, le culot est séché sous vide et repris dans une solution de TE 1X (0.01 M Tris, 0.001 M EDTA). Cet ADN pourra alors être digéré par les endonucléases de restriction, et analysé par électrophorèse en gel d'agarose.

A ce stade de la préparation, deux cas de figures se présentent :

- a) dans le cas d'un clone d'ADNc, on peut procéder à une préparation du fragment inséré pour le sous-cloner ensuite dans un plasmide comme le pSK+ en vue de le séquencer (cf § B.I.4) ;
- b) dans le cas d'un clone d'ADN génomique, on réalise la carte de restriction du fragment inséré et dans ce cas, il faut préparer de l'ADN phagique en plus grande quantité. Pour cela, on réalise 1 litre de culture. Après éclatement des bactéries hôtes et élimination des débris bactériens, les phages sont précipités par un mélange de polyéthylèneglycol (PEG 6000) (100 g/l de culture initiale) et de NaCl (25 g/l de culture initiale), puis purifiés par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium. Au cours de cette centrifugation, les phages migrent en un anneau de 2 à 3 mm d'épaisseur qui est récupéré par ponction à la seringue. On obtient environ  $10^9$  à  $10^{10}$  phages par ml de milieu. L'ADN est ensuite purifié de la même manière que précédemment.

### II.2.b Cartes de restriction

L'ADN subit des simples et des doubles digestions : 2.5 µg d'ADN sont digérés par les endonucléases de restriction à raison de 10 unités enzymatiques par µg d'ADN, pendant une heure dans les conditions stipulées par le fabricant. Les produits de digestion sont

mélangés à une solution de BB $\phi$  à raison de 5 volumes pour 1 volume. Une partie aliquote de cette solution est déposée sur un gel d'agarose de 2 % qui permet de visualiser les fragments de petite taille (inférieurs à 1 kb), la migration se faisant sous une tension de 100 V en tampon TBE (cf § B.I.1). Le reste l'est sur gel d'agarose de 0.8 % qui permet de visualiser les fragments de taille plus importante (jusqu'à 20-30 kb). Dans ce cas, la migration se fait pendant une nuit à 4 °C sous une tension de 30 V en tampon phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.003 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.007 M). L'ADN est visualisé sous rampe UV grâce au BrEt contenu dans le gel. Enfin, après dénaturation et neutralisation, l'ADN est transféré sur membrane de nitronylon par la technique de *Southern Blot* (cf § B.I.2).

A partir du profil de digestion, une carte de restriction est réalisée par mesure de la taille des différents fragments obtenus.

### **III. Technique d'hybridation *in situ* par sondes fluorescentes ou FISH**

La FISH est une technique de cytogénétique moléculaire basée sur la propriété d'hybridation spécifique entre un ADN cellulaire et des sondes d'ADN contenant une séquence complémentaire d'un gène cible, marquées par un fluorochrome. Cette technique est mise en œuvre dans notre équipe par Christophe Roumier.

#### **III.1 Préparation des sondes**

On réalise tout d'abord une digestion de 1  $\mu$ g d'ADN par l'enzyme de restriction *EcoRI*, suivie d'une précipitation à l'éthanol en présence d'acétate de sodium 3M, puis d'un lavage par de l'éthanol à 70 %. Les fragments d'ADN ainsi obtenus sont marqués à la biotine à l'aide du kit « *Nick Translation : Bionick* » (Gibco BRL) suivant les instructions du fabricant. Les fragments seront par la suite révélés grâce à de l'avidine marquée à un fluorochrome. Les sondes sont de nouveau précipitées avec de l'éthanol absolu en présence d'un dixième de volume d'acétate de sodium (3M), d'ADN COT1 et d'ADN de sperme de saumon afin de saturer les séquences répétitives ou non spécifiques qui pourraient être à l'origine du bruit de fond. Le culot obtenu après centrifugation est lavé par de l'éthanol à 70 % puis repris dans la solution d'hybridation (formamide 50 %, SSC 1X, dextran 10 %, pH 7). Après une incubation de 15 min à 37 °C, la sonde est dénaturée à 76 °C pendant 5 min, puis refroidie dans la glace pendant 5 min afin de la maintenir sous forme simple brin.

### III.2. Préparation des lames

Les étalements cellulaires préalablement fixés par un mélange méthanol 3V/ acide acétique 1V, sont traités par la RNase et la pepsine afin de supprimer les ARNm et de rendre accessibles l'ADN cellulaire. Une post-fixation est ensuite réalisée par le formaldéhyde suivie d'une déshydratation des lames par immersions successives dans des bains d'alcool à 70, 85 puis 100 %.

L'ADN cellulaire est dénaturé par immersion des lames dans une solution de dénaturation (formamide 70 %, SSC 2X, pH 7), puis maintenu sous une forme simple brin à l'aide d'éthanol à 70 % préalablement placé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les lames sont de nouveau déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante.

Après hybridation des sondes sur les prélèvements cellulaires, les lames sont lavées dans des bains de température et de stringence différentes : 3 bains de 5 min dans une solution de formamide 50 % (SSC 2 X, pH7) à  $42^{\circ}\text{C}$  puis 3 bains de 5 min dans une solution de SSC 0.1 X (pH7) à  $60^{\circ}\text{C}$ . Ensuite, intervient la révélation du marquage et amplification du signal à l'aide d'un anticorps anti-avidine biotinylé, lui-même révélé par de l'avidine marqué, suivie de plusieurs lavages et d'une déshydratation. Et enfin, les lames sont lues au microscope à épifluorescence Zeiss Axioskop couplé à une caméra refroidie CCD (pour l'anglais : « *Charge-Coupled Device* », Sensys 1400) elle même reliée à un analyseur d'image permettant de capturer les images grâce au logiciel « *Quips Smart Capture* » de chez VYSIS.

## IV. Techniques de purification et d'analyse des ARN cellulaires totaux

### IV.1 Extraction des ARN cellulaires totaux

Les cellules lavées dans le PBS sont lysées dans une solution d'isothiocyanate de guanidium (isothiocyanate de guanidium 4 M ; Tris/HCl 0.1 M [pH 7.5] ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 1 % 0.14 M ; sarcosyl 0.5 % ; traitement au DEPC 1 %) suivi d'une filtration sur papier filtre Wattman n°1). Les lysats cellulaires sont homogénéisés dans un *dounce* puis par quelques passages au travers d'une aiguille de calibre 21 permettant la cassure de l'ADN génomique. L'homogénat est déposé par la suite sur un coussin de chlorure de césium (CsCl 5.7 M ; EDTA 0.01 M [pH 7.5]) à raison de 9.7 ml pour 3.5 ml, puis soumis à une ultracentrifugation d'environ 18 heures, à  $18^{\circ}\text{C}$  et à 29 500 tours/min (rotor SW41, Beckman). Les ARN

constituant le culot, sont solubilisés dans une solution de TES (Tris/HCl 0.01 M [pH 7.4] ; EDTA 0.005 M ; SDS 0.1 %), puis purifiés par une extraction au chloroforme/butanol (4/1) suivie d'une précipitation dans 2.2 volumes d'éthanol et 1/10 volume d'acétate de sodium 3 M, pendant 2 heures à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Après centrifugation à 12 000 g pendant 45 min à  $4^{\circ}\text{C}$ , les ARN sont repris dans de l'eau déminéralisée et leur concentration est évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm.

## IV.2 Northern Blot

Cette technique consiste en un transfert d'ARN contenu dans un gel d'agarose sur une membrane de nitronylon (Hybond-C Extra, AMERSHAM) sous l'influence d'un courant d'adsorption d'un tampon de transfert. Pour cela, 20  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux sont dénaturés à  $68^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min dans 20  $\mu\text{l}$  de tampon de dénaturation (formamide désionisé 50 % ; formaldéhyde désionisé 17.8 % ; tampon d'électrophorèse 1 %). Deux  $\mu\text{l}$  de la solution BB $\phi$  sont ajoutés, et les ARN sont séparés en gel d'agarose dénaturant (agarose 1.2 % ; tampon d'électrophorèse 1 fois concentré ; formaldéhyde désionisé 6.6 % ; DEPC 1 %), dans le tampon d'électrophorèse (MOPS 0.02 M [pH 7] ; acétate de sodium 0.008 M ; EDTA 0.001 M) sous un courant de 25 mA pendant une nuit. Les ARN sont ensuite transférés du gel sur une membrane de nitronylon par le courant d'adsorption du tampon SSC 20 X, pendant une nuit, puis fixés sur cette membrane par chauffage à  $80^{\circ}\text{C}$  pendant 2 heures.

L'hybridation de la sonde sur la membrane se fait dans les mêmes conditions que pour les membranes de Southern (cf § B.I.2). En ce qui concerne l'élimination de la sonde en excès, la membrane est lavée 2 fois pendant 5 min à l'aide de la solution : SSC 2 X, SDS 0.1 % à la température ambiante et 1 fois par la même solution chauffée à  $65^{\circ}\text{C}$ . Les résultats peuvent alors être analysés à l'aide du *PhosphorImager*.

## IV.3 Les réactions de RT-PCR

Cette technique consiste en une transcription inverse de l'ARN en ADNc à l'aide de la rétrotranscriptase de MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*, Gibco BRL) suivie d'une réaction de polymérisation en chaînes.

Nous avons utilisé cette technique pour la détection de transcrits de fusion des gènes *RhoH* et *LAZ3* chez les patients présentant une t(3;4)(q27;p13). Le tableau M2 présente les différentes amorces utilisées.

La réaction de transcription inverse est réalisée à partir de 15 µg d'ARN dans un volume final de 10 µl. Le mélange réactionnel pour un essai est composé de 1 µl « d'hexamères désoxynucléotidiques aléatoires » (Hexanucleotide Mix 10X, Boehringer), 0.0025 M de dNTP, 0.01 M de DTT, 1 µg de RNase inhibitor (Boehringer) et enfin de 1 µl de tampon, 10 fois concentré, fourni avec l'enzyme. Après une étape de dénaturation par chauffage, 2 min à 90 °C, 200 U de rétrotranscriptase sont introduites dans le mélange qui est alors incubé à 37 °C pendant 1 heure. 1/10 de l'ADNc ainsi synthétisé est utilisé pour la réaction de PCR (cf § I.5.a). Les résultats sont analysés en gel d'agarose.

## V. Expression des protéines RhoH dans les cellules d'insectes SF9

Les cellules *Spodoptera frugiperda* (Sf9) sont des cellules dont la croissance ne nécessitent pas l'apport de CO<sub>2</sub>. La culture de ces cellules se fait dans le milieu de « Grace » (GIBCO) additionné de 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté (Boehringer) à 27 °C dans une atmosphère sèche.

Le changement de milieu se fait 2 fois par semaine. Pour cela, les cellules sont remises en suspension par tapotement sur la boîte. La suspension cellulaire est centrifugée à 300 g pendant 10 min et les cellules sont remises en culture à raison de 2.10<sup>5</sup> cellules par ml de milieu.

Nous avons utilisé le système d'expression en vecteur baculovirus BacPAK commercialisé par Clontech dans le but produire les protéines RhoH de type sauvage, et mutées (mutations N18 et L62) dans les conditions décrites par le fabricant.

Les parties codantes de RhoH (-Wt, -N18 ou -L62) ont été sous-clonées dans le BacPAK9 fourni dans le kit. En amont de ces parties codantes, nous avons inséré la séquence codant le domaine de phosphorylation par une kinase (Arg-Arg-Asp-Ser-Val) suivie par la séquence du VSV-G. Ceci permet d'une part de marquer la protéine avec un groupement <sup>32</sup>P à partir d'ATP<sup>γ</sup><sup>32</sup>P et d'autre part de vérifier la production de cette protéine à l'aide de l'anticorps monoclonal P5D4 dirigé contre le VSV-G. Ces protéines seront appelées K-VSVG-RhoH (-Wt, -N18 ou -L62).

Gène	Exon	Amorce	Séquence	Couple d'amorces	→ Transcrits normaux	Couple d'amorces → Transcrits de fusion
<b>LAZ3</b>	1a 1a	M20 SZ17	5'-ATCCGAGAGCCTCTGCTTATGAGG-3' 5'-GCAAGAAGTTTCTAGGAAAGGCCG-3'	M20-PC8:	exons (1a-2-3)	der 3 <b>SZ60-PC8: <i>RhoH(1a)</i>-LAZ3</b> + <i>RhoH(1a-1b)</i> -LAZ3
	3 3	PC8 SZ20	5'-TGGATACAGCTGTCAGCCGGCG-3' 5'-TGGCGGGTGAAGTGGATACAG-3'			SZ62-PC8: idem (contrôle) <b>CV1-PC8: <i>RhoH(1b)</i>-LAZ3</b> ou <i>RhoH(1a-1b)</i> -LAZ3 SZ19-SZ20: idem (contrôle)
<b>RhoH</b>	1a 1a	SZ60 SZ62	5'-TTGGATTTCTGAGTGGGCAAGGC-3' 5'-GTGAGGCTGTGAGATGGGAGAATC-3'	SZ60-SZ61:	exons (1a-2) + (1a-1b-2)	der 4
	1b 1b	CV1 SZ19	5'-ACACACACTAACCCAACC-3' 5'-TCCTATGAGGAAATCAACCACAGTG-3'	SZ62-SZ61:	idem (contrôle)	<b>SZ17-SZ18: LAZ3-<i>RhoH</i></b>
	2 2 2	SZ61 VZ3 SZ18	5'-GGGAATGCAAGCCAGGTAGGTCTG-3' 5'-AGGACCTCTGACGGCGATTTGC-3' 5'-GGGGAATGCAAGCCAGGTAGGTCTG-3'	CV1-VZ3:	exons (1b-2) ou (1a-1b-2)	

**Tableau M2** : Amorces utilisées pour l'analyse des transcrits de fusion chez les patients

## V.1 Obtention des virus recombinants

A partir du vecteur pSR $\alpha$  contenant les phases codantes des protéines VSVG-RhoH (-Wt, -N18 ou -L62), nous avons créé un site de restriction pour l'enzyme *EcoRI* en 5' du VSVG et un site *XbaI* en 3' de RhoH par PCR. Les produits d'amplification ont été sous-clonés dans le PCRII et les fragments protéines VSVG-RhoH (-Wt, -N18 ou -L62) après digestion par les endonucléases *EcoRI* et *XbaI*. Ils ont ensuite été insérés dans le pBac-Pak9. Après transformation bactérienne, les clones recombinants ont été identifiés grâce à leur profil de restriction pour les endonucléases *EcoRI* et *XbaI*. Ensuite, nous avons préparé les vecteurs pBac-PAK9-VSVG-RhoH (-Wt, -N18, -L62) linéarisés *BamHI-EcoRI* afin d'insérer en 5' les oligonucléotides codant pour le domaine K, qui sont ED51 (5' -GAT CCA TGC GTC GAG ATT CTG TTT CG -3') et ED52-AS (5' -AAT TCG AAA CAG AAT CTC GAC GCA TG -3'). L'incorporation des 2 oligonucléotides a été vérifiée par séquençage et les séquences des ADNc insérés.

Les cellules Sf9 sont cotransfectées avec les plasmides pBac-PAK9-K-VSVG-RhoH-L62 et l'ADN viral BacPAK6 digéré *BsuI*, à l'aide du réactif de transfection fourni dans le kit. Les cellules sont ensuite incorporées dans une couche d'agarose 0.2 % afin d'obtenir un tapis de cellules hôtes dans lequel se développeront des plages de lyse. Après 7 jours d'incubation à 27 °C, des plages de lyse apparaissent dans le tapis de cellules non transfectées. A l'aide d'un cure-dent, différents clones de virus recombinants sont isolés et mis en suspension dans un petit volume de milieu. Des cellules Sf9 sont mises en contact avec ces virus pendant 1 heure à la température ambiante et sont ensuite incubées pendant 7 jours à 27 °C. La présence du gène *RhoH* dans les cellules SF9 a été vérifiée par *Southern Blot* et l'expression des protéines d'intérêt par *Western Blot*.

## V.2 Purification de la protéines K-VSVG-RhoH-L62.

La purification de la protéine K-VSVG-RhoH-L62 se fait à l'aide de la technique de FPLC et à partir de 10<sup>8</sup> cellules infectées (collaboration Dr P. Lefebvre. U549 INSERM Lille). Les cellules sont lavées 2 fois par du PBS, remises en suspension par 10 ml de tampon A (Tris/HCl 0.01 M pH 7.5 ; NaCl 0.05 M ; MgCl<sub>2</sub> 0.01 M ; dithiothréitol (DTT) 0.001 M ; (*p*-amidinophenyl) methanosulfonyl fluoride (PMSF) 10  $\mu$ M) et lysées aux ultrasons. Après

centrifugation à 100 000 g pendant 1 heure, les protéines membranaires sont retrouvées dans le culot, tandis que les protéines cytosoliques non modifiées sont présentes dans le surnageant.

Le surnageant est dilué au ½ dans le tampon B (Tris/HCl 0.02 M pH 8.0 ; MgCl<sub>2</sub> 0.005 M ; EDTA 0.001 M ; DTT 0.001 M) contenant 0.6 % de 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) et passé sur une colonne Mono Q HR5/5 (Pharmacia) équilibrée avec le tampon C (Tris/HCl 0.02 M pH 8.0 ; MgCl<sub>2</sub> 0.005 M ; EDTA 0.001 M ; DTT 0.001 M ; 0.5 % sodium cholate). Après lavage de la colonne par 26 ml du même tampon, l'éluion est effectuée à l'aide d'un gradient linéaire de NaCl (de 0 à 0.1 M) dans le tampon C et des fractions de 1 ml sont récupérées. La présence des protéines RhoH est testée à l'aide de la technique de *Western Blot*.

Le culot contenant les protéines modifiées est remis en suspension à l'aide de 2 ml de tampon B contenant 1 % de sodium cholate, agité pendant 30 min et centrifugé à 100 000 g pendant 1 heure. Les protéines sont alors purifiées à partir du surnageant dilué au ½ dans le tampon B de la même façon que précédemment. La présence des protéines d'intérêt est testée à l'aide de la technique de *Western Blot*.

## **VI. Techniques immunologiques**

### **VI.1 Production d'un anticorps spécifique de RhoH**

Nous avons choisi une séquence de 15 acides aminés (<sub>121</sub>REMGPHRASCVNAME<sub>135</sub>) contenue dans la partie C-terminale de RhoH à l'aide du programme EPIPLOT. Le peptide de synthèse correspondant, couplé au peptide KLH en N-terminal, a été produit par la société Neosystem. Ce peptide a été utilisé pour l'immunisation de deux lapins suivant le protocole décrit par Vaitukaitis (Vaitukaitis *et al.*, 1971). Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Didier Lefranc du Service d'Immunologie de la Faculté de Médecine de Lille.

La technique de *Western Blot* a été utilisée pour vérifier la présence, dans les sera des lapins, d'anticorps reconnaissant la protéine RhoH contenue dans un lysat de cellules SF9 exprimant la protéine RhoH-L62.

### **VI.2 Réactions d'immunofluorescence indirecte**

Les réactions d'immunofluorescence sont utilisées pour l'étude de la localisation subcellulaire des protéines RhoH-Wt -N18 et -L62 dans les cellules Hela, RBL et

BHK. Dans notre cas, ne possédant pas d'anticorps primaire combiné à un fluorochrome, nous réalisons des réactions d'immunofluorescence indirectes.

48 heures après transfection, les cellules adhérentes qui se sont développées sur une lamelle couvre-objet, sont lavées 2 fois par un tampon PBS, puis fixées pendant 20 min à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde à 3 % (3 g dans du PBS ;  $MgCl_2$  0.0001 M ;  $CaCl_2$  0.0001 M). Après un lavage par le tampon PBS, la réaction est stoppée par une solution de  $NH_4Cl$  0.05 M pendant 10 min. Ensuite, un traitement de 2 fois 5 min par une solution de saponine (0.25 % dans du PBS) puis par de la saponine diluée à 0.05 % dans du PBS (PBS/0.05 % saponine) pendant 5 min, permet une perméabilisation de la cellule. Les sites de fixation non spécifiques sont ensuite saturés pendant 30 min par du sérum de porc sain (10 % dans le tampon PBS/0.05 % saponine) avant l'incubation de l'anticorps primaire dilué dans le tampon PBS/0.05 % saponine contenant 5 % de sérum de porc sain (PBS/0.05 % saponine/5 % sérum). L'anticorps secondaire couplé au fluorochrome dilué dans la solution : PBS/0.05 % saponine/5 % sérum est mis en contact avec les cellules après 3 lavages pendant 5 min par du PBS/0.05 % saponine. La réaction se termine par le rinçage des cellules par du PBS et enfin, le montage de la lamelle sur une lame à l'aide du liquide de montage Mowiol (Calbiochem ; 12 % (p/v) ; glycérol 30 % ; Tris/HCl 0.125 M ; pH 8.5).

Les signaux sont visualisés en microscopie confocale.

### **VI.3 Technique de Western Blot**

Cette technique a été utilisée pour vérifier la production de protéine par les cellules procaryotes ou eucaryotes. Elle est basée sur le transfert de protéines à partir d'un gel SDS-PAGE sur une membrane de nitrocellulose sans l'influence d'un courant électrique.

#### *VI.3.a Electrophorèse de protéines en gel dénaturant*

Cette technique a pour principe de séparer des protéines dans un gel de polyacrylamide de 8 à 15 % selon la taille de la protéine d'intérêt, à partir d'un lysat cellulaire ou après purification. Les échantillons sont mélangés à volume égal à une solution de dénaturation (Tris 0.125 M ; Glycérol 20 % ; SDS 2 % ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 2 % ; bleu de bromophénol 1 % [pH 6.8]) puis chauffés à 95 °C pendant 5 min. Les protéines sont ensuite déposées dans les puits du gel de tassement à 5 % de polyacrylamide (rapport acrylamide/bisacrylamide : 50/1.33) dans une solution de Tris-HCl (pH 6.8) contenant 0.1 % de SDS, à côté d'un

marqueur de poids moléculaire de protéines pré-colorés (standards haute gamme, Gibco BRL). Les protéines vont migrer rapidement en ce gel peu réticulé pour se tasser à la limite du gel de résolution. Ce gel a une concentration variant de 8 à 15 % (rapport acrylamide/bisacrylamide : 50/0.235) dans une solution de Tris/HCl 0.375 M (pH 8.9) contenant 0.1 % de SDS. Les protéines sont alors séparées dans ce gel très réticulé, en fonction de leur poids moléculaire. L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 100 V pendant 3 h dans un tampon Tris 0.025 M ; glycine 0.192 M et SDS 1 % ; pH 8.9.

### *VI.3.b Transfert et révélation des protéines par réactions immunologiques*

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Immobilon P membrane, Millipore) en utilisant un appareil d'électrotransfert semi-sec (MilliBlot-Graphite Electroblotter Systems) selon les instructions du fabricant. La membrane est ensuite rincée dans du tampon TBS (Tris 0.01 M ; NaCl 0.15 M [pH 7.6]) pendant 5 min, puis incubée pendant 1 heure à la température ambiante dans la solution TBST (TBS ; 0.1 % de Tween-20) contenant 2 % de glycine et 5 % de lait (TBST-lait) pour la saturation des sites de fixation non spécifiques. L'anticorps primaire dilué (10 µg/ml dans TBST-lait) est incubé pendant 1 nuit à 4 °C. 5 lavages de 5 mn à l'aide de la solution TBST sont ensuite effectués, avant d'incuber le second anticorps couplé à la peroxydase à 0.2 µg/ml dans le TBST-lait (dirigé contre les IgG de l'espèce chez laquelle le premier anticorps a été produit) pendant 3 heures à la température ambiante. La membrane est lavée 5 fois pendant 10 min dans le tampon TBST, et les protéines sont alors révélées en utilisant le système ECL selon les recommandations du fabricant (DuPont). Cette révélation est basée sur l'émission de lumière : le luminol est oxydé, dans les conditions alcalines par la peroxydase (couplée au second anticorps), il se trouve ainsi dans un état excité et va émettre de la lumière. Ce rayonnement lumineux est détecté par une courte exposition (30 secondes à 5 min) sur un film autoradiographique.

## **BIBLIOGRAPHIE**

Adams D.H., Harvath L., Bottaro D.P., Intrante R., Catalano G., Tanaka Y., Strain A., Hubscher S.G. and Shaw S. (1994). Hepatocyte growth factor and macrophage inflammatory protein 1 beta: structurally distinct cytokines that induce rapid cytoskeletal changes and subset-preferential migration in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 7144-7148.

Adamson P., Paterson H.F. and Hall A. (1992). Intracellular localization of the P21rho proteins. *J. Cell Biol.* 119, 617-627.

Aepfelbacher M., Vauti F., Weber P.C. and Glomset J.A. (1994). Spreading of differentiating human monocytes is associated with a major increase in membrane-bound CDC42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 4263-4267.

Akasaka T., Akasaka H., Yonetani N., Ohno H., Ymabe H., fukuhara S. and Okuma M., (1998). Refinement of the BCL2/immunoglobulin heavy chain fusion gene in t(14;18)(q32;q21) by polymerase chain reaction amplification for long targets. *Genes, Chromosomes and Cancer.* 21, 17-29.

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.

Akasaka T., Muramatsu M., Ohno H., Miura I., Tajsumi E., Fukuhara S., Mori T. and Okuma M. (1996). Application of long-distance polymerase chain reaction to detection of junctional sequences created by chromosomal translocation in mature B-cell neoplasms. *Blood.* 88, 985-994.

Albagli O., Deweindt C., Berardin F., Dhordain P., Quief S., Lantoin D., Kerckaert J-P. and Leprince D. (1995a). 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 Differ.* 6, 1495-1503.

Albagli O., Dhordain P., Deweindt C., Lecocq G. and Leprince D. (1995b). The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ.* 6, 1193-1198.

Allen W.E., Jones G.E., Pollard J. and Ridley A.J. (1997). Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J. Cell. Science.* 110, 707-720.

Amati B., Brooks M.W., Levy N., Littlewood T.D., Evan G.I. and Land H. (1993). Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell.* 72, 233-245.

Aspenstrom P. (1997). A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* 7, 479-487.

Avraham H. and Weinberg R.A (1989). Characterization and expression of the human *rhoH12* gene product. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2058-2066.

Ayer D.E., Kretzner L. and Eisenman R.N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell.* 72, 211-222.

Bacon R.A., Salminen A., Ruohola H., Novick P. and Ferro-Novick S. (1989). The GTP-binding protein Ypt1 is required for transport in vitro: the Golgi apparatus is defective in ypt1 mutants. *J. Cell. Biol.* 109, 1015-1022.

Bagrodia S., Dérijard B., Davis R.J. and Cerione R.A. (1995). Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to jun kinase and p38 Mitogen-activated Protein Kinase activation. *J. Biol. Chem.* 270, 27995-27998.

Bar-Sagi D. and Feramisco J.R. (1986). Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by *ras* proteins. *Science.* 233, 1061-1068.

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.

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.

Baueuerle P.A. and Baltimore D. (1996). NF- $\kappa$ B: ten years after. *Cell*. 87, 13-20.

Behrens J., Mareel M.M., Van Roy F.M. and Birchmeier W. (1989). Dissecting tumor cell invasion : epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 108, 2435-2447.

Bos J.L. (1989). *ras* oncogene in human cancer: a review. *Cancer Research*. 19, 4682-4689.

Bower M., Parry P., Gibbons B., Amess J., Lister T.A., Young B.D. and Evans G.A. (1994). Human trithorax gene rearrangements in therapy-related acute leukemia after etoposide treatment. *Leukemia*. 8, 226-229.

Braga V.M.M., Machesky L.M., Hall A. and Hotchin N.A. (1997). The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* 137, 1421-1431.

Burbelo P.D., Drechsel D. and Hall A. (1995). A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* 270, 29071-29074.

Bussolino F., Di Renzo M.F., Ziche M., Bochietto E., Olivero M., Naldini L., Gaudino G., Tamagone L., Coffe A. and Comoglio P.M. (1992). Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J. Cell Biol.* 119, 629-641.

Burridge K. (1999). Crosstalk between Rac and Rho. *Science*. 283, 2028-2029.

Butcher E.C. and Picker L.J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 272, 60-66.

Cannizzaro L.A., Madaule P., Hecht F., Axel R., Croce C.M. and Huebner K. (1990). Chromosomal localization of human ARH genes, a ras-related gene family. *Genomics*. 6, 197-203.

Caron E. and Hall A. (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different rho GTPases. *Science*. 282, 1717-1721.

Cerione R.A. and Zheng Y. (1996). The Dbl family of oncogenes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8, 216-222.

Chant J. and Stowers L. (1995). GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more. *Cell*. 81, 1-4.

Chardin P. (1993). Structural conservation of Ras-related proteins and its functional implications. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 108, 160-176.

Chardin P. (1999). Rnd proteins: a new family of Rho-related proteins that interfere with the assembly of filamentous actin structures and cell adhesion. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. 22, 39-50.

Chardin P., Boquet P., Madaule P., Popoff M.R., Rubin E.J. and Gill D.M. (1989). The mammalian G protein *rhoC* is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J.* 8, 1087-1092.

Chardin P. and Tavitian A. (1989). Coding sequences of human *ralA* and *ralB* cDNAs. *Nucleic Acids Res.* 17, 4380.

Chavrier P., Simons K., Zerial M. (1992). The complexity of the rab and rho GTP-binding protein subfamilies revealed by a PCR cloning approach. *Gene*. 112, 261-264.

Chen W., Butler M., Rao P.H., Chaganti S.R., Louie D.C., Dalla-Favera R. and Chaganti R.S. (1998). The t(2;3)(q21;q27) translocation in non-Hodgkin's lymphoma displays BCL6 mutations in the 5' regulatory region and chromosomal breakpoints distant from the gene. *Oncogene*. 17, 1717-1722.

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- $\alpha$  locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukemia. *EMBO J.* 12, 161-1167.

Chen Z., Chen S.J. and Wang Z.Y. (1994). Retinoic acid and acute promyelocytic leukemia: a model of targeting treatment for human cancer. *C. R. Acad. Sci. III.* 317, 1135-1141.

Cimino G., Moir D.T., Canaani O., Williams K., Crist W.M., Katzav S., Cannizzaro L., Lange B., Nowell P.C., Croce C.M. and Canaani E. (1991). Cloning of *ALL-1*, the locus involved in leukemias with the t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), and t(11;19)(q23;p13) chromosome translocations. *Cancer Research.* 51, 6712-6714.

Corral J., Forster A., Thompson S., Lampert F., Kaneko Y., Slater R., Kroes W.G., van der Schoot C.E., Ludwig W.D., Karpas A., Pocock C., Cotter F. and Rabbitts T.H. (1993). Acute leukemias of different lineages have similar *MLL* gene fusions encoding related chimeric proteins resulting from chromosomal translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 8538-8542.

Corral J., Lavenir I., Impey H., Warren A.J., Forster A., Larson T.A., Bell S., McKenzie A.N.J., King G. and Rabbitts T.H. (1996). An *Mll-AF9* fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell.* 85, 853-861.

Coso O.A., Chiariello M., Yu J.-C., Teramoto H., Crespo P., Xu N., Miki T. and Gutkind S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell.* 81, 1137-1146.

Courjal F., Chuchana P., Theillet C. and Fort P. (1997). Structure and chromosomal assignment to 22q12 and 17qter of the ras-related Rac2 and Rac3 human genes. *Genomics.* 44, 242-246.

Cox D., Chang P., Zhang Q., Reddy P.G., Bokoch G.M. and Greenberg S. (1997). Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J. Exp. Med.* 186, 1487-1494.

Daley G.Q., Van Etten R.A. and Baltimore D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210<sup>bcr/abl</sup> gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 247, 824-830.

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 E., Quief S., Ben Jilany K.E., Kerckaert J-P. and Hagège D. (1996). Molecular cloning and structural analysis of cDNAs that encode 3 small GTP-binding proteins from sugar beet. *C. R. Acad. Sci. Paris*. 319, 91-97.

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.

Dear T.N., Sanchez-Garcia I. and Rabbitts T.H. (1993). The HOX11 gene encodes a DNA-binding nuclear transcription factor belonging to a distinct family of homeobox genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90, 4431-4435.

del Peso L., Hernandez-Alcoceba R., Embade N., Carnero A., Esteve P., Paje C. and Lacal J.C. (1997). Rho proteins induce metastatic properties in vivo. *Oncogene*. 15, 3047-3057.

de Thé H., Chomienne C., Lanotte M., Degos L. and Dejean A. (1990). The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor  $\alpha$  gene to a novel transcribed locus. *Nature*. 347, 558-561.

Deweindt C., Kerckaert J-P., Tilly H., Quief S., Nguyen V.C. and Bastard C. (1993). Cloning of a breakpoint cluster region at band 3q27 involved in human non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Chromosomes 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 homomerisation *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.

Dhordain P., Lin R.J., Quief S., Lantoine D., Kerckaert J-P., Evans R.M. and Albagli O. (1998). The LAZ3(BCL6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Res*. 26, 4645-4651.

Djabali M., Selleri L., Parry P., Bower M., Young B.D. and Evans G.A. (1992). A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukemias. *Nat. Genet*. 2, 113-118.

Donaldson J.G. and Klausner R.D. (1994). ARF: a key regulator switch in membrane traffic and organelle structure. *Curr. Opin. Cell Biol*. 6, 527-532.

Dorseuil O., Reibel L., Bokoch G.M., Camonis J. and Gacon G. (1996). The Rac target NADPH oxidase p67<sup>phox</sup> interacts preferentially with Rac2 rather than Rac1. *J. Biol. Chem*. 271, 83-88.

Drexler H.G., MacLeod R.A.F., Borkhardt A. and Janssen J.W.G. (1995). Recurrent chromosomal translocations and fusion genes in leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia*. 9, 480-500.

Drivas G.T., Shih A., Coutavas E., Rush M.G. and D'Eustachio P. (1990). Characterization of four novel *ras*-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1793-1798.

D'Souza-Schorey C., Boshans R.L., McDonough M., Stahl P.D. and Van Aelst L. (1997). A role for POR1, a Rac-1 interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J.* 16, 5445-5454.

D'Souza-Schorey C., Boettner B. and Van Aelst L. (1998). Rac regulates integrin-mediated spreading and increased adhesion of T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3936-3946.

Dube I.D. et al., (1991). A novel homeobox gene lies at the chromosome 10 breakpoint in lymphoid neoplasias with chromosomal translocation t(10;14). *Blood.* 78, 2996-3003.

Dusi S., Donini M. and Rossi F. (1996). Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p140phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47<sub>phox</sub> or p67<sub>phox</sub>. *Biochem. J.* 314, 409-412.

Dutartre H., Davoust J., Gorvel J-P. and Chavrier P. (1996). Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *J. Cell. Sci.* 109, 367-377.

Ellis R.W., Defeo D., Shih T.Y., Gonda M.A., Young H.A., Tsuchida N., Lowy D.R. and Scolnick E.M. (1981). The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature.* 292, 506-511.

Fanger G.R., Johnson N.L. and Johnson G.L. (1997). MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J.* 16, 4961-4972.

Fasano O., Aldrich T., Tamanoi F., Taparowsky E., Furth M. and Wigler M. (1984). Analysis of the transforming potential of the human H-ras gene by random mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 4008-4012.

Fitzgerald T.J., Neale G.A., Raimondi S.C. and Goorha R.M. (1991). c-tal, a helix-loop-helix protein, juxtaposed to the T-cell receptor-beta chain gene by a reciprocal chromosomal translocation : t(1;7)(p32;q35). *Blood*. 78, 2686-2695.

Foster R., Hu K-Q., Lu Y., Nolan K.M., Thissen J. and Settleman J. (1996). Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and *in vivo* farnesylation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2689-2699.

François S., Delabesse E., Barabger L., Dautel M., Foussard C., Boasson M., Blanchet O., Bernard O., Macintyre E.A. and Ifrah N. (1998). Deregulated expression of the TAL1 gene by t(1;5)(p32;31) in patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 23, 36-43.

Fritz G., Just I. and Kaina B. (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int. J. Cancer*. 81, 682-687.

Frost J.A., Xu S., Hutchison M.R., Marcus S. and Cobb M.H. (1996). Actions of Rho family small G proteins and p21-Activated Protein Kinase on Mitogen-Activated Protein Kinase family members.. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3707-3713.

Gabig T.G., Crean C.D., Mantel P.L and Rosli R. (1995). Function of wild-type or mutant Rac2 and Rap1a GTPases in differentiated HL60 cell NADPH oxidase activation. *Blood*. 85, 804-811.

Galiègue-Zouitina S., Quief S., Hildebrand M-P., Denis C., Detournignies L., Lai J-L. and Kerckaert J-P. (1999). Nonrandom fusion of *L-Plastin(LCPI)* and *LAZ3(BCL6)* genes by t(3;13)(q27;q14) chromosome translocation in two cases of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 26, 97-105.

Galiègue-Zouitina S., Quief S., Hildebrand M-P., Denis C., Lecocq G., Collyn-d'Hooghe M., Bastard C., Yuille M., Dyer M.J.S. and Kerckaert J-P. (1996). The B cell transcriptional coactivator *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.

Gallwitz D., Donath C. and Sander C. (1983). A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-ahs/bas proto-oncogene product. *Nature*. 306, 704-707.

Garrett M.D., Self A.J., van Oers C. and Hall A. (1989). Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/R-ras and rho regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 264, 10-13.

Gauwerky C.E. and Croce C.M. (1993). Chromosomal translocations in leukemia. *Semin. Cancer Biol.* 4, 333-340.

Gerwins P., Blank J.L. and Johnson J.L. (1997). Cloning of a novel Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 8288-8295.

Gherardi E. and Stoker M. (1991). Hepatocyte growth factor-scatter factor : mitogen, motogen, and met. *Cancer Cells.* 6, 227-232.

Gomez J., Martinez-A C., Giry M., Garcia A. and Rebollo A. (1997). Rho prevents apoptosis through Bcl-2 expression: implications for interleukin-2 receptor signal transduction. *Eur. J. Immunol.* 27, 2793-2799.

Gorvel J.P., Chang T.C., Boretto J., Azuma T. and Chavrier P. (1998). Differential properties of D4/LyGDI versus RhoGDI : phosphorylation and rho GTPase selectivity. *FEBS Lett.* 422, 269-273.

Guasch R.M., Scambler P., Jones G.E. and Ridley A.J. (1998). RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4761-4771.

Guillemot J-C., Montcourrier P., Vivier E., Davoust J. and Chavrier P. (1997). Selective control of membrane ruffling and actin plaque assembly by the Rho GTPases Rac1 and CDC42 in FcεRI-activated rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *J. Cell Science.* 110, 2215-2225.

Haataja L., Groffen J. and Heisterkamp N. (1997). Characterization of *RAC3*, a novel member of the Rho family. *J. Biol. Chem.* 272, 20384-20388.

- Habets G.G.M., Scholtes E.H.M., Zuydgeest D., van der Kammen R.A., Stam J.C., Berns A. and Collard J.G. (1994). Identification of an invasion-inducing gene, *Tiam-1*, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell*. 77, 537-549.
- Hamdane M., David-Cordonnier M-H. and D'Halluin J-C. (1997). Activation of p65 NF- $\kappa$ B protein by p210<sup>BCR-ABL</sup> in a myeloid cell line (P210<sup>BCR-ABL</sup> activates p65 NF- $\kappa$ B). *Oncogene*. 15, 2267-2275.
- Hill C.S., Wynne J. and Treiman R (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and Cdc42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*. 81, 1159-1170.
- Hirai A., Nakamura S., Noguchi Y., Yasuda T., Kitagawa M., Tatsuno I., Oeda T., Tahara K., Terano T., Narumiya S., Kohn L.D. and Saito Y. (1997). Geranylgeranyl Rho small GTPase(s) are essential for the degradation of p27<sup>Kip1</sup> and facilitate the progression from G<sub>1</sub> to S phase in growth-stimulated Rat FRTL-5 cells. *J. Biol. Chem*. 272, 13-16.
- Hirata K., Kikuchi A., Sasaki T., Kuroda S., Kaibuchi K., Matsuura Y., Seki H., Saida K. and Takai Y. (1992). Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J. Biol. Chem*. 267, 8719-8722.
- Holsinger L.J., Graef I.A., Swat W., Chi T., Bautista D.M., Davidson L., Lewis R.S., Alt F.W. and Crabtree G.R. (1998). Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr. Biol*. 8, 563-572.
- Hordijk P.L., ten Klooster J.P., van der Kammen R.A., Michiels F., Oomen L.C.J.M. and Collard J.G. (1997). Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science*. 278, 1464-1466.
- Ishizaki T., Maekawa M., Fujisawa K., Okawa K., Iwamatsu A., Fujita A., Watanabe N., Saito Y., Kakizuka A., Morii N. and Narumiya S. (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J*. 15, 1885-1893.

Jähner D. and Hunter T. (1991). The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3682-3690.

Jalink K., van Corven E.J., Hengeveld T., Morii N., Narumiya S. and Moolenaar W.H. (1994). Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J. Cell. Biol.* 126, 801-810.

Jiménez B., Arends M., Esteve P., Rosario P., Sanchez R., Ramon y Cajal S., Wyllie A. and Lacal J.C. (1995). Induction of apoptosis in NIH3T3 cells after serum deprivation by overexpression of rho-p21, a GTPases protein of the ras superfamily. *Oncogene*. 10, 811-816.

Kaelin W.G., Krek W., Sellers W.R., DeCaprio J.A., Ajchenbaum F., Fuchs C.S., Chittenden T., Li Y., Farnham P.J., Blanar M.A., Livingston D.M. and Flemington E.K. (1992). Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell*. 70, 351-364.

Karin M. (1995). The regulation of AP-1 activity by Mitogen-activated protein Kinases. *J. Biol. Chem.* 270, 16483-16486.

Katzav S., Martin-Zanca D. and Barbacid M. (1989). vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J.* 8, 2283-2290.

Keely P.J., Westwick J.K., Whitehead I.P., Der C.J. and Parise L.V. (1997). Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature*. 390, 632-636.

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

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 lymphomas. *Nature Genetics*. 5, 66-69.

Khosravi-Far R., Solski P.A., Clark G.J., Kinch M.S. and Der C.J. (1995). Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6443-6453.

Khosravi-Far R., White M.A., Westwick J.K., Solski P.A., Chrzanowska-Wodnicka M., Van Aelst L., Wigler M.H. and Der C.J. (1996). Oncogenic Ras activation of Raf/Mitogen-Activated protein kinase-independent pathways is sufficient to cause tumorigenic transformation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3923-3933.

Kimura K., Ito M., Amano M., Chihara K., Fukata Y., Nakafuku M., Yamamori B., Feng J., Nakano T., Okawa K., Iwamatsu A. and Kaibuchi K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-Kinase). *Science*. 273, 245-248.

Kirchhausen T. and Rosen F.S. (1996). Disease mechanism: unravelling Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr. Biol.* 6, 676-678.

Kishi K., Sasaki T., Kuroda S., Itoh T. and Takai Y. (1993). Regulation of cytoplasmic division of *Xenopus* embryo by *rho* p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (*rho* GDI). *J. Cell Biol.* 120, 1187-1195.

Kobayashi K., Kuroda S., Fukata M., Nakamura T., Nagase T., Nomura N., Matsuura Y., Yoshida-Kubomura N., Iwamatsu A. and Kaibuchi K. (1998). p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J. Biol. Chem.* 273, 291-295.

Koken M.H., Reid A., Quignon F., Chelbi-Alix M.K., Davies J.M., Kabarowski J.H., Zhu J., Dong S., Chen S., Chen Z., Tan C.C., Licht J., Waxman S., de The H. and Zelent A. (1997). Leukemia-associated retinoic acid receptor alpha fusion partners, PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 10255-10260.

Komuro R., Sasaki T., Takaishi K., Orita S. and Takai Y. (1996). Involvement of Rho and Rac small G proteins and Rho GDI in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytosis from PC12 cells. *Genes Cells*. 1, 943-951.

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

Kozma R., Ahmed S., Best A. and Lim L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1942-1952.

Kozma R., Sarner S., Ahmed S. and Lim L. (1997). Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1201-1211.

Kuroda S., Fukata M., Kobayashi K., Nakafuku M., Nomura N., Iwamatsu A. and Kaibuchi K. (1996). Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J. Biol. Chem.* 271, 23363-23367.

Lamarche N., Tapon N., Stowers L., Burbelo P.D., Aspenström P., Bridges T., Chant J. and Hall A. (1996). Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of  $\text{p65}^{\text{PAK}}$  and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell*. 87, 519-529.

Lamaze C., Chuang T-H., Terlecky L.J., Bokoch G.M. and Schmid S.L. (1996). Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature*. 382, 177-179.

Lang P., Guizani L., Vitté-Mony I., Stancou R., Dorseuil O., Gacon G. and Bertoglio J. (1992). ADP-ribosylation of the *ras*-related, GTP-binding protein RhoA inhibits lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 267, 11677-11680.

Larsen C-J., Séité P. et Berger R. (1994). Données récentes sur les mécanismes de la translocation chromosomique t(14;18)(q21;q32) activant le gène BCL2. *médecine/sciences*. 10, 1127-1135.

Laudanna C., Campbell J.J. and Butcher E.C. (1996). Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science*. 271, 981-983.

Lavau C., Szilvassy S.J., Slany R. and Cleary M.L. (1997). Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL. *EMBO J*. 14, 4226-4237.

Le Gallic L. and Fort P. (1997). Structure of the human ARHG locus encoding the Rho/Rac-like RhoG GTPase. *Genomics*. 42, 157-160.

Leung T., Chen X-Q., Manser E. and Lim L. (1996a). The p160 RhoA-binding kinase ROK $\alpha$  is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol. Cell. Biol*. 16, 5313-5327.

Leung T., Manser E., Tan L. and Lim L. (1996b). A novel Serin/Threonin kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J. Biol. Chem*. 270, 29051-29054.

Lichty B.D., Ackland-Snow J., Noble L., Kamel-Reid S., and Dube I.D. (1995). Dysregulation of HOX11 by chromosome translocations in T-cell acute lymphoblastic leukemia: a paradigm for homeobox gene involvement in human cancer. *Leuk. Lymphoma*. 16, 209-215.

Lin R., Bagrodia S., Cerione R. and Manor D. (1997). A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation. *Curr. Biol*. 7, 794-797.

Lo Coco F., Ye B.H., Lista F., Corradini P., Offit K., Knowles D.M., Chaganti R.S. and Dalla-Favera R. (1994). Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 83, 1757-1759.

Lowe D.G. and Moran L.A. (1986). Molecular cloning and analysis of DNA complementary to three mouse Mr = 68,000 heat shock protein mRNAs. *J. Biol. Chem.* 261, 2102-2112.

Madaule P. and Axel R. (1985). A novel ras-related gene family. *Cell.* 41, 31-40.

Madaule P., Furuyashiki T., Reid T., Ishizaki T., Watanabe G., Morii N. and Narumiya S. (1995). A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS Lett.* 377, 243-248.

Maguire J., Santoro T., Jensen P., Siebenlist U., Yewdell J. and Kelly K. (1994). Gem: an induced, immediate early protein belonging to the Ras family. *Science.* 265, 241-244.

Manser E., Leung T., Salihuddin H., Zhao Z-S. and Lim L. (1994) A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature.* 367, 40-46.

Martin G.A., Bollag G., McCormick F. and Abo A. (1995). A novel serine kinase activated by rac1/CDC42Hs-dependent autophosphorylation is related to PAK65 and STE20. *EMBO J.* 14, 1970-1978.

Massol P., Montcourrier P., Guillemot J-C. and Chavrier P. (1998). Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO J.* 17, 6219-6229.

Matsushime H., Roussel M.F., Ashmun R.A. and Sherr C.J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell.* 65, 701-713.

Melchior F., Paschal B., Evans J. and Gerace L. (1993). Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential factor. *J. Cell. Biol.* 123, 1649-1659.

Mellentin J.D., Smith S.D. and Cleary M.L. (1989). lyl-1, a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia, codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif. *Cell.* 58, 77-83.

Melnick A. and Licht J.D. (1999). Deconstructing a disease: RAR $\alpha$ , its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 93, 3167-3215.

Michiels F., Habets GG.M., Stam J., van der Kammen R.A and Collard J.G. (1995). A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature*. 375, 338-340.

Miki T., Kawamata N., Kurosawa S. and Aoki N. (1994). Gene involved in the 3q27 translocation associated with B-cell lymphoma, *BCL5*, encodes a Krüppel-like zinc-finger protein. *Blood*. 83, 26-32.

Miki H., Sasaki T., Takai Y. and Takenawa T. (1998). Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*. 391, 93-96.

Minden A., Lin A., Claret F-X., Abo A. and Karin M. (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-jun transcription activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*. 81, 1147-1157.

Miyamoto A., Cui X., Naumovski L., Cleary M.L. (1996). Helix-loop-helix proteins LYL1 and E2a form heterodimeric complexes with distinctive DNA-binding properties in hematolymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2394-2401.

Mizuno T., Kaibuchi K., Yamamoto T., Kawamura M., Sakoda T., Fujioka H., Matsuura Y. and Takai Y. (1991). A stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21 is active on the post-translational processed form of c-Ki-ras p21 and rhoA p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88, 6442-6446.

Montaner S., Perona R., Saniger L. and Lacal J.C. (1999). Activation of serum response factor by RhoA is mediated by the nuclear factor-kappaB and C/EBP transcription factors. *J. Biol. Chem.* 274, 8506-8515.

Morii N., Teru-uchi T., Tominaga T., Kumagai N., Kozaki S., Ushikubi F. and Narumiya S. (1992). A rho gene product in human blood platelets. *J. Biol. Chem.* 267, 20921-20926.

Moscow J.A., He R., Gnarr J.R., Knutsen T., Weng Y., Zhao W-P., Whang-Peng J., Linehan M. and Cowan K.H. (1994). Examination of human tumors for *rhoA* mutations. *Oncogene*. 9, 189-194.

Munemitsu S., Innis M.A., Clarck R., McCormick F., Ullrich A. and Polakis P. (1990). Molecular cloning and expression of a G25K cDNA, the human homolog of the yeast cell cycle gene *CDC42*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5977-5982.

Murphy C., Saffrich R., Grummt M., Gournier H., Rybin V., Rubino M., Auvinen P., Lütcke A., Parton R.G. and Zerial M. (1996). Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature*. 384, 427-432.

Nagata K., Driessens M., Lamarche N., Gorski J.L. and Hall A. (1998). Activation of G1 progression, JNK mitogen-activated protein kinase, and actin filament assembly by the exchange factor FGD1. *J. Biol. Chem.* 273, 15453-15457.

Nishimoto T. (1999). A new role of ran GTPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 571-574.

Nishiyama T., Sasaki T., Takaishi K., Kato M., Yaku H., Araki K., Matura Y. and Takai Y. (1994). *rac* p21 is involved in insulin-induced membrane ruffling and *rho* p21 is involved in hepatocyte growth factor- and 12-o-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate (TPA)-induced membrane ruffling in KB cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2447-2456.

Nobes C.D. and Hall A. (1995). Rho, Rac, and CDC42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 81, 53-62.

Nobes C.D., Lauritzen I., Mattei M.G., Paris S., Hall A. and Chardin P. (1998). A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J. Cell. Biol.* 141, 187-197.

Nowell P.C. and Hungerford D.A. (1960). A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* 25, 85-109.

- Nusrat A., Giry M., Turner J.R., Colgan S.P., Parkos C.A., Carnes D., Lemichez E., Boquet P. and Madara J.L. (1995). Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 10629-10633.
- Olson M.F., Ashworth A. and Hall A. (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G<sub>1</sub>. *Science.* 269, 1270-1272.
- Pasteris N.G., Cadle A., Logie L.J., Porteous M.E.M., Schwartz C.E., Stevenson R.E., Glover T.W., Wilroy R.S. and Gorski J.L. (1994). Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor. *Cell.* 79, 669-678.
- Paterson H.F., Self A.J., Garrett M.D., Just I., Aktories K. and Hall A. (1990). Microinjection of recombinant p21<sup>rho</sup> induces rapid changes in cell morphology. *J. Cell Biol.* 111, 1001-1007.
- Penninger J.M. and Crabtree G.R. (1999). The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell.* 96, 9-12.
- Perona R., Esteve P., Jiménez B., Ballesteros R.P., y Cajal S.R. and Lacal J.C. (1993). Tumorigenic activity of *rho* genes from *Aplysia californica*. *Oncogene.* 8, 1285-1292.
- Perona R., Montaner S., Saniger L., Sanchez-Pérez I., Bravo R. and Lacal J.C. (1997). Activation of the nuclear factor-kB by Rho, Cdc42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev.* 11, 463-475.
- Pizon V., Chardin P., Ierosey I., Olofsson B. and Tavittian A. (1988). Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the "effector" region. *Oncogene.* 3, 201-204.
- Polakis P.G., Weber R.F., Nevins B., Didsbury J.R., Evans T. and Snyderman R. (1989). Identification of the ral and rac1 gene products, low molecular mass GTP-binding proteins from human platelets. *J. Biol. Chem.* 264, 16383-16389.

- Pollock J., Grisolano J., Goda P., Westervelt P. and Ley T. (1997). Development of acute promyelocytic leukemia (APML) in transgenic mice expressing both the PML-RAR $\alpha$  and the reciprocal fusion protein, RAR $\alpha$ -PML. *Blood*. 90, 320-
- Prendergast G.C., Khosravi-Far R., Solski P.A., Kurzawa H., Lebowitz P.F. and Der C.J. (1995). Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene*. 10, 2289-2296.
- Qiu R-G., Abo A., McCormick F. and Symons M. (1997). Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3449-3458.
- Qiu R-G., Chen J., Kim D., McCormick F. and Symons M. (1995a). An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature*. 374, 457-4459.
- Qiu R-G., Chen J., McCormick F. and Symons M. (1995b). A role for Rho in Ras transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 11781-11785.
- Rabbitts T.H. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*. 372, 143-149.
- Rabbitts T.H. and Boehm T. (1991). Structural and functional chimerism results from chromosomal translocation in lymphoid tumors. *Adv Immun.* 50, 119-146.
- Reddy E.P., Reynolds R.K., Santos E. and Barbacid M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*. 300, 149-152.
- Reibel L., Dorseuil O., Stancou R., Bertoglio J. and Gacon G. (1991). A hemopoietic specific gene encoding a small GTP binding protein is overexpressed during T cell activation. *Bioch. Bioph. Res. Com.* 175, 451-458.
- Reid T., Furuyashiki T., Ishizaki T., Watanabe G., Watanabe N., Fujisawa K., Morii N., Madaule P. and Narumiya S. (1996). Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a Serine/Threonine kinase, PKN, and Rhophilin in the Rho-binding domain. *J. Biol. Chem.* 271, 13556-13560.

Reynet C. and Kahn C.R. (1993). Rad: a member of the Ras family overexpressed in muscle of type II diabetic humans. *Science*. 262, 1441-1444.

Ridley A.J. (1997). The GTP-binding protein Rho. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29, 1225-1229.

Ridley A.J., Comoglio P.M. and Hall A. (1995). Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by ras, rac, and rho in MDCK cells. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1110-1122.

Ridley A.J. and Hall A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 70, 389-399.

Ridley A.J., Paterson H.F., Johnston C.L., Diekmann D. and Hall A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 70, 401-410.

Rimokh R., Rouault J-P., Samarut C., Tigaud I., Lapillonne H. et Magaud J-P. (1995). Cycline D1 et cancer, l'exemple des hémopathies B malignes associées à la translocation t(11;14)(q13;q32). *Hématologie*. 3, 247-254.

Rosen E.M., Goldberg I.D., Liu D., Setter E., Donovan M.A., Bhargava M., Riss M. and Kacinski B.M. (1991). Tumor necrosis factor stimulates epithelial tumor cell motility. *Cancer Res.* 51, 5315-5321.

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

Roumier C., Galiègue-Zouitina S., Bastard C., Soenen V., Lai J-L., Kerckaert J-P., Cooson A., Fenaux P. and Preudhomme C. (1999). FISH analysis with a YAC probe on interphase and metaphase cells improves detection of LAZ3/BCL6 disruption in non-Hodgkin's lymphoma. *J. Hemat. Sous presse*.

Roumier C., Preudhomme C., Dallery-Prudhomme E., Hildebrand M.P., Lai J-L., Fenaux P., Kerckaert J-P. and Galiègue-Zouitina S. (1997). Non-random chromosomal rearrangement, at 4p13, of the *RhoH/TTF* gene, encoding a small GTPase restrictively expressed in hematopoietic tissue, in non-hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Blood*. 90, suppl I, 557a.

Roux P., Gauthier-Rouvière C., Doucet-Brutin S. and Fort P. (1997). The small GTPases Cdc42Hs, Rac1 and RhoG delineate Raf-independent pathways that cooperate to transform NIH3T3 cells. *Cur. Biol.* 7, 629-637.

Rowley J.D., Diaz M.O., Espinosa III R., Patel Y.D., van Melle E., Ziemin S., Taillon-Miller P., Lichter P., Evans G.A., Kersey J.H., Ward D.C., Domer P.H. and Le Beau M.M. (1990). Mapping chromosome band 11q23 in human acute leukemia with biotinylated probes: identification of 11q23 translocation breakpoints with a yeast artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 9358-9362.

Rubin E.J., Gill D.M., Boquet P. and Popoff M.R. (1988). Functional modification of a 21-kilodalton G protein when ADP-ribosylated by exoenzyme C3 of *Clostridium botulinum*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 418-426.

Rubnitz J.E., Link M.P., Shuster J.J., Carroll A.J., Hakami N., Frankel L.S., Pullen D.J. and Cleary M.L. (1994). Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a pediatric oncology group study. *Blood*. 84, 570-573.

Salvati P.D., Ranford P.R., Ford J. and Kees U.R. (1995). HOX11 expressed in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with T-cell phenotype. *Oncogene*. 11, 1333-1338.

Seeburg P.H., Colby W.W., Capon D.J., Goeddel D.V. and Levinson A.D. (1984). Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. *Nature*. 312, 71-75.

Shimizu F., Watanabe T.K., Okuno S., Omori Y., Fujiwara T., Takahashi E. and Nakamura Y. (1997). Isolation of a novel human cDNA (rhoHP1) homologous to rho genes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1351, 13-16.

Shinjo K., Koland J.G., Hart M.J., Narasimhan V., Johnson D.I., Evans T. and Cerione R.A. (1990). Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 9853-9857.

Skorski T., Wlodarski P., Daheron L., Salomoni P., Nieborowska-Skorska M., Majewski M., Wasik M. and Calabretta B. (1998). BCR/ABL-mediated leukemogenesis requires the activity of the small GTP-binding protein Rac. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 11858-11862.

Springer T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 76, 301-314.

Stam J.C., Mic-hiels F., van der Kammen R.A., Moolenaar W.H. and Collard J.G. (1998). Invasion of T-lymphoma cells: cooperation between Rho family GTPases and lysophospholipid receptor signaling. *EMBO J*. 17, 4066-4074.

Stomatopoulos K., Kosmas C., Belessi C., Kyriazopoulos P., Papadaki T., Anagnostou D. and Loukopoulos D. (1999). Molecular analysis of *BCL1/IgH* junctional sequences in mantle cell lymphoma: potential mechanism of the t(11;14) chromosomal translocation. *British J. of Haematology*. 105, 190-197.

Stowers L., Yelon D., Berg L.J. and Chant J. (1995). Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 5027-5031.

Sulciner D.J., Irani K., Yu Z-X., Ferrans V.J., Goldschmidt-Clermont P. and Finkel T. (1996). Rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF- $\kappa$ B activation. *Mol. Cell. Biol*. 16, 7115-7121.

Takaishi K., Kikuchi A., Kuroda S., Kotani K., Sasaki T. and Takai Y. (1993). Involvement of *rho* p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in cell motility. *Mol. Cell. Biol*. 13, 72-79.

Takaishi K., Sasaki T., Kato M., Yamochi W., Kuroda S., Nakamura T., Takeichi M. and Takai Y. (1994). Involvement of *Rho* p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. *Oncogene*. 9, 273-279.

Takekawa M., Posas F. and Saito H. (1997). A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *EMBO J.* 16, 4973-4982.

Teramoto H., Coso O.A., Miyata H., Igishi T., Miki T. and Gutkind J.S. (1996a). Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/Stress-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 27225-27228.

Teramoto H., Crespo P., Coso O.A., Igishi T., Xu N. and Gutkind J.S. (1996b). The small GTP-binding protein Rho activates c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases in human kidney 293T cells. *J. Biol. Chem.* 271, 25731-25734.

Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

Tigaud I., Tigaud J-D., Rouault J-P., Rimokh R., Samarut C. et Magaud J-P. (1995). Remaniement de la bande chromosomique 11q23 dans les hémopathies malignes. *Hématologie*. 4, 319-324.

Toker A. (1998). The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10, 254-261.

Tokman M.G., Porter R.A. and Williams C.L. (1997). Regulation of cadherin-mediated adhesion by the small GTP-binding protein Rho in small cell lung carcinoma cells. *Cancer Research*. 57, 1785-1793.

Tominaga T., Sugie K., Hirata M., Morii N., Fukata J., Uchida A., Imura H. and Narumiya S. (1993). Inhibition of PMA-induced, LFA-1-dependent lymphocyte aggregation by ADP ribosylation of the small molecular weight GTP binding protein, *rho*. *J. Cell Biol.* 120, 1529-1537.

Touchot N., Chardin P. and Tavitian A. (1987). Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 8210-8214.

Treisman R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 205-215.

Vaitukaitis J., Robbins J.B., Nieschlag E. and Ross G.T. (1971). A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33, 988-991.

Valencia A., Chardin P., Wittinghofer A. and Sander C. (1991). The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry.* 30, 4637-4648.

Vallian S., Gaken J.A., Trayner I.D., Gingold E.B., Kouzarides T., Chang K.S. and Farzaneh F. (1997). Transcriptional repression by the promyelocytic leukemia protein, PML. *Exp. Cell Res.* 237, 371-382.

van Aelst L. and D'Souza-Schorey C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11, 2295-2322.

van Aelst L., Joneson T. and Bar-Sagi D. (1996). Identification of a novel Rac-1 interacting protein involved in membrane ruffling. *EMBO J.* 15, 3778-3786.

van der Sluijs P., Hull M., Zahraoui A., Tavitian A., Goud B. and Mellman I. (1991). The small GTP-binding protein rab4 is associated with early endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 6313-6317.

van Leeuwen F.N., van der Kammen R.A., Habets G.G.M. and Collard J.G. (1995). Oncogenic activity of Tiam1 and Rac1 in NIH3T3 cells. *Oncogene.* 11, 2215-2221.

Verschueren H., De Baetselier P., De Braekeleer J., Dewit J., Aktories K. and Just I. (1997). ADP-ribosylation of Rho-proteins with C3 exoenzyme inhibits invasion and shape changes of T-lymphoma cells. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 182-187.

Vincent S., Jeanteur P. and Fort P. (1992). Growth-regulated expression of *rhoG*, a new member of the *ras* homolog gene family. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3138-3148.

Vleminckx K., Vakaet L., Mareel M., Fiers W. and van Roy F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell.* 66, 107-119.

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

Watanabe G., Saito Y., Madaule P., Ishizaki T., Fujisawa K., Morii N., Mukai H., Ono Y., Kakizuka A. and Narumiya S. (1996). Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhotophilin as targets of small GTPase Rho. *Science.* 271, 645-645.

Weimar I.S., de Jong D., Muller E.J., Nakamura T., van Gorp J.M.H.H., de Gast G.C. and Gerritsen W.R. (1997). Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor promotes adhesion of lymphoma cells to extracellular matrix molecules via  $\alpha_4\beta_1$  and  $\alpha_5\beta_1$  integrins. *Blood.* 89, 990-1000.

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

Wes P.D., Yu M. and Montell C. (1996). RIC, a calmodulin-binding Ras-like GTPase. *EMBO J.*, 15, 5839-5848.

Westwick J.K., Lambert Q.T., Clark G.J., Symons M., Van Aelst L., Pestell R.G. and Der C.J. (1997). Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1324-1335.

Westwick J.K., Lee R.J., Lambert Q.T., Symons M., Pestell R.G., Der C.J. and Whitehead I.P. (1998). Transforming potential of Dbl family proteins correlates with transcription from the Cyclin D1 promoter but not with activation of Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase, p38/Mpk2, serum Response Factor, or c-Jun. *J. Biol. Chem.* 273, 16739-16747.

Whitmarsh A.J., Shore P., Sharrocks A.D. and Davis R. J. (1995). Integration of MAP Kinase signal transduction pathways at the Serum Response Element. *Science.* 269, 403-407.

Wittinghofer A. and Nassar N. (1996). How Ras-related proteins talk to their effectors. *TIBS.* 21, 488-491.

Wong C.W. and Privalsky M.L. (1998). Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RARalpha, and BCL-6. *J. Biol. Chem.* 273, 27695-27702.

Worris S.W., Valentine M.B., Kirstein M.N. and Huebner K. (1993). Reassignment of the human ARH9 ras-related gene to chromosome 1p13-p21. *Genomics.* 15, 677-679.

Wu W.J., Lin R., Cerione R.A. and Manor D. (1998). Transformation activity of Cdc42 requires a region unique to Rho-related proteins. *J. Biol. Chem.* 273, 16655-16658.

Xia Y., Brown L., Yang C.Y., Tsan J.T., Sicilano M.J., Espinosa R.III., le Beau M.M., Baer R.J. (1991). TAL2, a helix-loop-helix gene activated by the (7;9)(q34;q32) translocation in human T-cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 11416-11420.

Xia Y., Hwang L.Y., Cobb M.H. and Baer R. (1994). Products of the TAL2 oncogene in leukemic T cells : bHLH phosphoproteins with DNA-binding activity. *Oncogene.* 9, 1437-1446.

Yamagata K., Sanders L.K., kaufmann W.E., Yee W., Barnes C.A., Nathans D. and Worley P.F. (1994). rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *J. Biol. Chem.* 269, 16333-16339.

Yamamoto M., Marui N., Sakai T., Morii N., Kozaki S., Ikai K., Imamura S. and Narumiya S. (1993). ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene*. 8, 1449-1455.

Ye B.H., Chaganty 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., Rao P.H., Chaganti R.S.K. and Dalla-Favera R. (1993). Cloning of *bcl6*, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 53, 2732-2735.

Yeyati P.L., Shaknovich R., Boterashvili S., Li J., Ball H.J., Waxman S., Nason-Burchenal K., Dmitrovsky E., Zelent A. and Licht J.D. (1999). Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene*. 18, 925-934.

Yoshioka K., Matsumura F., Akedo H. and Itoh K. (1998). Small GTP-binding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells. *J. Biol. Chem.* 273, 5146-5154.

Zervos A.S., Gyuris J., Brent R. (1993). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell*. 72, 223-232.

Zhang S., Han J., Sells M.A., Chernoff J., Knaus U., Ulevitch R.J. and Bokoch G.M. (1995). Rho family GTPases regulate p38 Mitogen-activated Protein Kinase through the downstream mediator Pak1. *J. Biol. Chem.* 270, 23934-23936.

Zheng Y., Fischer D.J., Santos M.F., Tigyi G., Pasteris N.G., Gorski J.L. and Xu Y. (1996). The faciogenital dysplasia gene product FGD1 functions as a Cdc42Hs-specific guanine-nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* 271, 33169-33172.

Ziemin-van der Poel., McCabe N.R., Gill H.J., Espinosa III R., Patel Y., Harden A., Rubenelli P., Smith S.D., LeBeau M.M., Rowley J.D. and Diaz M.O. (1991). Identification of a gene, *MLL*, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 10735-10739.

Zohn I.M., Campbell S.L., Khosravi-Far R., Rossman K.L. and Der C.J. (1998). Rho family proteins and Ras transformation : the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene.* 17, 1415-1438.

## **ANNEXE I**

Le pouvoir transformant des protéines RhoA, Rac1, Cdc42 et RhoG a été étudié dans les cellules fibroblastiques NIH3T3 ou Rat1 (Qiu *et al.*, 1995a ; b ; Qiu *et al.*, 1997 ; Perona *et al.*, 1993 ; Roux *et al.*, 1997). Dans ce cas, la sur-expression de ces protéines entraîne la formation de foyers. L'étude du potentiel pouvoir transformant de la protéine RhoH a été entrepris dans la lignée cellulaire hématopoïétique murine DA1. Ce modèle présente 2 avantages : d'une part, la protéine RhoH étant exprimée uniquement dans les cellules hématopoïétiques, il est intéressant d'étudier le pouvoir transformant de cette protéine dans ce type cellulaire. D'autre part, la croissance de la lignée cellulaire DA1 est dépendante de l'interleukine 3 (IL3). Ainsi, une croissance des cellules exprimant la protéine RhoH en absence de ce facteur de croissance serait le résultat d'une transformation de la lignée cellulaire par la protéine RhoH. Ce modèle a précédemment été utilisé par l'équipe de D'Halluin dans notre laboratoire afin d'étudier les cibles de la protéine de fusion BCR/ABL (Hamdane *et al.*, 1997).

L'étude est encore en cours de réalisation, les premiers résultats obtenus restent à confirmer et des contrôles à effectuer. Cependant, nous pouvons d'ores et déjà dire que la sur-expression de la protéine RhoH dans les cellules DA1 provoque une indépendance des cellules vis à vis de l'IL3. En effet des dilutions limites nous ont permis d'isoler plusieurs clones exprimant cette protéine. Par contre, les cellules parentales DA1/IL3 et les cellules transfectées avec le plasmide utilisé pour ce travail : le pcDNA3-zéo ne contenant pas de transgène (DA1/pcDNA3) n'ont développé aucun clone indépendants de l'IL3 dans ces conditions. La figure A1 présente les courbes de croissance des cellules DA1 exprimant (DA1/RhoH) ou n'exprimant pas RhoH (DA1/IL3 et DA1/pcDNA3) en présence ou en absence d'IL3.

Une étude a été réalisée dans une autre lignée hématopoïétique également IL3 dépendante : la lignée BaF3 dans laquelle les auteurs ont introduit le gène codant la forme activée de Rac1 (Rac1V12) (Nishida *et al.*, 1999). La sur-expression de cette protéine Rac1V12 comme celle de la protéine RasV12 est capable de provoquer dans ces cellules une indépendance vis à vis de l'IL3. Les protéines Cdc42 et RhoA sont elles incapables d'induire ce phénomène. Dans cette étude, les auteurs ont montré que les cellules BaF3 en absence d'IL3 entraînent dans un processus de mort cellulaire par apoptose, et que la sur-expression de Rac1V12 inhibait cette apoptose.

Il serait intéressant d'examiner si la survie des cellules DA1 exprimant RhoH correspond à une inhibition de l'apoptose et également de rechercher si cette protéine intervient dans la voie de signalisation activée par l'IL3. En effet, il ne faut pas exclure l'hypothèse que l'apparition de l'indépendance pourrait être due non à la sur-expression de la protéine RhoH mais au fait que le transgène se soit inséré à proximité d'un gène impliqué dans ce phénomène. C'est pourquoi, afin de compléter cette étude et de confirmer les résultats obtenus, il serait important de réaliser les expériences avec plusieurs clones, les uns exprimant fortement la protéine RhoH, les autres l'exprimant à des taux plus faibles. Nous avons pour le moment étudié, à l'aide d'un seul clone, différents critères de transformation comme l'indépendance vis à vis du sérum, la croissance en agar mou et la tumorigénicité *in vivo*.

En ce qui concerne les expériences de tumorigénicité *in vivo*, nous avons constaté que l'injection de  $10^6$  cellules exprimant la protéine RhoH à des souris syngéniques (C3H) de 8 semaines est létale pour ces animaux, leur mort apparaissant dans des délais relativement courts (environ 1 mois après injection). Par contre, les souris ayant reçu  $10^6$  cellules n'exprimant pas RhoH ne sont pas mortes et ce après un temps d'attente correspondant à 2 fois la médiane de survie des autres souris (Fig. A2). Des observations anatomopathologiques des souris effectuées tous les 2 jours ont permis d'observer le développement de la pathologie chez les souris. Nous avons tout d'abord détecté une infiltration des graisses péri-pancréatiques, puis une invasion du pancréas. Ensuite, les cellules tumorales infiltrèrent les organes proches comme le foie, l'intestin grêle, les reins. A partir du 11<sup>ème</sup> jour les cellules tumorales sont retrouvées dans le sang puis colonisent les organes plus éloignés. La mort des souris est très certainement due à une compression des organes vitaux causée par le développement considérable de la tumeur pancréatique.

Bien que tout ceci reste à confirmer, cette étude ouvre la voie sur l'étude du potentiel pouvoir transformant de RhoH, l'unique membre de la famille Rho impliqué dans le lymphome non-Hodgkinien. Il est encourageant de penser que la protéine RhoH puisse avoir un rôle dans la progression tumorale. Pour cela, de nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo* sont envisagées et il serait intéressant d'étudier un plus grand nombre de patients afin de corréler le phénotype observé et le réarrangement de RhoH.

## **ANNEXE II**



# TTF, a gene encoding a novel small G protein, fuses to the lymphoma-associated *LAZ3* gene by t(3;4) chromosomal translocation

Manuelle Dallery<sup>1</sup>, Sylvie Galiègue-Zouitina<sup>1</sup>, Maud Collyn-d'Hooghe<sup>1</sup>, Sabine Quief<sup>1</sup>,  
Claude Denis<sup>1</sup>, Marie-Paule Hildebrand<sup>1</sup>, Danièle Lantoine<sup>1</sup>, Clotilde Deweindt<sup>1</sup>, Hervé Tilly<sup>2</sup>,  
Christian Bastard<sup>3</sup> and Jean-Pierre Kerckaert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex; <sup>2</sup>Centre Henri Becquerel, rue  
de la Santé, 76038 Rouen; <sup>3</sup>Département de Cytogénétique, Centre Régional de Transfusion Sanguine, 609, Chemin de la Bretagne,  
76232 Bois-Guillaume Cédex, France

We have previously shown that the *LAZ3/BCL6* gene encoding a potential transcription factor, is disrupted in human large cell non-Hodgkin's lymphomas (NHL) bearing 3q27 chromosomal abnormalities involving the immunoglobulin (*IG*) genes. However, *LAZ3* rearrangement also occurs in NHL bearing 3q27 translocations without involvement of the *IG* genes: for example the VAL cell line exhibits t(3;4)(q27;p11). In the present study we have used a RT-PCR method to detect and to clone the *LAZ3* mRNA products from the VAL cell line. We report that the consequence of the t(3;4) is the fusion of a chimeric transcript of *LAZ3* with a new gene encoding a small G-like protein, termed *TTF* (Translocation Three Four). Nucleotide sequence analysis of a 1.4 kb cDNA predicts that the *TTF* gene encodes a protein of 191 amino-acids similar to members of the RHO superfamily including HRAS (27% identical), KRAS (30% identical) and RHO proteins: the human RHOA, RHOB and CDC42Hs proteins (respectively 43, 44 and 45% identical) and the yeast RHO2 protein (44% identical). Unlike most other small G proteins which are expressed ubiquitously, *TTF* was transcribed only in hemopoietic cells as a 2.2 kb transcript. *TTF* defines a new subgroup of RHO-like proteins.

**Keywords:** *LAZ3/BCL6* gene; lymphoma; translocation; small G protein; *LAZ3* fusion gene

## Introduction

An effective strategy for identifying potential oncogenes involved in the pathogenesis of human leukemias and lymphomas has been to clone recurring chromosomal translocation breakpoints.

In non-Hodgkin's lymphomas (NHL), a number of oncogenes are rearranged via involvement with immunoglobulin (*IG*) genes at chromosomal sites 14q32, 2p12 and 22q11 (Leder *et al.*, 1983). As in the case in two main NHL subtypes: follicular lymphoma is associated with the t(14;18) (q32;q21) translocation involving the *BCL2* oncogene at 18q21 (Harada *et al.*, 1979; Tsujimoto *et al.*, 1984) and the mantle cell lymphoma with the t(8;14) (q24;q32) and its derivative, involving at 8q24 the *MYC* oncogene

(Manolova *et al.*, 1979; Lenoir *et al.*, 1982). Deregulation overexpression of both *BCL2* and *MYC* oncogenes results from their fusion with *IG* genes.

Recently, we and others have reported that chromosomal translocations involving band 3q27 and the *IG* genes were the third most common specific abnormalities in NHL (Bastard *et al.*, 1992; Deweindt *et al.*, 1993). Molecular studies have shown that these abnormalities were associated in 37% of B-diffuse, large cell lymphomas with the disruption and deregulation of a zinc-finger encoding gene, *LAZ3* (Kerckaert *et al.*, 1993) also termed *BCL6* (Ye *et al.*, 1993) or *BCL5* (Miki *et al.*, 1994). We observed that the *LAZ3* transcripts were fused with *IG* sequences (results to be published).

*LAZ3* rearrangements also occur in several NHL without the involvement of the *IG* genes. In the t(3;4) (q27;p11) translocation observed in the VAL cell line, *LAZ3* was shown to be disrupted in the first intron and deleted of its first exon and regulatory 5' sequences (Kerckaert *et al.*, 1993). Here we report that the consequence of the t(3;4) is a fusion of the *LAZ3* gene and of its mRNA transcript with a sequence from the *TTF* gene at 4p11. This paper is devoted to the identification of this gene and to the characterization of the predicted encoded protein as a new member of the small G protein family. Sequence and phylogenetic analyses indicated that *TTF* belongs to the RHO subfamily and suggest that it might have diverged early during evolution.

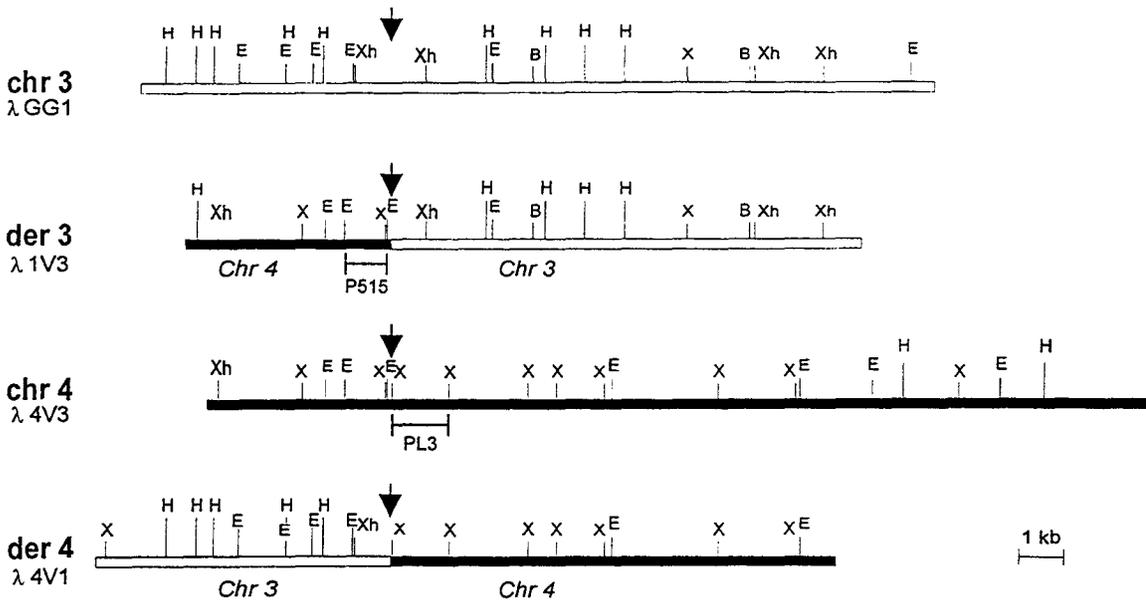
## Results

### Cloning of the t(3;4) derivatives in the VAL cell line

The 3q27 breakpoint of the t(3;4) on the chromosome 3 derivative (der3,  $\lambda$ 1V3) was previously cloned in the VAL cell line together with the 3q27 germline region ( $\lambda$ GG1) (Kerckaert *et al.*, 1993). From the  $\lambda$ 1V3 clone (Figure 1), we subcloned a non-repetitive *EcoRI* DNA fragment (p515) of the 4p11 region close to the breakpoint, allowing the isolation of the germline chromosome 4 ( $\lambda$ 4V3), by screening a  $\lambda$ EMBL3 VAL genomic library. Using the 1.3 kb *XbaI* non repetitive DNA fragment as a probe (PL3) we obtained a clone containing the 4p11-3q27 breakpoint junction of the chromosome 4 derivative (der4,  $\lambda$ 4V1).

The nucleotide sequences of the t(3;4) junctions on the chromosomes 3 and 4 derivatives (der 3 and der 4) were aligned with the corresponding 3q27 germline region (Figure 2).

Correspondence: Sylvie Galiègue-Zouitina  
Received 24 October 1994; revised 16 February 1995; accepted 17 February 1995

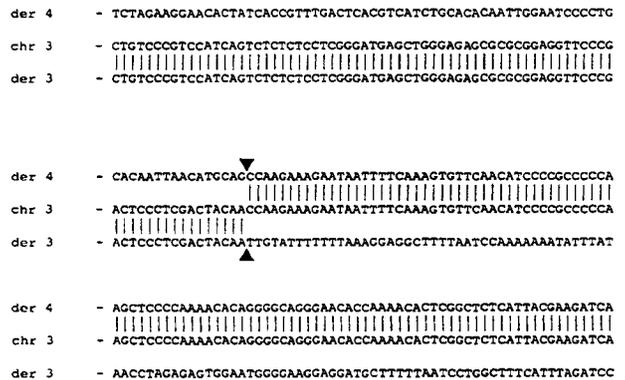


**Figure 1** Breakpoint region on chromosomes 3q27 and 4p11 in the VAL cell line. Restriction maps of the sequences created by the t(3;4)(q27;p11) translocation in VAL cell line ( $\lambda$ 1V3,  $\lambda$ 4V1) and of the 3q27 ( $\lambda$ GG1) and 4p11 ( $\lambda$ 4V3) germline configurations. The vertical arrows indicate the chromosomal breakpoint. Restriction sites: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; X, *Xba*I; Xh, *Xho*I

Due to the position of the 3q27 breakpoint which disrupted the *LAZ3* gene in its first intron (Kerckaert *et al.*, 1993), the consequence of the translocation could be the transcriptional deregulation of *LAZ3* gene by ectopic enhancer sequences from 4p11 and/or by production of a chimeric transcript due to the fusion of *LAZ3* to another unknown gene.

#### Characterization of a *LAZ3* fusion transcript

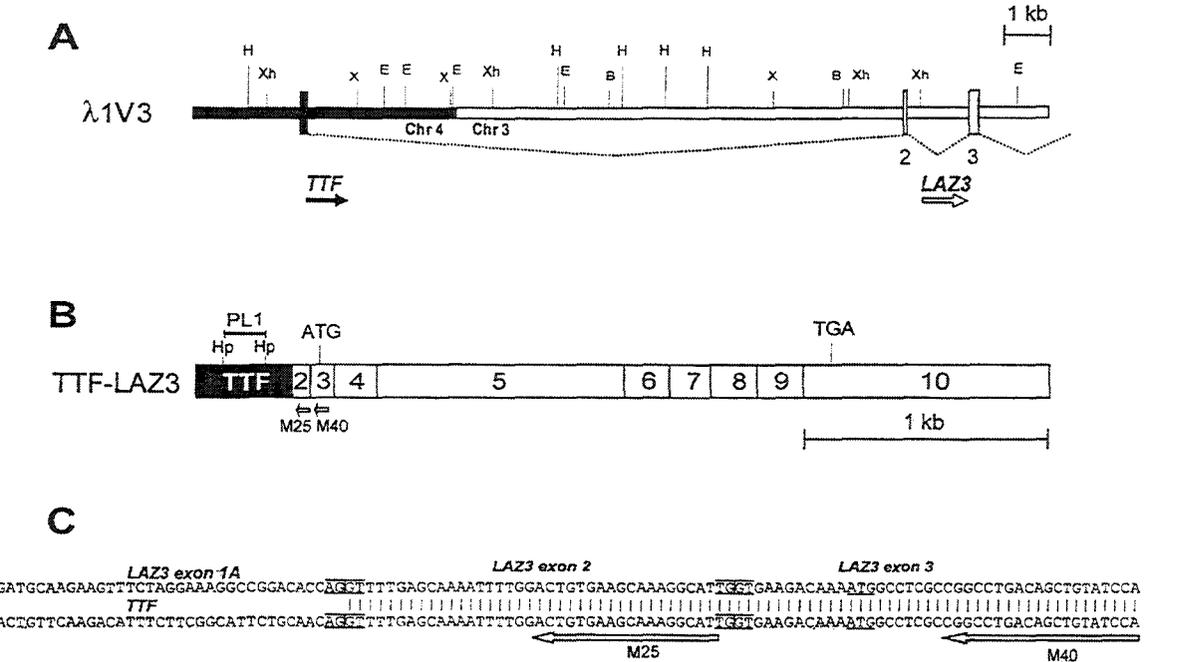
We looked for a *LAZ3* chimeric transcript by an anchored RT-PCR approach. The amplification of the 5' end of *LAZ3* cDNA was obtained by reverse transcription from VAL mRNA using a primer from exon 3 of *LAZ3*, followed by ligation of an oligonucleotide anchor and PCR amplification using an anchor primer and a nested *LAZ3* primer from exon 2. As shown in Figure 3C, the nucleotide sequence of the PCR products revealed the fusion of a 5' foreign sequence at the acceptor splice site of *LAZ3* exon 2. This novel transcriptional unit which fused to *LAZ3* was termed *TTF* for Translocation Three Four. A *TTF* specific cDNA fragment was derived from this chimeric cDNA by restriction enzyme digestion with *Hpa*II (probe PL1) (Figure 3B). This *TTF* probe hybridized with the 1.9 kb *Xho*I-*Xba*I fragment of the  $\lambda$ 1V3 clone (Figure 3A), indicating that *TTF* transcriptional unit was close to the 4p11 breakpoint. On Southern blot analysis, this probe PL1 when hybridized to VAL DNA detected rearranged fragments in *Hind*III and *Bam*HI digests (Figure 4A). The same fragments cohybridized with the 3q27-specific probe F372 (Deweindt *et al.*, 1993), confirming the joining of *LAZ3* sequences with 4p11 sequences. When hybridized to a Northern blot of VAL mRNA, PL1 detected a 2.2 kb *TTF* transcript and the 3.8 kb transcript which corresponds to the *TTF-LAZ3* fusion RNA, exhibiting the same size as the normal *LAZ3* transcript (Figure 4B).



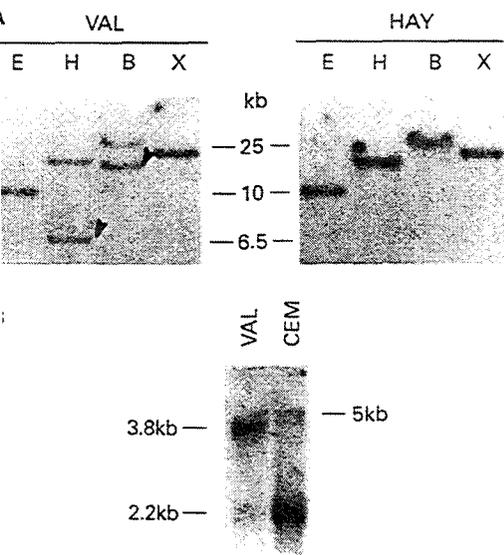
**Figure 2** Alignment of the 3q27 genomic germline sequence to the der 3 and der 4 breakpoints from VAL t(3;4) DNA. The arrow indicates the position of the breakpoint

#### TTF encodes a novel RAS-related protein

The full-length *TTF* coding sequence was obtained by screening a B-cell lymphoma (Karpas 422) cDNA library with PL1. One clone containing a 1.4 kb insert was sequenced, revealing a deduced 191 amino-acid reading frame (Figure 5). As observed on Figure 6, portions of this sequence showed striking amino-acid homology with the RAS superfamily, including the RAS proteins (HRAS, 27% identical), the RAB proteins (RAB1A, 30% identical) and the RHO proteins: human RAC1, RHOB and CDC42Hs (43, 44 and 45% identical) and yeast RHO2 (44% identical). The highest degree of identity was found with the RHO-like CDC42Hs protein (45% identical), the human homolog of the yeast 'cell-division cycle' CDC42 protein (also termed G25B). The predicted amino-acid sequence of *TTF* contained many of the residues that have been shown to be essential for GTP/GDP binding to the p21Ras protein, including Lys17,

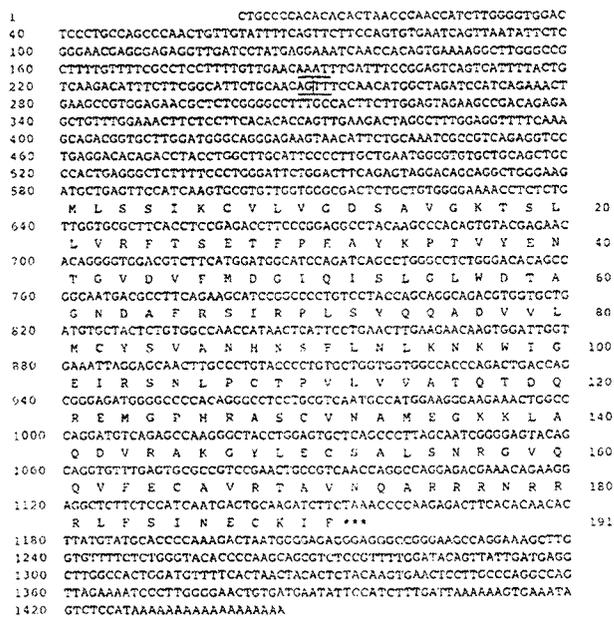


**Figure 3** Characterization of the *TTF-LAZ3* fusion product. (A) genomic restriction map of the  $\lambda$ 1V3 clone containing the t(3;4) breakpoint region, showing one exon of *TTF* (black box) which is spliced to the second exon of *LAZ3*. White boxes represent *LAZ3* exons 2 and 3. The black and white arrows indicate the transcriptional directions of *TTF* and *LAZ3*, respectively. (B) schematic representation of the fusion transcript of *LAZ3* and *TTF*. M25 and M40 were the primers used in the RT-PCR experiments, leading to a fusion cDNA product containing only the second exon of *LAZ3*, spliced to the *TTF* exon. Black and white frames indicate the *TTF* and *LAZ3* exons, respectively. The black segment figures the PL1 probe which was derived from the *TTF* sequence by *Hpa*II (Hp) restriction enzyme digestion. (C) alignment of the *LAZ3* first three exons (1A, 2, 3) sequence to the fusion cDNA RT-PCR product (*TTF-LAZ3*), showing a perfect splice junction between the *TTF* exon and *LAZ3* exon 2. The brackets indicate the donor and acceptor splice junction sites. The *LAZ3* translational initiation codon is underlined



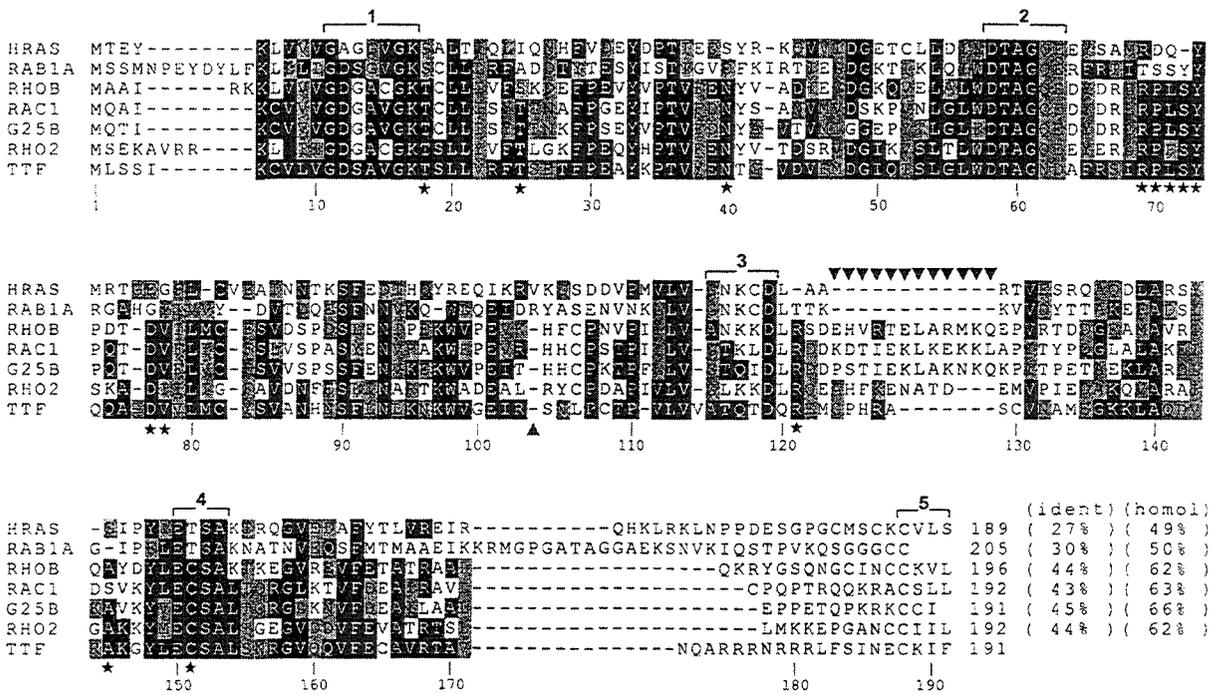
**4** Molecular characterization of the *TTF* transcriptional start site. (A) Southern blot analysis of the DNA from two cases of t(3;4)(q27;p11) with (VAL) or without (HAY) the t(3;4)(q27;p11) translocation, hybridized with the probe PL1 from *TTF* (Figure 3). The restriction enzymes used were *Eco*RI (E), *Hind*III (H), *Bam*HI (B) and *Xba*I (X). The abnormal bands detected with the probe in *Bam*HI and *Hind*III digests were indicated by arrows. (B) Northern blot analysis with the *TTF* probe PL1 on total RNA from VAL and CEM cell lines

and Thr36, respectively corresponding to Lys16, Thr35 and Thr36 in p21Ras. This TTF sequence also contained the four conserved domains involved in GTP binding and hydrolysis, correspond-



**Figure 5** Nucleotide and predicted amino-acid sequences from the *TTF* cDNA. The nucleotide and amino-acid sequences are numbered on the left and right, respectively. The splice junctions of the two first exons are indicated by brackets. The nucleotide sequence will appear in the EMBL Nucleotide Sequence Database (accession number Z35225)

ing to residues 10–16, 57–62, 116–120, 147–152 of p21Ras sequence and the C-terminal sequence Cxxx-COOH required for membrane attachment (segments 1, 2, 3, 4 and 5 on Figure 6).



**Figure 6** Alignment of the protein sequence of *TTF* with members of the RAS superfamily: the human members HRAS, RAB1A, RHOB, RAC1, G25B (also termed CDC42Hs), and the yeast RHO2 member. Positions corresponding to identities (black) and homologies (grey) between *TTF* and the above proteins were obtained using the CLUSTAL alignment program (PC/Gene IntelliGenetics Inc). The black segments numbered from 1 to 5 indicate conserved domains in the p21 Ras. The black arrowheads (between positions 123 and 129 in *TTF*) delimit the RHO-specific insertion, which is generally twelve (only five in *TTF*) residues in length, in the RHO subfamily. The single black arrowhead between positions 103 and 104 in *TTF* figures the RHO-specific deletion. The black stars indicate the residues identical for all RHO proteins

The protein alignment presented on Figure 6 also indicates that the *TTF* sequence contains many RHO-specific residues or sequences (Chardin, 1993), such as: (i) the 'RHO insertion' sequence (black arrows on Figure 6), which generally consists of twelve residues for all the RHO members except for the yeast RHO2 (nine residues) and *TTF* (five residues) proteins; (ii) the deletion of one residue, which is observed in all RHO members (between position 103 and 104 in *TTF*), (iii) some RHO-specific amino acids, such as Thr18 and 25, Val37, Asn40 (which is the site of ADP-ribosylation by the C3 botulinum toxine (Chardin *et al.*, 1989), characteristic of the RHO proteins), Arg121, Ala145 and Cys151; (iv) some RHO-specific sequences such as: Arg-Pro-Leu-Ser-Tyr (residues 69 to 73 in *TTF*) and Asp-Val (residues 77-78 in *TTF*).

The presence of all these RHO hallmarks in the *TTF* sequence suggested that *TTF* might be a new RHO-like member. For this reason, we made another comparative general proteic alignment (not shown), including members of the six different RAS-like subfamilies (RAS, RAB, TC4, ARF, GEM/RAD and RHO) and the *TTF* protein, which unambiguously branched the new sequence within the RHO subfamily. Therefore, we investigated more precisely the relationships between *TTF* and the other RHO members, by comparison of the *TTF* sequence with a set of 24 sequences of the RHO subfamily, including six human (RHOA-H, RHOB-H, RAC1-H, G25B-H, RHOG-H, RTC0-H), one hamster (RHOG-CR), two drosophila (RAC1-DRO and CC42-DRO), five yeast (RHO1-Y, RHO2-Y, CRL1-CA, CC42-SP), four slime mold (RACB-SM, RACC-SM, RACD-SM, RACI-SM), two bacteria (RAC1-CEL, CC42-CEL) RHO members. In

order to simplify the final evolutionary tree, the different Rac2, the murine RHO and the human RHOC sequences were not included in this comparison. Also, to avoid topological abnormalities, we excluded from the comparison the N-terminal (corresponding to residues 1 to 4 in HRAs) and C-terminal (from residue 165 in HRAs) parts of the proteins, as recommended by Valencia *et al.* (1991) and Chardin (1993). Sequence alignments (not shown) and phylogenetic tree (Figure 7) were obtained by using the TREEALIGN program (Hein, 1989). In agreement with Vincent *et al.* (1992), the phylogenetic tree confirms that the RHO subfamily consists of two exclusive groups. The first group includes: (i) the subgroup of the RAC proteins (RAC1-H, RAC1-DRO, RAC1-SM, RAC1-CEL, RACB-SM), and the RACC- and RACD-SM members which appeared to have diverged earlier during evolution; (ii) the subgroup of 'cell-division-cycle' CDC42 proteins (CC42-DRO, G25B-H, CC42-CEL, CC42-SP) with the RTC0-H protein; (iii) the RHOG proteins (RHOG-CR and RHOG-H). The second group contains: (i) one subgroup, with the yeast RHO1, the human RHOA and RHOB genes; (ii) another subgroup including the CRL1-CA, yeast RHO4 and RHO2 and *TTF* proteins. Among these, RHO2 and *TTF* appeared to derive from a common but rather distant ancestor, suggesting that *TTF* belongs to a new subgroup in the RHO subfamily.

#### Tissue-specific expression of the *TTF* gene

Expression of the *TTF* gene was determined by Northern blot analysis of different hemopoietic and non-hemopoietic cell lines. Two *TTF* mRNA tran-

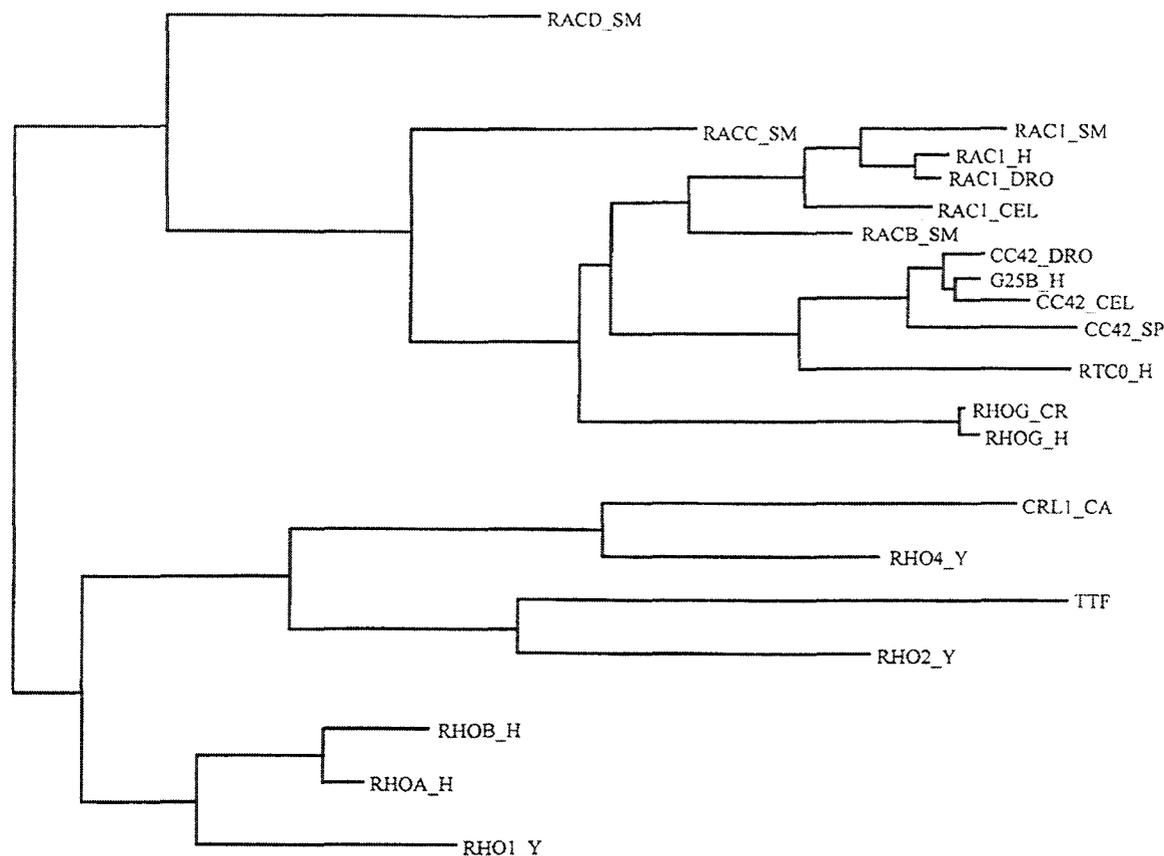


Figure 7 Phylogenetic analysis of TTF and RHO protein sequences. Twenty-four RHO sequences from different species were aligned with TTF by using the TREEALIGN software. The alignment was realized from the first conserved Lys residue (position 6 in TTF, 5 in HRas) to the Val residue 171 in TTF (see Figure 6) and this sequence alignment was used to elaborate an evolutionary tree by using the TREEALIGN program (Hein, 1989). The abbreviations used are: SM, Slime Mold (*Dictyoselium Discoideum*); H, Human; DRO, *Drosophila*; CEL, Bacteria (*C-Elegans*); SP, *Schizosaccharomyces Pombe*; Y, Yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*); CA, *Candida Albicans*; CR, Hamster

...s were detected in hemopoietic cells: a minor 5 kb transcript and a major 2.2 kb transcript (Figure 8). No transcript was detected in non-hemopoietic cells including a variety of epithelial cell lines (Figure 8) and other tissues (heart, brain, placenta, lung, liver, spleen, kidney, pancreas) (multi-tissue Northern blot, not shown).

Discussion

We have demonstrated that the consequence of the t(3;4) translocation in the VAL cell line is the fusion of a novel small G protein encoding gene, TTF, to the myeloma associated LAZ3/BCL6 gene.

The LAZ3/BCL6 gene encodes a potential transcription factor, sharing N-terminal homologies with the Drosophila tramtrack transcription factor and contains zinc-finger motifs (Kerckaert et al., 1993; Ye et al., 1993; Miki et al., 1994). The 3q27 chromosomal breakpoint in t(3;4) was localized in the first intron of LAZ3, 2 kb downstream to the first untranslated exon (Kerckaert et al., 1993).

The LAZ3 chimeric transcript contained at the 5' end a TTF sequence spliced to LAZ3 exon 2 with normal donor and acceptor splice sites. Such a fusion transcript of the LAZ3 gene was also observed in the t(3;14) translocation, with the immunoglobulin JH gene alternatively spliced to the LAZ3 exon 2 (unpublished data).

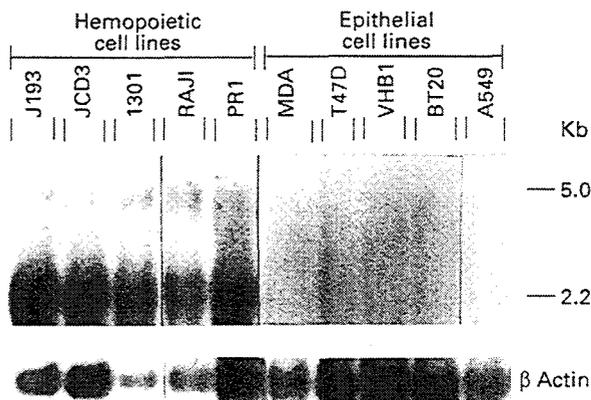


Figure 8 Tissue specific expression of the TTF gene. Expression of the TTF gene was analysed in hemopoietic and non hemopoietic cells (see Materials and methods). Polyadenylated RNA samples (5 µg) were hybridized with the 1.4 kb TTF cDNA used as a probe. Actin expression was tested in the same samples to evaluate both quantity and quality of RNA samples

In the VAL cell line, we have failed to detect a reciprocal LAZ3-TTF fusion transcript from the derivative chromosome 4, using a RT-PCR method (data not shown). Such a transcript might contain the coding part of the TTF gene and might be under the control of the LAZ3 5' regulatory sequences.

TTF, the fusion gene partner of LAZ3 in t(3;4) is a

new member of the RAS gene superfamily (Figure 6). Proteins that belong to the RAS superfamily can be divided into six major subfamilies on the basis of amino-acid sequences: (a) the RAS/RAL, RAP proteins (Ellis *et al.*, 1981; Lowe *et al.*, 1987; Pizon *et al.*, 1988; Chardin and Tavitian, 1989) which have been shown to participate in cell proliferation and differentiation; (b) the products of the RAB or YPT subfamily (Touchot *et al.*, 1987) responsible for the vesicular transport (Bacon *et al.*, 1989; Van der Sluijs *et al.*, 1991); (c) the RHO gene products (Madaule and Axel, 1985; Polakis *et al.*, 1989) shown to participate to scaffolding of actin microfilaments (Chardin *et al.*, 1989; Paterson *et al.*, 1990; Ridley and Hall, 1992) and cell polarity and cytoskeleton integrity, for two members of the RHO family, CDC42 (Kikuchi *et al.*, 1988) and RhoG (Vincent *et al.*, 1992); (d) TC4 (Drivas *et al.*, 1990); (e) ARF (for ADP ribosylation factor), shown to be a regulator of the membrane traffic and organelle structure (Donaldson and Klausner, 1994); (f) RAD and GEM (Reynet and Kahn, 1993; Maguire *et al.*, 1994), whose functions are unknown.

In this work we observed that the TTF predicted protein sequence contained all the crucial residues and the four conserved domains that are involved in the guanine-nucleotide binding and hydrolysis function of the RAS proteins (segments 1, 2, 3, 4, Figure 6), but with some distinctive features. First, in the domain involved in the GTPase activity (segment 1) TTF exhibits a Ser-Ala motif at positions 13-14 corresponding to the positions 12-13 in Ras, which are essential and correspond to Gly-Gly in most of the proteins of the RAS subfamily. In the Ras protein p21, replacement of Gly 12 by another amino-acid, except Pro, leads to a transforming potential (Seeburg *et al.*, 1984). In the adjacent position (Gly 13) the replacement by Asp but not by Ser is transforming in the p21 Ras (Fasano *et al.*, 1984). However there is variation in these positions among other members of the RAS superfamily (Valencia *et al.*, 1991). Thus, Gly-Gly in RAS and RAL, RAP proteins becomes Gly-Gly, Thr-Gly or no Gly in RAB proteins, with a Ser residue in position 12 (as the Ser 13 in TTF), for 10 among 14 members of the RAB subfamily. In the Rab5A protein, a Ser-Ala motif is observed in positions 12-13 (as 13-14 in TTF), but the Ala 14 found in TTF is also found in all the RHO proteins (Chardin, 1993; see Figure 6). In spite of these deviations from RAS, some RAB proteins such as Rab3 (Ser-Ser) have a GTPase activity comparable to or even higher than p21 Ras (Zahraoui *et al.*, 1989). Another RAS-like protein isolated from plants exhibits a Ser residue in position 12 and in this case the authors also showed that the guanine nucleotide binding was not inhibited (Terry *et al.*, 1993). Another particularity of the TTF protein sequence in this region is the presence of a Thr residue at position 41 (40 in p21 Ras) instead of Tyr or Phe in the RAS, RHO, RAB subfamilies. As we obtained our TTF cDNA from a B-cell lymphoma we checked the possibility of a mutation at codons 13 and 41 in TTF by sequencing the germline genomic counterpart, but an identical sequence was obtained. The second highly conserved domain (segment 2, Figure 6, DTAGQE in Ras) contains two essential residues for all G proteins: Asp58 and Gly61 (respectively 57 and 60 in Ras). Again in this region there is a particularity in the TTF sequence: the presence of one Asn and one Asp

residues at positions 62 and 63 in TTF instead of Gln and Glu, for almost the entire RAS superfamily (Chardin, 1993). The third domain (segment 3, Figure 6, NKxDL in Ras) presents some variations in the RAS/RAL, RAP, RAB/YPT, RHO families. The first two and fourth crucial residues Thr, Gln, Asp observed in TTF are in agreement with these variations (Valencia *et al.*, 1991), but at the fifth position the Gln residue observed in TTF has not been reported in other small G proteins. Moreover, in this region (LVGNKxDL) there is one insertion of a Val residue in TTF.

These small variations in these three domains between TTF and the other members of the RAS superfamily, lead us to suggest that the nucleotide binding site in TTF may have unusual properties. In that regard, it will be essential to check the guanine nucleotide binding and intrinsic GTPase activities of TTF.

There is a crucial interaction in p21 Ras between two highly conserved residues, Asp119 (120 in TTF) from the third domain and Ser145 (146 in TTF) from the fourth ExSA motif (segment 4), which is perfectly conserved in TTF as in all members of the RAS superfamily.

The predicted TTF protein sequence also contains the CxxxC-terminal consensus geranylgeranylation motif, needed to the membrane anchorage of the G proteins.

Together these data strongly suggest that the function of the TTF protein is related to that of the small G proteins.

In this work we have shown that TTF contains most of the RHO-specific motifs, especially the RHO insertion (residues 124-128). Phylogenetic analysis obtained using an alignment of 24 RHO proteins has ranked TTF in a new RHO subgroup and has ascribed a common ancestor to the TTF and yeast RHO2 proteins (Figure 7). Both proteins share a shortened RHO insertion, 5 and 9 residues respectively, instead of 12 in all the other RHO proteins (Chardin, 1993).

Unlike most other RAS proteins which are expressed ubiquitously (Barbacid, 1987; Bos, 1988; Olofsson *et al.*, 1988) TTF is expressed only in hemopoietic cells (Figure 8), like the Rac2 protein (Reibel *et al.*, 1991). This Rac2 protein was shown to regulate the NADPH-oxidase in neutrophils (Knaus *et al.*, 1992). It was also shown that its expression was restricted to the lymphoid lineage and was strongly stimulated during T-cell activation (Reibel *et al.*, 1991). Nevertheless, the TTF protein is distant from the Rac2 protein in the phylogenetic tree (Figure 7).

A detailed study of TTF expression in normal hemopoietic cells, together with the determination of the nature and regulation of the TTF promoter is needed, in addition to a study of the subcellular localization of the protein, in normal and pathologic cells.

## Materials and methods

### Cell lines and patient sample

**Hemopoietic cell lines** The VAL cell line is a stable B cell line established from bone marrow cells by C Bastard (unpublished). The karyotype is: 49, XX, dup(2)(p11;p15),

(q27;p11), t(8;14;18) (q24;q32;q21), +8, +ider(8)-;18)(q24;q32;q21), +der(12)t(1;12)(q24;q24). s and the other cell lines, T cell lines (JURKAT 193, AT CD3, CEM), B cell lines (RAJI, K422, PR1) were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% calf serum.

*Cell lines* MDA, T47D, VHB1, BT20 (breast carcinoma), A549 (lung carcinoma) were maintained in McCoy's minimal essential medium (DMEM) supplemented with 10% calf serum.

The Karpas 422 cell line was kindly provided by Dr A. Karpas, Cambridge. The PR1 cell line was previously established by one of us (CB). The other cell lines were from ATCC.

*Patient sample HAY*: tumor cells from fresh lymph nodes of a patient with B-cell NHL bearing a t(3;14)(q27;q32) were cultured as described previously (Deweindt *et al.*, 1993).

#### Cloning

*Genomic DNA library* A genomic DNA library was made in the  $\lambda$ EMBL3 vector: about 300  $\mu$ g of genomic DNA from VAL cells was partially digested by *Sau*3A, fractionated by size on a agarose gradient and fragments between 15 and 20 kb were ligated into  $\lambda$ EMBL3. A Karpas 422 complementary DNA library was made in the  $\lambda$ gt10 vector. In both cases the recombinants were packaged with the *Gigapack II plus* kit (Pharmacia), plated and screened at the time of primary infection with the different probes.

*Hybridizations* were carried out on nitrocellulose filters for 24 h under stringent conditions (50% formamide/PE-5  $\times$  Denhardt's-1% SDS buffer, 42°C) and washing was performed in 2  $\times$  SSC at 22°C followed by 0.1  $\times$  SSC, 0.1% SDS at 22°C and then at 55°C.

#### Sequencing

Genomic and complementary DNA fragments of interest were subcloned into Bluescript KSII phagemid vectors. DNA sequencing by the dideoxy chain termination method, using the *sequenase sequencing* kit (USB). Data searches and sequence analyses were worked out by CITI2 facilities.

#### Genetic analysis

Genetic analysis was performed by using CITI2 facilities, with the TREEALIGN program for protein sequence alignment, distance computation, and construction of phylogenetic trees (Hein, 1989). We align the TTF sequence with 24 RHO sequences from different species (Bacteria, Slime Mold, Yeast, Drosophila and Human), 22 of them being present in the Swissprot bank (version 28),

#### References

RA, *et al.* (1989). *J. Cell. Biol.*, **109**, 1015–1022.  
acid M. (1987). *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 779–828.  
d C, *et al.* (1992). *Blood*, **79**, 2527–2531.  
.. (1988). *Mutant. Res.*, **195**, 255–262.  
in P. (1993). *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Verlag: Berlin/Heidelberg; Dickey BF and Gamba L (ed). Vol 108, pp. 159–176.  
in P and Tavittian. (1989). *Nucleic Acids Res.*, **17**, 4386–4386.  
in P, *et al.* (1989). *EMBO J.*, **8**, 1087–1092.  
vin J, Przybyla A, McDonald R and Rutter W. (1979). *J. Biol. Chem.*, **18**, 5294–5299.  
ndt C, *et al.* (1993). *Genes Chrom. Cancer*, **8**, 149–154.

and two of them (drosophila RAC1 and CDC42) recently published by Luo *et al.* (1994).

#### RT-PCR analysis

We used a RT-PCR method (5' ampliFINDER RACE Kit, PROMEGA) to detect the presence of *LAZ3* mRNA products from the VAL cell line. The amplification of the 5' end of *LAZ3* cDNA was obtained by reverse transcription using the primer M40 (Figure 3) from exon 3: 5'-TGGATACAGCTGTCAGCCGGCG-3', followed by the ligation of the ampliFINDER anchor and PCR using the anchor primer and a nested primer, M25 (Figure 3) from exon 2: 5'-ATGCCTTGCTTCACAGTC-3'. Amplification products with various sizes were obtained all containing at the 5' end a foreign sequence spliced to *LAZ3* exon 2.

#### DNA and RNA analysis

*Southern blot analysis* Preparation of high molecular weight DNA, restriction enzyme analysis and electrophoresis were performed according to standard procedures. Fifteen  $\mu$ g of high molecular weight DNA were digested with the different enzymes, fractionated by agarose gel electrophoresis, denatured and transferred onto nitro-nylon membrane *hybond C* (Amersham). All the restriction enzymes were purchased from Boehringer, Mannheim.

*Northern blot analysis* Total cellular RNA was extracted from cell lines using guanidinium isothiocyanate and centrifugation through cesium chloride (Chirgwin *et al.*, 1979). Polyadenylated RNA was purified by oligo (dT) cellulose chromatography (Pharmacia). Equal amounts of RNA (25  $\mu$ g) or mRNA (5  $\mu$ g) were size fractionated on a denaturing formaldehyde 1% agarose gel and blotted onto nitro-nylon membrane.

After Southern or Northern blotting the filters were hybridized for 16 h at 42°C in stringent conditions (50% formamide, 42°C). The washing was performed in 2  $\times$  SSC at 22°C followed by 0.1  $\times$  SSC, 0.1% SDS at 22°C and then at 65°C, or followed by 2  $\times$  SSC, 0.1% SDS at 65°C for Southern or Northern blots, respectively.

#### Acknowledgements

We thank Dr Pierre Chardin for fruitful discussion and advice. We are grateful to Dr Martin Dyer for critical review of the manuscript. We thank Gérard Lecocq for computer sequence data management. The secretarial and photographic work of Marie-Claire Duvieuxbourg is gratefully acknowledged. This work was supported by a grant from the Comité du Nord de la Ligue Nationale Française Contre le Cancer and the Fondation de France.

Donaldson JG and Klausner RD. (1994). *Current Opinion in Cell Biology*, **6**, 527–532.  
Drivas GT, *et al.* (1990). *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 1793–1798.  
Ellis RW, *et al.* (1981). *Nature*, **292**, 506–511.  
Fasano O, *et al.* (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4008–4012.  
Fukuhara S, Rowley JD, Variakojis D and Golomb HM. (1979). *Cancer Res.*, **39**, 3119–3128.  
Hein J. (1989). *Methods in Enzymology*, **183**, 626–645.  
Kerckaert JP, *et al.* (1993). *Nature Genet.*, **5**, 66–70.  
Kikuchi A, *et al.* (1988). *J. Biol. Chem.*, **263**, 2897–2904.  
Knaus UG, *et al.* (1992). *J. Biol. Chem.*, **267**, 23575–23582.  
Leder P, *et al.* (1983). *Science*, **222**, 765–771.

- Lenoir GM, Preud'homme JL, Bernheim A and Berger R. (1982). *Nature*, **298**, 474-476.
- Lowe DG, et al. (1987). *Cell*, **48**, 131-146.
- Luo L, Liao YJ, Jan LY and Jan YN. (1994). *Genes and Development*, **8**, 1787-1802.
- Madaule P and Axel R. (1985). *Cell*, **41**, 31-40.
- Maguire J, et al. (1994). *Science*, **265**, 241-244.
- Manolova Y, et al. (1979). *Hereditas*, **90**, 5-10.
- Miki T, et al. (1994). *Blood*, **83**, 26-32.
- Olofsson B, et al. (1988). *Oncogene*, **3**, 231-234.
- Paterson H, et al. (1990). *J. Cell. Biol.*, **111**, 1001-1007.
- Pizon VP, et al. (1988). *Oncogene*, **3**, 201-204.
- Polakis PG, et al. (1989). *J. Biol. Chem.*, **264**, 16383-16389.
- Reibel L, et al. (1991). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **175**, 451-458.
- Reynet C and Kahn CR. (1993). *Science*, **262**, 1441-1444.
- Ridley AJ and Hall A. (1992). *Cell*, **70**, 389-399.
- Seeburg PH, et al. (1984). *Nature*, **312**, 71-77.
- Terryn N, Van Montagu M and Inzé D. (1993). *Plant. Mol. Biol.*, **22**, 143-152.
- Touchot N, Chardin P and Tavitian A. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8210-8214.
- Tsujimoto Y, et al. (1984). *Science*, **226**, 1097-1099.
- Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A and Sander C. (1991). *Biochemistry*, **30**, 4637-4648.
- Van der Sluijs P, et al. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6313-6317.
- Vincent S, Jeanteur P and Fort P. (1992). *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 3138-3148.
- Ye BH, et al. (1993). *Science*, **262**, 747-750.
- Zahraoui A, Touchot N, Chardin P and Tavitian A. (1989). *J. Biol. Chem.*, **264**, 12394-12401.

## SHORT COMMUNICATION

# Genomic Structure and Assignment of the *RhoH/TTF* Small GTPase Gene (*ARHH*) to 4p13 by *in Situ* Hybridization

Emmanuelle Dallery-Prudhomme,\* Christophe Roumier,\*† Claude Denis,\* Claude Preudhomme,\*† Jean-Pierre Kerckaert,\* and Sylvie Galiegue-Zouitina\*<sup>1</sup>

\*U.124 INSERM, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, 59045 Lille Cédex, France; and †Laboratoire d'Hématologie, Hôpital A. Calmette, 59037 Lille Cédex, France

Received December 18, 1996; accepted April 30, 1997

The *RhoH/TTF* (*ARHH*) gene encodes a new member of the Ras superfamily of small GTPases. The gene was identified by fusion to the *BCL6/LAZ3* oncogene in an initially described t(3;4)(q27;p11) translocation in a non-Hodgkin's lymphoma cell line. The predicted amino acid sequence of the *RhoH/TTF* gene product includes Rho-like GTPase structural motifs. The *RhoH/TTF* gene is restrictively expressed in hematopoietic cells and tissues. Mutations in the human *RAS* genes have been shown previously to be tumorigenic; in the search for a potential implication of the *RhoH/TTF* gene in hematopoietic malignancies, we established its genomic structure. The *RhoH/TTF* gene spans 35 kb and contains two exons, with the second bearing the entire amino-acid-coding region. Chromosomal mapping, by FISH experiments, places the *RhoH/TTF* gene on the short arm of chromosome 4, band p13. © 1997

Academic Press

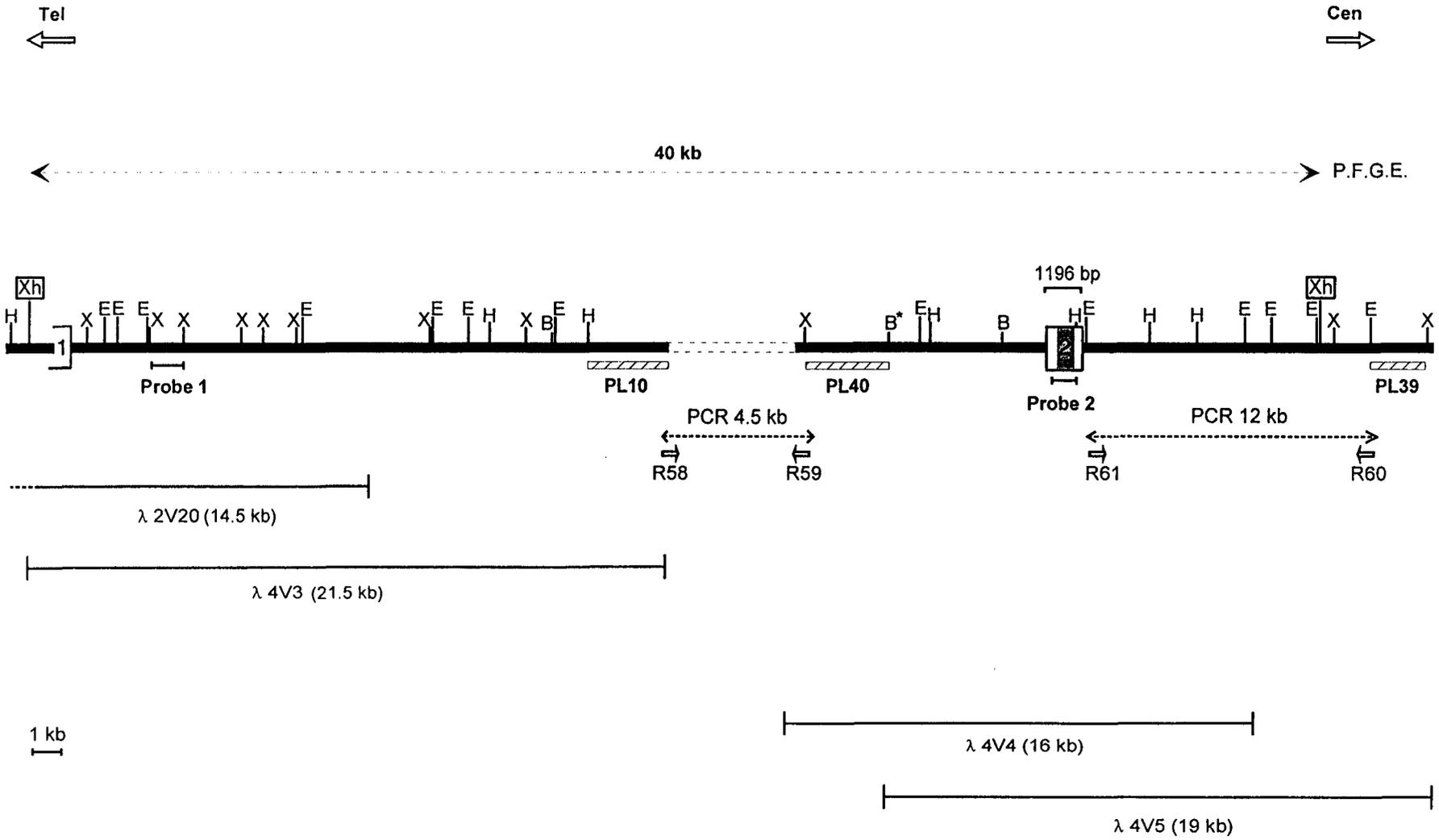
be involved in the guanine nucleotide-binding and hydrolysis functions of the Ras GTPases, but with some distinctive features (4). Almost all *RAS*-like genes are expressed ubiquitously. However, the transcription of *RhoH/TTF* is restricted to the hematopoietic tissues (4, and results to be published). In this regard, *RhoH/TTF* is similar to the *RAC2* gene (14). Activated *RAS* genes have been found in many neoplasms (1). Two mechanisms of activation have been demonstrated. The first involves the placement of *HRAS* under downstream promotional control of a strong retroviral LTR (5), while the second involves a somatic activating mutation in the p21 coding sequence of *HRAS* (13). In the latter case, the mutation was localized in the GTP-binding region of the protein. To evaluate the potential implication of *RhoH/TTF* in spontaneous or heritable disease processes, we elucidate its gene structure and demonstrate its chromosomal location at 4p13, through FISH experiments.

Recently we discovered a new member of the Rho protein subfamily, designated *TTF*, for translocation three four. The *TTF* gene was identified by its fusion to the *BCL6/LAZ3* oncogene, in an initially described t(3;4)(q27;p11) translocation, present in a non-Hodgkin's lymphoma cell line, VAL (4). The gene was very recently renamed *RhoH* (*ARHH*) being "HUGO" official designation of the locus). Indeed, the protein sequence of *RhoH/TTF* possesses many Rho hallmarks, and phylogenetic analysis revealed that the *RhoH/TTF* product defines a new group within the Rho subfamily, distinct from both Rho and Cdc42 groups. The *RhoH/TTF* gene product contains all the conserved structural motifs known to

Three clones corresponding to the genomic germline *RhoH/TTF* configuration were isolated by screening the human VAL cell line genomic library (4). One clone ( $\lambda$ 4V3) was obtained previously using the genomic probe 1 (PL3 in Ref. 4). Two new overlapping clones ( $\lambda$ 4V4 and  $\lambda$ 4V5), which did not overlap with the  $\lambda$ 4V3 clone, were isolated using the 1.4-kb *RhoH/TTF* cDNA probe (described in Ref. 4). The restriction map of the *RhoH/TTF* (*ARHH*) locus, 40 kb long, is shown in Fig. 1A. Two exons were mapped using cDNA probe hybridization and PCR experiments. The first exon was located in clone  $\lambda$ 4V3 and the second within the overlapping  $\lambda$ 4V4 and  $\lambda$ 4V5 clones. Sequence analysis indicated that the intron/exon boundaries follow the donor-acceptor ag/gt rule (data not shown). Due to repetitive sequences and a lack of overlap between the  $\lambda$ 4V3 and the  $\lambda$ 4V4- $\lambda$ 4V5 clones, a block in chromosomal walking oc-

to whom correspondence should be addressed. Telephone: (33) 03 20 16 92 20. Fax: (33) 03 20 16 92 29.

A



SHORT COMMUNICATION

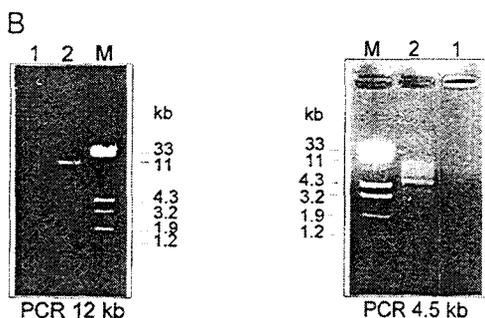


Fig. 1. Genomic structure of the *RhoH/TTF* gene. (A) Restriction map. The white (noncoding) and gray (coding) boxes represent the exons. Exon 1 has been drawn with an open 5' end, as the CAP site has not been determined. The restriction enzymes used were *EcoRI* (E), *BamHI* (B), *HindIII* (H), *XbaI* (X), and *XhoI* (Xh). The asterisk marks a RFLP site. The thin black segments represent the genomic clones used to establish the map. (The  $\lambda$ 2V20 clone was isolated independently from a normal DNA library and utilized only for the FISH experiments.) Telomeric and centromeric orientations (white horizontal arrows) were deduced from both *BCL6/LAZ3* gene orientation in our previous studies on the t(3;4) translocation (4). The long-range PCR experiments were carried out using sequences from three subcloned genomic DNA fragments PL10 (R58), PL40 (R59), and PL39 (R60) and from the *RhoH/TTF* cDNA (R61). (B) Nested template PCR results. Primers were as follows: R58, 5'-AGTAAGCCGAGATCGCACCAC-3'; R59, 5'-TCCTTGATTTCCTGGGAGTGG-3'; R60, 5'-TGGTTCAGCATTACTATGCACGACTG-3'; and R61, 5'-AGGCCAGGAGACGAAACAAGAGGCTC-3'. M, size marker; 1, reference water; 2,  $\lambda$ V5 total genomic (Boehringer) DNA, on the left or right, respec-

ed. Thus the length of the single, large intron in the gene could not be determined. This necessitated the measurement of the gap between  $\lambda$ 4V3 and  $\lambda$ 4V4 by conducting pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) experiments, as described previously on *XhoI* digests of normal genomic DNA. The physical distance between the two framed *XhoI* sites is shown in Fig. 1A. In normal DNA, we observed comigration of probes 1 and 2 with a *XhoI* genomic DNA fragment 40 kb in length (data not shown). According to the restriction map (Fig. 1A), the size of the uncloned intronic region is approximately 4.5 kb. This length was confirmed by long, expanded nested template PCR experiments (Boehringer), using the following primer pairs: (i) R58–R59 primers with genomic DNA template and (ii) R60–R61 primers with cDNA template, as a control (Figs. 1A and 1B). The *RhoH/TTF* (*ARHH*) locus was found to span approximately 35 kb and to contain two exons separated by a large 30-kb intron. The first exon is noncoding, and the second exon contains the entire coding portion of the gene. Few genes analogous to *RhoH/TTF*, which encode for small GTPases, have been thoroughly characterized structurally; notable exceptions include the *KRAS* (3, 9) and *HRAS* (2, 3) genes and the *GEM* gene (15). The *RAS* genes show intraspecies (2, 9) and interspecies (3) conservation of gene

structure, suggesting the existence of an ancestor gene (9). The structure of the *GEM* gene, belonging to another subfamily, is also structurally similar to the *RAS* genes. These gene families include one non-coding exon and four encoding exons, but do not share a common organization of intron/exon boundaries (15). The structure of the *RhoH/TTF* gene, belonging to the Rho subfamily, is quite different.

The chromosome assignment of the *RhoH/TTF* gene to the short arm of chromosome 4 was initially based only on the description of the t(3;4)(q27;p11) chromosomal translocation, and it was thus necessary to demonstrate this mapping by use of more accurate techniques. The precise mapping at 4p13 was achieved by FISH on metaphases and prometaphases (Fig. 2). FISH experiments were conducted using a mix of the  $\lambda$ 4V3,  $\lambda$ 4V5, and  $\lambda$ 2V20 genomic clones as probe (Fig. 1A). This probe overlaps approximately 50 kb of the *RhoH/TTF* sequence. Thirty nanograms of each of the three clones were mixed and labeled by nick-translation with biotin-14-dATP (Gibco BRL) and were cohybridized with a spectrum orange-labeled centromeric probe of chromosome 4 (kindly provided by Vysis, France), to metaphase chromosome spreads of karyotypically normal cultured lymphocytes (Vysis). *RhoH/TTF*–DNA hybridization was detected with FITC-conjugated avidin, as described previously (6). Metaphase and prometaphase spreads were respectively counterstained with DAPI and propidium iodide (PI) diluted in antifade medium. Detection with FITC-conjugated avidin revealed, on 38 of the 40 studied metaphases (including 20 prometaphases), a highly specific green signal immediately telomeric to the centromere (Fig. 2A) in the region p11–p13 of chromosome 4 (Fig. 2B). A more accurate assignment was determined by “R” banding on prometaphases (Fig. 2C) and fractional length from pter measurements (8) (not shown). Thus, the *RhoH/TTF* (*ARHH*) gene has been localized to the band 4p13.

It has been reported that two members of the Rho-like proteins subfamily, Rac-1 and RhoA, have a role in Ras (or cellular) transformation. These GTPases are key elements in signal-transduction pathways controlling the formation of lamellipodia and stress fibers, respectively induced by growth factors or oncogenic Ras (10). Indeed, the expression of a constitutively activated Rac-1 protein is sufficient to cause malignant transformation, and Rac activity is required for Ras transformation (11). RhoA does not induce transformation alone but does act cooperatively through the Ras effector, Raf (12). The *RhoH/TTF* gene has been linked to a number of chromosomal translocations (4, and results to be published). To address the role of *RhoH/TTF* in pathologic transformations, we are searching for additional rearrangements of this gene in other hemopoietic malignancies.

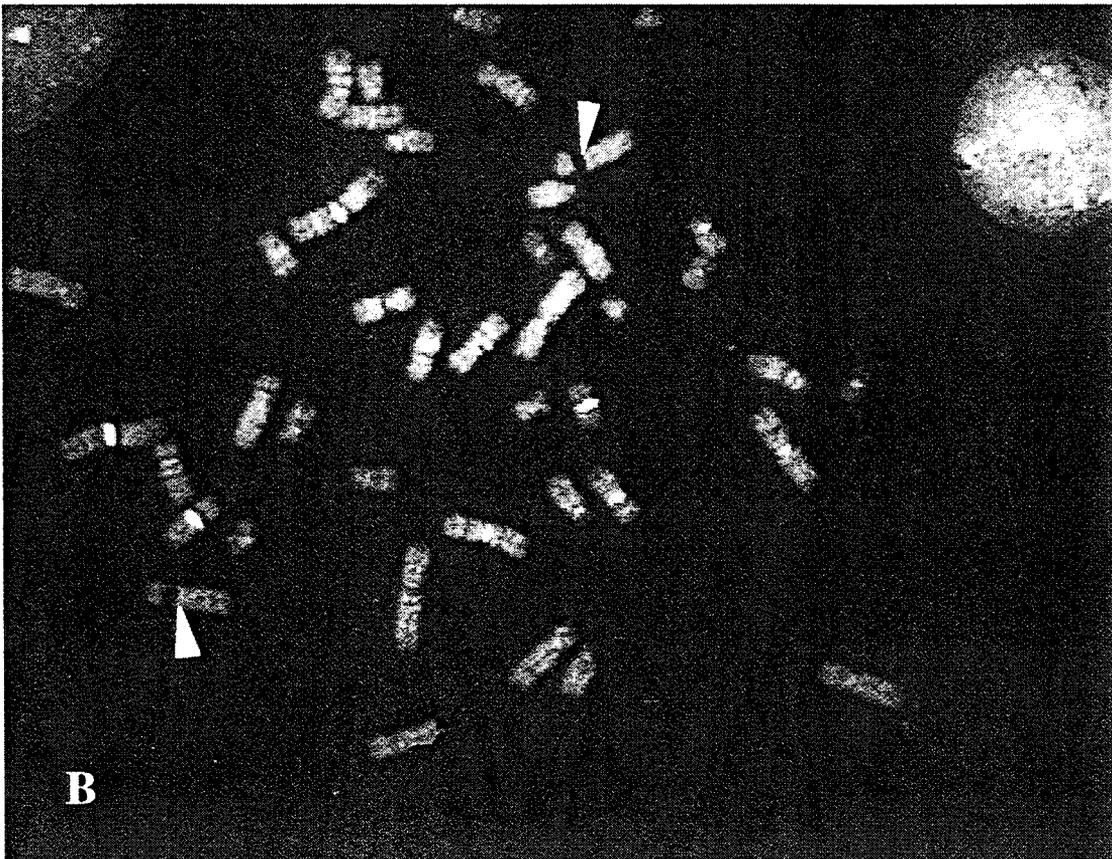
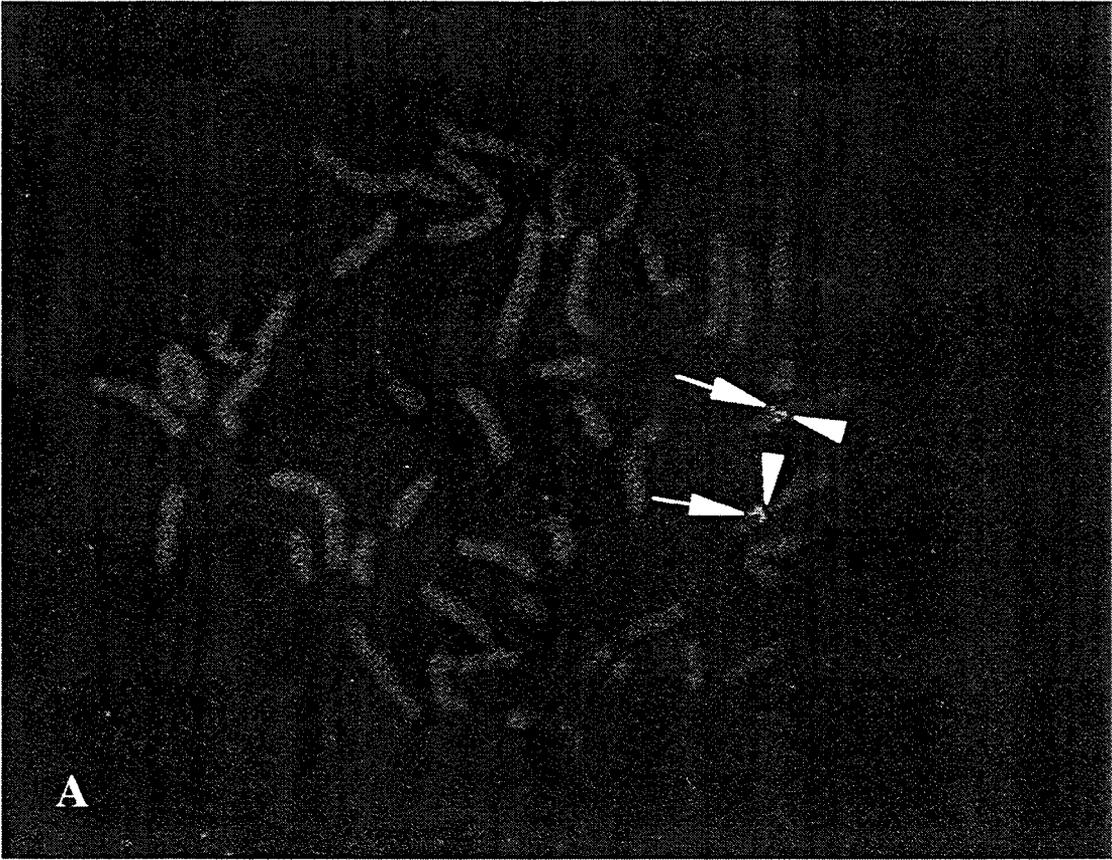




FIG. 2. FISH on metaphases and prometaphases of karyotypically normal blood lymphocytes. (A) (First metaphase, DAPI counterstaining) Probes: (i) a spectrum orange-labeled probe (Vysis, France) for the highly repeated human satellite DNA sequences specific for centromere of chromosome 4 (arrowheads), (ii) a biotin-labeled *RhoH/TTF* DNA probe, detected with FITC-avidin (thin arrows). Two spots of green signals are observed on the short arm of chromosome 4 near the centromere (red signals), indicating the position of the *RhoH/TTF* gene. (B) (Second metaphase) The black and white picture shows the computer-enhanced "C"-banding pattern from the DAPI counterstaining, with the superimposed signal of *RhoH/TTF*. (C) (Prometaphase, PI counterstaining): the "R"-banding pattern gives the assignment of *RhoH/TTF* (thin arrows) to band p13 of chromosome 4. Images were captured on a Zeiss microscope, using a Sensys 1400 cooled CCD camera. FISH analysis was done using the Vysis QUIPS smart capture FISH imaging software.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to C. G. Baumann for a critical review of the manuscript. We thank M. F. Croquette and B. Delobel (from Hôpital Saint-Jacques, Lille) for purchasing and analyzing the prometaphases. This work was supported by grants from the "Association pour la Recherche contre le Cancer," and from the "Ligue Nationale Contre le Cancer, Comités du Nord."

#### REFERENCES

- Bos, J. L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.* **49**: 4682-4689.
- Capon, D. J., Chen, E. Y., Levinson, A. D., Seeburg, P. H., and Goeddel, D. V. (1983). Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* **302**: 33-37.
- Chang, E. H., Gonda, M. A., Ellis, R. W., Scolnick, E. M., and Lowy, D. R. (1982). Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4848-4852.
- Dallery, E., Galiègue-Zouitina, S., Collyn-d'Hooghe, M., Quief, S., Denis, C., Hildebrand, M. P., Lantoine, D., Dewindt, 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.
- De Feo, D., Gonda, M. A., Young, H. A., Chang, E. H., Lowy, D. R., Scolnick, E. M., and Ellis, R. W. (1981). Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming

SHORT COMMUNICATION

- gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 3328-3332.
- Flactif, M., Lai, J. L., Preudhomme, C., and Fenaux, P. (1994). Fluorescence *in situ* hybridization improves the detection of monosomy 7 in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **8**: 1012-1018.
- Galiègue-Zouitina, S., Collyn-d'Hooghe, M., Denis, C., Mainardi, A., Hildebrand, M. P., Tilly, H., Bastard, C., and Kerckaert, J. P. (1994). Molecular cloning of a t(11;14)(q13;q32) translocation breakpoint centromeric to the BCL1-MTC. *Genes Chromosomes Cancer* **11**: 246-255.
- Lichter, P., Chang, C.-J., Call, K., Hermanson, G., Evans, G. A., Housman, D., and Ward, D. C. (1990). High resolution mapping of human chromosome 11 by *in situ* hybridization with cosmid clones. *Science* **247**: 54-69.
- McGrath, J. P., Capon, D. J., Smith, D. H., Chen, E. Y., Seeburg, P. H., Goeddel, D. V., and Levinson, A. D. (1983). Structure and organization of the *Ki-ras* proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* **304**: 501-506.
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**: 53-62.
11. Qiu, R.-G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F., and Symons, M. (1995). An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* **374**: 457-459.
12. Qiu, R.-G., Chen, J., McCormick, F., and Symons, M. (1995). A rôle for Rho in Ras transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11781-11785.
13. Reddy, E. P., Reynolds, R. K., Santos, E., and Barbacid, M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* **300**: 149-152.
14. Reibel, L., Dorseuil, O., Stancou, R., Bertoglio, J., and Gacon, G. (1991). A hemopoietic specific gene encoding a small GTP binding protein is overexpressed during T cell activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**: 451-458.
15. Santoro, T., Maguire, J., McBride, O. W., Avraham, K. B., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Kelly, K. (1995). Chromosomal organization and transcriptional regulation of human GEM and localization of the human and mouse GEM loci encoding an inducible Ras-like protein. *Genomics* **30**: 558-564.

## **Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a Rho-GTPase, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma**

\*C Preudhomme<sup>1,2</sup>, \*C Roumier<sup>1,2</sup>, MP Hildebrand<sup>1</sup>, E Dallery-Prudhomme<sup>1</sup>, D Lantoine<sup>1</sup>, JL Lai<sup>1,3</sup>, A Daudignon<sup>4</sup>, C Adenis<sup>5</sup>, F Bauters<sup>6</sup>, P Fenaux<sup>1,6</sup>, JP Kerckaert<sup>1</sup>, and S Galiègue-Zouitina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U.524, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille; <sup>2</sup>the Laboratoire d'Hématologie A, CHU, Lille; <sup>3</sup>the Laboratoire de Cytogénétique, CHU, Lille; <sup>4</sup>the Département d'Hématologie et de Cytogénétique, CHG Valenciennes; <sup>5</sup>the Laboratoire de Cytogénétique, Centre Oscar Lambret, Lille; <sup>6</sup>the Service des Maladies du Sang, CHU Lille, France.

\*C. Preudhomme and C. Roumier should be considered as equal first authors.

Correspondence should be addressed to : Dr. Sylvie Galiègue-Zouitina, U.524 INSERM, Institut de Recherches sur le Cancer, place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France ; Tel : 33 3 20 16 92 20 ; Fax : 33 3 20 16 92 29

**Short title** : Nonrandom 4p13 rearrangement of the RhoH/TTF gene

**Key words** : non Hodgkin's lymphoma, translocation, RhoH/TTF, small G protein, LAZ3/BCL6.

## Abstract

We recently isolated the RhoH/TTF gene by its fusion to the LAZ3/BCL6 gene, in a non-Hodgkin lymphoma (NHL) cell line, which bore a t(3;4)(q27;p11-13) translocation. This gene encodes a novel Rho-GTPase and is specifically expressed in hematopoietic tissues. We made its precise mapping at band 4p13, and described its partial genomic structure. Using fluorescence *in situ* hybridization and molecular analyses, we report here on the rearrangement of the RhoH/TTF gene, at band 4p13, in four cases of NHL with t(3;4)(q27;p13) translocation and its fusion to the LAZ3/BCL6 gene at band 3q27, in two of these cases. RT-PCR analysis of these two cases allowed the detection of variable fusion transcripts emerging from the rearranged alleles, and in one case, a deregulated expression of both RhoH/TTF and LAZ3/BCL6 genes, by promoter substitution, was observed. We also show here another rearrangement of the RhoH/TTF gene in a patient with multiple myeloma and t(4;14)(p13;q32) translocation, with breakage within the IGH gene.

It is the first report which describes the recurrent chromosomal alteration of a small GTPase encoding gene, in patients with hematopoietic malignancies.

## Introduction

Recurrent reciprocal chromosome translocations involving a number of oncogene loci are found in several types of non-Hodgkin lymphoma (NHL) (Rabbitts, 1994). Two NHL subtypes, follicular lymphoma and Burkitt's lymphoma, are associated with t(14;18)(q32;q21) and t(8;14)(q24;q32) translocations which involve the BCL2 (Tsujimoto *et al.*, 1984) and MYC (Manolova *et al.*, 1979) oncogenes, at bands 18q21 and 8q24, respectively. Deregulated over-expression of both BCL2 and MYC oncogenes results from their fusion with immunoglobulin (IG) genes (at band 14q32). In mantle cell lymphoma, the t(11;14)(q13;q32) translocation specifically induces over-expression of the cyclin D1 (PRAD1) gene, by juxtaposition with the IG gene (Motokura *et al.*, 1991). Translocations which involve band 3q27 are the third most common specific abnormalities in NHL (Bastard *et al.*, 1994) and are associated with disruption of a zinc-finger encoding gene, LAZ3 or BCL-6 (Kerckaert *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 1993). The LAZ3 (BCL-6) gene encodes a sequence-specific BTB-POZ transcriptional inhibitor (Albagli *et al.*, 1995), and might be implicated in chromatin modelling and gene regulation via its BTB/POZ protein-protein interaction domain (Dhordain *et al.*, 1995). LAZ3 exerts its transcriptional repressing effect by the recruitment of both the SMRT co-repressor (Dhordain *et al.*, 1997) and a SMRT/mSIN3A/Histone deacetylase containing complex (Dhordain *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1998). The LAZ3 gene shows a specific and high expression in germinal-center (GC) B cells (Cattoretti *et al.*, 1995; Bajalica-Lagerkrantz *et al.*, 1997) and controls GC formation and Th2-type inflammation (Dent *et al.*, 1997; Ye *et al.*, 1997).

We have recently discovered a new member of the Rho protein subfamily, designated TTF (for Translocation Three Four), which was later renamed RhoH. The RhoH/TTF gene has been identified by its fusion to the LAZ3 gene in a t(3;4)(q27;p11-13) translocation present in

a non-Hodgkin lymphoma cell line, VAL (Dallery *et al.*, 1995). The RhoH/TTF protein sequence possesses many Rho-hallmarks and phylogenetic analysis have shown that the RhoH/TTF product defines a new group within the Rho subfamily, distinct from both Rac and Cdc42 groups (Dallery *et al.*, 1995). Almost all *Ras*-like genes are ubiquitously expressed. However, the transcription of RhoH/TTF is only observed in hematopoietic tissues (Dallery *et al.*, 1995). In this regard, this gene is similar to the Rac2 gene (Reibel *et al.*, 1991). We have recently mapped RhoH/TTF, at band 4p13, by FISH experiments and we have described the partial gene structure, showing one first non-coding exon and a second single coding exon, bearing the entire coding part of the gene (Dallery-Prudhomme *et al.*, 1997). We have very recently isolated another 5' non-coding exon (called exon 1a) (unpublished results), but the function of the two 5' non-coding exons (1a, 1b) is not established at this time (work in progress).

We report here on fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis on four cases of NHL which bear a t(3;4)(q27;p13) translocation, and RT-PCR, Northern blot analyses on two of these cases. Our results show the disruption of the RhoH/TTF gene in the four cases, and its fusion with the LAZ3 gene, at band 3q27, in two cases. RT-PCR analyses of these two cases allowed us to show that at least in one case, a consequence of the translocation was a deregulated expression of both RhoH/TTF and LAZ3 genes, by promoter substitution. We also show here that the RhoH/TTF gene is not only the LAZ3 partner in these 4p13 abnormalities, but can also be involved in other chromosome translocation: using the same methods, we describe the rearrangement of this gene in one case of multiple myeloma which bears a single translocation, t(4;14)(p13;q32). We demonstrate in this case the IgH gene rearrangement, in the C $\alpha$ 2-C $\epsilon$  region, using FISH. Our results indicate for the first time the

recurrent chromosomal alteration of a small GTPase encoding gene in hematopoietic malignancies.

## Results

### *Cytogenetic findings*

Main cytogenetic results of the 5 patients are summarized in Table 2. All of the patients showed structural change on 4p13 region : the four NHL patients had t(3;4)(q27;p13) (Table 2: patients 1-4) and the multiple myeloma (MM) patient had t(4;14)(p13;q32) (Table 2 : patient 5). All NHL karyotypes showed additional abnormalities, including the same t(14;18)(q32;q21) translocation, characteristic of follicular lymphoma in patients 1 through 4. In patient 3 at least, the t(3;4)(q27;p13) translocation was a secondary event, as this patient had two clones, the first which had a t(14;18) and other abnormalities, and the second which presented the same abnormalities, and also t(3;4). All NHL patients had complete (case 4) or partial (cases 1, 2, 3) monosomy for chromosome 6. Clinical data about the patients with t(3;4) have been recently reported (Daudignon *et al.*, 1999).

*The RhoH/TTF gene is disrupted in all patients with t(3;4) translocation and fuses to the LAZ3 (BCL-6) gene in two cases*

FISH analysis was used (in all of the patients) to detect RhoH/TTF rearrangements. Fig 1 shows a schematic representation of the RhoH/TTF locus, and indicates the probe which was used in this technique : a combination of the three genomic clones  $\lambda$ 2V18,  $\lambda$ 4V3 and  $\lambda$ 4V5.

### *FISH analysis of the four patients with t(3;4)*

The RhoH/TTF probe (labeled in green) was co-hybridized with two centromeric probes, one of chromosome 4 (labeled in orange) and one of chromosome 3 (labeled in green). To validate

the FISH assay, metaphase chromosomes prepared from normal blood lymphocytes and from the t(3;4) positive lymphoma cell line, VAL, were initially analyzed. As expected, a splitting of the RhoH/TTF signal was observed, in 29 of the 30 metaphases of the VAL cell line which were studied : part of the signal remained on 4p13, and the other part was translocated on the long arm of the derivative chromosome 3 (der 3) (data not shown). By comparison, hybridization of the probe on metaphases from normal blood lymphocytes revealed only two pairs of green spots on normal chromosomes 4. Fig 2 shows the FISH analysis of lymphoma cells spreads from the four patients with t(3;4), showing the splitting of the RhoH/TTF signal by the translocation, as observed in the VAL cell line. For each patient, at least ten metaphases with abnormal signals were observed.

FISH analysis was also performed on these patients using a fluorescent LAZ3 probe, and in the four cases the disruption of this gene by the translocation was confirmed (data not shown). DNA was prepared from patient 1, allowing in this case detection of the RhoH/TTF gene rearrangement, by Southern blot analysis and LD-PCR experiments, allowing us to precise the location of the breakpoint within the RhoH/TTF gene in this case, between exons 1a and 1b (data not shown), unlike in the VAL cell line which broke between exons 1b and 2 (Dallery et al., 1995).

#### *RT-PCR and Northern blot analyses on two patients with t(3;4)*

RNA could be prepared from patients 1 and 3, allowing RT-PCR and Northern blot experiments.

We searched for deregulated expression of the LAZ3 or/and RhoH/TTF gene as a consequence of the translocation, by detecting the fusion transcripts which emerged from the derivative chromosomes 3 and 4 (der 3 and der 4), using RT-PCR analysis. RT-PCR

experiments were performed on patients 1 and 3, and on the Raji and VAL cell lines, as negative and positive controls, respectively. Table 1 gives the sequences of all primers used in these PCR experiments, and Fig 3 shows a schematic representation of RhoH/TTF and LAZ3 fusion cDNAs, with the positions of the primers' pairs used, and the PCR results. In patient 1, two fusion transcripts were characterized: (i) a TTF(1a)-LAZ3 transcript, fusing the RhoH/TTF exon 1a to the LAZ3 exon 2 (Fig 3: assay I, product 1) and (ii) a reciprocal LAZ3-TTF fusion product (assay III), joining the LAZ3 regulatory 5' sequences (exon 1a) to the entire RhoH/TTF coding part (exon 2). This reciprocal fusion transcript was also present in the VAL cell line, but not in patient 3. The TTF(1a)-LAZ3 fusion transcript was also detected in patient 3 as in the VAL cell line (assay I, product 1). Another TTF-LAZ3 product, fusing RhoH/TTF exons (1a-1b) together to the LAZ3 exon 2, was present in patient 3 as in the VAL cell line, but was absent in patient 1 (assay I, product 2). Such fusion products with a splice junction between RhoH/TTF exon 1b and LAZ3 exon 2 were also amplified from the RhoH/TTF exon 1b, in patient 3 as in VAL cell line, but not in patient 1 (assay II). Each PCR assay was confirmed using other primers' pairs (see Table 1), leading to the obtention of identical fusion products. All of the PCR products were sequenced (ABI PRISM 301, Perkin Elmer), and the exact sequences of the corresponding exons and the different splice junctions were retrieved (data not shown). The normal RhoH/TTF and LAZ3 transcripts, emerging from normal or tumor cells, were observed in both patients, as in the VAL and Raji cell lines (data not shown).

Northern blot analysis on total RNAs of patients 1 and 3 (Fig 4), allowed to detect in both cases the major 2.2 kb RhoH/TTF transcript (Dallery *et al.*, 1995). The RhoH/TTF cDNA probe (1.4 kb cDNA, containing exons 1b and 2), detected an additional transcript, about 3.8 kb in size, in patient 3 as in the VAL cell line, but not in patient 1 (Fig 4). According to the

RT-PCR data (Fig 3), this transcript could correspond to a TTF(1b)-LAZ3 fusion RNA, which would exhibit almost the same size as the normal LAZ3 transcript (assuming sizes of 250 bp for RhoH/TTF exon 1b and of 400 bp for LAZ3 exon 1a, respectively (Kerckaert *et al.*, 1993; Dallery *et al.*, 1995).

*The RhoH/TTF gene is rearranged in one case of multiple myeloma with t(4;14)(p13;q32) and breakage of the IgH gene*

Because there was a weak amount of myeloma metaphasic cells in the marrow spreads of patient 5, only eight metaphases could be analyzed by FISH, among them three had t(4;14) translocation. FISH experiments indicating the splitting of the RhoH/TTF gene are shown in Fig 5. As in the patients with t(3;4), the RhoH/TTF probe (green signal), was co-hybridized with two centromeric probes, of chromosome 4 (orange signal) and of chromosomes 14/22 (red signal), to metaphase spreads of patient 5. The derivative chromosome 14 exhibited two green spots, showing the splitting of the RhoH/TTF signal, with transfer of part of this signal on the long arm of chromosome 14 (Fig 5 A). Because of cross-link of the centromeric chromosome 14/22 probe (Fig 5 A), a painting probe of chromosome 14q (labeled in orange) was used, to unambiguously identify the derivative chromosome 14. The RhoH/TTF green spots were observed on this derivative chromosome 14 (Fig 5 B), thus confirming the previous result (Fig 5 A). This rearrangement of the RhoH/TTF gene in patient 5 could be verified by Southern blot experiments (data not shown).

When hybridized to a JH probe, DNA of patient 5 did not revealed a rearrangement within the JH region (data not shown). For this reason, FISH experiments were conducted using three cosmids overlapping three different regions on the IgH gene locus, from telomere to centromere : JH-C $\mu$ -C $\delta$  (cos 3/64), C $\gamma$ 3 (cos Ig6), and C $\alpha$ 2-C $\epsilon$  (cos Ig10). Fig 5 C shows the

green signals which were obtained, using cosmids 3/64 and Ig6 as a first probe. The presence of a green signal on the derivative chromosome 4 confirmed that part of chromosome 14q32 was translocated on the short arm of chromosome 4, on three metaphases among the ten analyzed. In addition, the green signal totally disappeared from the derivative chromosome 14, indicating that the breakpoint on chromosome 14q32 was centromeric to the C $\gamma$ 3 region. For this reason, a new hybridization was performed with a second probe containing the three cosmids (Fig 5 D). Three green signals were observed on two other tumor metaphases, indicating that the breakpoint was located either within the Ig10 cosmid, or between Ig6 and Ig10 cosmids. Because of the weak intensity of the green signal observed on the derivative chromosome 14, the breakpoint seemed to be located rather within the Ig10 cosmid, i.e. in the C $\alpha$ -C $\epsilon$  region. This result confirmed the breakage of the IgH gene, by t(4;14) translocation, in patient 5.

Table 3 summarizes all FISH and molecular data concerning the five patients and the VAL cell line.

## Discussion

We have reported in this work non random chromosomal rearrangements of the 4p13 region, which were found in NHL (four cases) and in MM (one case), and always involved at band 4p13 the RhoH/TTF gene. RhoH/TTF rearrangements have been observed using at least three different techniques, in three of the five patients (n° 1, 3, 5) (Table 3). Patients 2 and 4 were studied by FISH only, due to a lack of material, but in both cases the quality of the spreads, and the large number of metaphases analyzed, allowed to rule out artifacts (Fig 2 B, D). Because, in follicular lymphoma t(14;18) is considered a primary event and because, in one of

the NHL cases, t(3;4) (q27;p13) was only found in some of the mitoses examined, this translocation with disruption of the RhoH/TTF gene was probably a secondary event (Daudignon *et al.*, 1999). Because two of the patients rapidly died and because all of the patients presented also a chromosome 6 abnormality, which is known to be of bad prognosis, it is difficult to evaluate the prognosis value of the t(3;4). This might be studied on a larger cohort of patients.

The RhoH/TTF partner gene in the t(3;4) recurrent abnormality was shown to be the LAZ3 gene. As often hypothesized or even demonstrated in many cases involving this gene at band 3q27, the critical molecular consequence of such translocations would be the substitution of the 5' regulatory elements of LAZ3 by heterologous regulatory sequences on the partner chromosome (Dallery *et al.*, 1995, Galiègue-Zouitina *et al.*, 1996; Akasaka *et al.*, 1997), which would lead to transcriptional deregulation of the gene (Ye *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998). For example, we previously cloned both t(3;4) (Dallery *et al.*, 1995) and t(3;11) (Galiègue-Zouitina *et al.*, 1996) chromosome translocations which involve at band 3q27 the LAZ3 gene; in both cases there was no formation of fusion proteins as a consequence of the partner genes rearrangements, but a promoter substitution, which may potentially deregulate the expression of these genes. We have here analyzed the RhoH/TTF and LAZ3 fusion transcripts in two patients (1 and 3, respectively) and in patient 1, we have suggested a deregulated expression of both LAZ3 and RhoH/TTF genes, by promoter exchange. Indeed, in this case, two fusion products of different origin were observed: (i) a TTF(1a)-LAZ3 fusion transcript, emerging from the derivative 3 allele, and (ii) a reciprocal LAZ3-TTF fusion transcript, emerging from the derivative 4 allele (Fig 3). Such a substitution, placing each gene under the control of the partner gene promoter, may lead to the deregulation of both gene expressions in this patient, like in the VAL cell line, where the same fusion transcripts were

detected. In patient 3 in contrast, the LAZ3 gene alone seemed to be deregulated by promoter exchange (in this case the reciprocal fusion transcript was not observed). In this patient as in the VAL cell line, two TTF-LAZ3 fusion transcripts were detected, showing an alternative fusion of LAZ3 exon 2 to either RhoH/TTF exon 1a alone, or exons 1a-1b together. In patient 1 in contrast, a splice junction was observed between only RhoH/TTF exon 1a (but not 1b) and LAZ3 exon 2, due to the position of the breakpoint within the RhoH/TTF gene. This heterogeneity of the TTF-LAZ3 fusion transcripts was checked in both patients using additional primer pairs (see Table 1, controls), confirming the results (data not shown). The exact function of the two first non coding exons of the RhoH/TTF gene is not known at this time, we only know that the same alternative splicing between 1a and 1b exons occurs in the normal RhoH/TTF transcripts (data not shown). Such a splicing may lead here in the patients to different LAZ3 gene deregulation events between the two cases. The Northern blot analysis (Fig 4) made on these two patients and cell line VAL was in agreement with the RT-PCR data. This indicates that among three different t(3;4) cases (patients 1, 3 and VAL cell line), there was a variability in the expression of LAZ3 and RhoH/TTF genes, emerging from both rearranged chromosomes 3 and 4, which may lead to variable deregulation events concerning these genes. We very recently described the rearrangement of both LAZ3 and LCP1 (L-Plastin) genes, at bands 3q27 and 13q14, in two cases of B-NHL with t(3;13)(q27;q14), and we analyzed the fusion transcripts in these two cases (Galiègue-Zouitina et al., 1999). As observed here in the t(3;4), there was a discrepancy between the two cases: both LAZ3 and LCP1 fusion transcripts were detected in one case, but only the LAZ3 fusion transcript was noted in the other case.

In patient 5 with multiple myeloma (MM), t(4;14) was the only chromosome abnormality. Therefore, RhoH/TTF is not only the LAZ3 partner translocation in the t(3;4), but might be

perhaps deregulated by other regions of other chromosomes, in this case the 14q32 region. We have shown here by FISH that the heavy chain immunoglobulin gene was disrupted in this patient 5 (Fig 5). We searched for an IgH-RhoH/TTF fusion transcript by conducting 5' RACE-PCR experiments (Marathon cDNA kit, Clontech), using a primer from RhoH/TTF exon 2 and the anchor primer, without success (data not shown). This could be due to the very low representation of such a transcript, or rather to its absence. We also checked the expression of RhoH/TTF in patient 5, by comparative Northern blot analysis of various plasma cell lines (with low RhoH/TTF expression) and of cells from patient 5. A notable RhoH/TTF expression was observed in patient 5, but was difficult to interpret, due to the contaminant RhoH/TTF expression emerging from the normal lymphocyte cells in this t(4;14) sample (not shown). Separating the tumor cells from the contaminating normal cells would have been of interest in this case, but was impossible to do here, due to a lack of material.

MM is frequently associated with chromosome abnormalities, especially translocations involving 14q32 and a variety of other chromosomes, including the short arm of chromosome 4 (Zandecki *et al.*, 1996 ; Bergsagel *et al.*, 1996). One case of t(4;14) was already described in MM, but with a breakpoint in the 4p16.3 region, implicating the FGFR3 gene, which was shown to be deregulated by juxtaposition to the IgH gene, in this observation (Chesi *et al.*, 1997). Another recurrent chromosome abnormality involving the short arm of chromosome 4 has been recently described, as a dicentric (4;17) chromosome with 4p11-pter/17p11-pter deletion (Callet-Bauchu *et al.*, 1996). This abnormality has been observed in three patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). Due to the orientation of the RhoH/TTF gene on chromosome 4p13: telomere-5'-3'-centromere (Dallery-Prudhomme *et al.*, 1997), we checked by FISH eleven CLL patients, five of them presenting a dic (4;17), to search for a RhoH/TTF disruption in these cases, and to determine if the gene could be deregulated by a promoter of

the 17p region. Our results indicated the absence of involvement of the RhoH/TTF gene in CLL (data not shown).

The RhoH/TTF gene encodes a small GTPase belonging to the Rho subfamily (Dallery *et al.*, 1995). Almost all Rho-like members are involved in the organization of actin cytoskeleton (Hall, 1998). These GTPases are key elements in signal-transduction pathways controlling the formation of lamellipodia, stress fibers, and filopodia, respectively induced by growth factors or oncogenic Ras (Nobes and Hall, 1995). It has been reported that three members of this Rho-like proteins subfamily, Rac-1, RhoA, and Cdc42 have a role in Ras (or cellular) transformation (Qiu *et al.*, 1995, a, b; Qiu *et al.*, 1997). Indeed, the expression of a constitutively activated Rac-1 protein is sufficient to cause malignant transformation and Rac activity is required for Ras transformation. The Tiam-1 protein, a GDP-dissociation stimulator (GDS) of the Rac-1 protein (Habets *et al.*, 1994) was shown to be involved in membrane ruffling and invasion (Michiels *et al.*, 1995) and thus, the Tiam1-Rac signaling pathway could be operating in the invasion and metastasis of tumor cells. More recently, it was shown that the Bcr-Abl-mediated leukemogenesis requires the activity of the Rac-1 protein (Skorski *et al.*, 1998).

According to our data, an involvement of the small G protein encoding gene RhoH/TTF in the tumorigenic process, as a LAZ3 partner, might be considered. To address the role of RhoH/TTF in neoplastic transformation, we are searching for additional rearrangements and activating mutations of this gene in hematopoietic malignancies, and are analyzing its transforming potential in different cellular systems.

## Material and methods

### *Patient samples, clinical and cytogenetic studies*

Between January 1993 and March 1997, cytogenetic analyses has been performed, on fresh lymphoid tissues in 272 cases of untreated B-NHL diagnosed in five hospitals from the North of France (« *Centre Hospitalier Universitaire de Lille, Centres Hospitaliers de Dunkerque, de Lens, de Seclin, de Valenciennes* ») and in 165 cases of Multiple Myeloma (MM) diagnosed in *Lille*. From the 410 successful examinations, four cases of follicular lymphoma and one case of multiple myeloma were selected, which showed a chromosome translocation involving the 4p13 region. The clinical and cytogenetic characteristics of the four cases with follicular lymphoma, which were all female patients aged from 39 to 70, have been very recently

published (Daudignon *et al.*, 1999: in this work, patient 2 was inversely referred to as patient 1 here, patient 3 to as patient 2, patient 4 to as patient 3, and patient 1 to as patient 4). Patient 5 with t(4;14), a female aged 62, was followed first for monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), progressively evolving into multiple myeloma. BM examination in 1996 revealed 40% of plasma cells with abnormal karyotype.

Cytogenetic analyses were performed in all cases after a 24 hour culture. Bone marrow (BM) cells (cases 1, 5) or lymph node (LN) cells (cases 2, 3, 4) were cultivated in RPMI 1640 supplemented with 20% fetal calf serum or in Chang medium (Clini Sciences, Irvine Scientific Inc, Santa Ana, CA). Both cultures were karyotyped and interpreted after G-banding or/and R-banding. Chromosome abnormalities were described according to International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 1992).

Metaphase spreads obtained for cytogenetic analysis were also used in FISH analysis.

### *Cell lines*

VAL and Raji cell lines were used as positive and negative controls in the RT-PCR and Northern blot experiments. The VAL cell line has been already described (Dallery *et al.*, 1995) as a stable continuous B cell line bearing a t(8;14;18)(q24;q32;q21) and a t(3;4)(q27;p11-13). The Raji B cell line was purchased from American Tissue Culture Collection (ATCC). Both cell lines were maintained in RPMI medium supplemented with 10% calf serum. Metaphases of the VAL cell line and normal metaphases (Vysis, Woodcreek, IL) were used as positive and negative controls, respectively, in FISH analysis.

### *Probes*

#### *FISH probes*

Centromeric probes specific for chromosomes 3, 4, and a painting probe for chromosome 14q were kindly provided by Vysis (Woodcreek, IL). The centromeric probe specific for chromosomes 14/22 was purchased from Oncor, Inc, (Gaithersburg, MD). Three clones of the RhoH/TTF locus were combined for a RhoH/TTF FISH probe (Fig 1), as previously used (Dallery-Prudhomme *et al.*, 1997) except that one clone,  $\lambda$  2V20, was replaced by the  $\lambda$  2V18 clone, to obtain a total overlap of approximately 60 kb, instead of 50 kb, as previously reported. The probe was labeled by nick-translation with biotin-14-dUTP (Gibco-BRL). This probe previously allowed us to obtain a good signal in FISH, using detection of the signal with fluorescein isothiocyanate (FITC)-avidin (Dallery-Prudhomme *et al.*, 1997). Three chromosome 14q32 cosmid clones were used, respectively located, from telomere to centromere, within the JH-C $\mu$ -C $\delta$ , C $\gamma$ 3 and C $\alpha$ 2-C $\epsilon$  regions within the IgH gene (cos 3/64, cos Ig6, and cos Ig10). Cos 3/64, cos Ig6 and cos Ig10 were generous gifts from M. Dyer, L. Coignet (Royal Marsden Hospital, Sutton, UK) and T. Rabbitts (MRC Laboratory of

Molecular Biology, Cambridge, UK), respectively. The three probes were labeled by nick translation with biotin-14 dUTP, and prior to their use on metaphase spreads from patient 5, each cosmid probe was checked on normal metaphases (Vysis) : all three cosmid probes gave clear and specific signals on sub-telomeric region of the long arm of chromosome 14 (not shown).

#### *cDNA probe*

The RhoH/TTF cDNA probe used in Northern blot experiments was a 1,4 kb cDNA fragment containing exons 1b and 2 (Dallery *et al.*, 1995).

#### *FISH analysis*

The RhoH/TTF probe was co-hybridized with the centromeric probes of chromosomes 3 and 4 in patients with t(3;4) and with the centromeric probes of chromosomes 4 and 14/22 (or a chromosome 14q painting probe) in the case of the patient with t(4;14), to metaphase spreads of lymphoma or myeloma cells of the different patient samples. RhoH/TTF and IgH DNA hybridizations were detected with FITC-conjugated avidin, as previously reported (Dallery-Prudhomme *et al.*, 1997). Metaphase spreads were counterstained with 4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) diluted in antifade medium (Vectashield), and analyzed using Quips Software (Vysis). The centromeric probes were labelled as follows : spectrum orange for chromosome 4 and chromosome 14q painting probe; texas red for chromosomes 14/22 centromeric probe; spectrum green for chromosome 3 centromeric probe. Dual color FISH assay was also performed with a spectrum orange centromeric probe of chromosome 4 and biotin-labeled IgH cosmids probe, on metaphase spreads of myeloma cells from patient 5.

### *RNA analysis*

In patients with sufficient material, RNA (patients 1, 3, 5) was prepared. Total cellular RNA was extracted from patients 1, 5 (from bone-marrow cells) and 3 (from tumor lymph node tissue), using guanidinium isothiocyanate and centrifugation through cesium chloride (Chirgwin *et al.*, 1979).

### *RT-PCR analysis*

RT-PCR method was used to detect RhoH/TTF and LAZ3/BCL6 transcripts from the RNAs of patients 1 and 3. We also used the VAL cell line RNA as a positive control and the Raji cell line RNA as a negative control in the analysis of the fusion transcripts. cDNAs were obtained by random-priming of 15 µg of total RNA with 125 units of M-MLV reverse transcriptase (Gibco-BRL). From these templates, we tried to amplify both fusion transcripts expected from the derivative chromosomes 3 and 4 and also normal both RhoH/TTF and LAZ3/BCL6 transcripts. The different primer's pairs used are described in Table 1.

### *Northern blot analysis*

Equal amounts of RNA (20 µg) were size fractionated on a denaturing formaldehyde 1% agarose gel and blotted onto nitro-nylon membrane hybond C (Amersham, Arlington Heights, IL). After Northern blotting, the filters were hybridized and washed as previously described (Kerckaert *et al.*, 1993 ; Dallery *et al.*, 1995).

## **Acknowledgments**

Drs M. Wetterwald, E. Auxenfans, P. Morel, from Dunkerque, Seclin, and Lens hospitals, are gratefully acknowledged for providing patients 3, 4, and 2 samples, respectively. We thank Dr

Marie-Christine Copin for the lymph nodes material. Drs Dyer, Coignet, and Rabbitts are gratefully acknowledged for giving us the IgH cosmids. The photographic work of Marie-Claire Duvieubourg is gratefully acknowledged. This work was supported by grants from “The Ligue Nationale Française contre le Cancer”, Comité du Pas de Calais, “The Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC)”, Comité du Nord, the “Fondation contre la Leucémie” and from the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM), France.

## References

- Albagli O, Deweindt C, Bernardin F, Dhordain P, Quief S, Lantoine D, Kerckaert JP, Leprince D. (1995). *Cell Growth & Differentiation*, **6**, 1495-1503.
- Akasaka T, Miura I, Takahashi N, Akasaka H, Yonetani N, Ohno H, Fukuhara S, Okuma M. (1997). *Cancer Res.*, **57**, 7-12 .
- Bajalica-Lagercrantz S, Piehl F, Lagercrantz J, Lindhal J, Weber G, Kerckaert JP, Porwit-Mac Donald A, Nordenskjöld M. (1997). *Leukemia*, **11**, 594-598.
- Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezzella F, Fruchard C, Monconduit M, Tilly H. (1994). *Blood*, **83**, 2423-2427.
- Bergsagel PL, Chesi M, Nardini E, Brents LA, Kirby SL, Kuehl WM. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13931-13936.
- Callet-Bauchu E, Rimokh R, Tigaud I, Pagès J, Gazzo S, Bastion Y, Sebban C, Magaud JP, Coiffier B, Felman P. (1996). *Genes Chromosom. Cancer*, **17**, 185-190.
- Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. (1995). *Blood*, **86**, 45-53.
- Chen W, Iida S, Louie DC, Dalla-Favera R and Chaganti RSK. (1998). *Blood*, **91**, 603-607.
- Chesi M, Nardini E, Brents LA, Schrock E, Ried T, Kuehl WM Bergsagel PL. (1997). *Nature Genet.*, **16**, 260-264.
- Chirgwin J, Przybyla A, Mc Donald R, Rutter W. (1979). *Biochem.*, **18**, 5294-5299.
- Dallery E, Galiègue-Zouitina S, Collyn-d'Hooghe M, Quief S, Denis C, Hildebrand MP, Lantoine D, Deweindt C, Tilly H, Bastard C, Kerckaert JP. (1995). *Oncogene*, **10**, 2171-2178.

- Dallery-Prudhomme E, Roumier C, Denis C, Preudhomme C, Kerckaert JP, Galiègue-Zouitina S. (1997). *Genomics*, **43**, 89-94.
- Daudignon A, Bisiau H, Lai JL, Wetterwald M, Galiègue-Zouitina S, Morel P, Duthilleul P. (1999). *Cancer Genet Cytogenet*, **111**, 157-160.
- Dent AL, Shaffer AL, Yu X, Allman D, Staudt LM. (1997). *Science*, **276**, 589-592.
- Dhordain P, Albagli O, Ansieau S, Koken MHM, Deweindt C, Quief S, Lantoine D, Leutz A, Kerckaert JP, Leprince D. (1995). *Oncogene*, **11**, 2689-2697.
- Dhordain P, Albagli O, Lin RJ, Ansieau S, Quief S, Leutz A, Kerckaert JP, Evans RM, Leprince D. (1997). *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 10762-10767.
- Dhordain P, Lin RJ, Quief S, Lantoine D, Kerckaert JP, Evans RM, Albagli O. (1998). *Nucleic Acids Res*, **26**, 4645-4651.
- Galiègue-Zouitina S, Quief S, Hildebrand MP, Denis C, Detourmignies L, Lai JL, Kerckaert JP. (1999). *Genes, Chromosomes, Cancer*, **26**, 97-105.
- Galiègue-Zouitina S, Quief S, Hildebrand MP, Denis C, Lecocq G, Collyn-d'Hooghe M, Bastard C, Yuille M, Dyer MJS, Kerckaert JP. (1996). *Leukemia*, **10**, 579-587.
- Habets GGM, Scholtes EHM, Zuydgeest D, van der Kammen RA, Stam JC, Berns A, Collard JG. (1994). *Cell*, **77**, 537-549.
- Hall A. (1998). *Science*, **279**, 509-514.
- ISCN (1991). Guidelines for Cancer Cytogenetics, Supplement to an International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F (ed). Basel : S Karger.
- Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H, Quief S, Lecocq G, Bastard C. (1993). *Nature Genet.*, **5**, 66-70.
- Manolova Y, Manolov G, Kieler J, Levan A, Klein G. (1979). *Hereditas*, **90**, 5-1

- Michiels F, Habets GGM, Stam JC, van der Kammen RA, Collard JG. (1995). *Nature*, **375**, 338-340.
- Motokura T, Bloom T, Kim HG, Jüppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A. (1991). *Nature*, **350** : 512-515.
- Nobes CD, and Hall A. (1995). *Cell*, **81**, 53-62.
- Qiu R-G, Abo A, Mc Cormick F, Symons M. (1997). *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 3449-3458.
- Qiu R-G, Chen J, Kim D, Mc Cormick F, Symons M. (1995 a). *Nature*, **374**, 457-459.
- Qiu R-G, Chen J, Mc Cormick F, Symons M. (1995 b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11781-11785.
- Rabbitts TH. (1994). *Nature*, **372**, 143-149.
- Reibel L, Dorseuil O, Stancou R, Bertoglio J, Gacon G. (1991). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **175**, 451-458.
- Storski T, Wlodarski P, Daheron L, Salomoni P, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Wasik M, Calabretta B. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 11858-11862.
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. (1984). *Science*, **226**, 1097-1099.
- Wong CW, Privalsky ML. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 27695-27702.
- Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R, Leung C, Nouri-Shirazi M, Orazi A, Chaganti RSK, Rothman P, Stall A, Pandolfi P-P, Dalla-Favera R. (1997). *Nat Genet* **16** : 161-170.
- Ye BH, Chaganty S, Chang CC, Niu H, Corradini P, Chaganti RSK, Dalla-Favera R. (1995). *Embo J.*, **14**, 6209-6217.
- Ye BH, Rao PH, Chaganti RSK, Dalla-Favera R. (1993). *Cancer Res.*, **53**, 2732-2735.
- Zandecki M, Lai JL, Facon T. (1996). *Br J Haematol.*, **94**, 217-227.

## Legends to figures

### Figure 1. Schematic representation of the RhoH/TTF locus

Black boxes represent exons. The telomeric and centromeric chromosome orientations (horizontal black arrows) are indicated. The three horizontal black segments represent the genomic clones used to make the probe for FISH experiments. Partial RhoH/TTF structure (exons 1b and 2) was already described (Dallery-Prudhomme et al., 1997). Exon 1a was recently discovered and mapped in the 5' region (work in preparation).

### Figure 2. FISH analysis of the four patients with t(3;4)

FISH analysis was performed using as probes : (i) two  $\alpha$ -satellite probes, a spectrum orange labeled probe specific for chromosome 4 and a spectrum green labeled probe specific for chromosome 3 (Vysis, Woodcreek, IL) (ii) a biotin-labeled RhoH/TTF DNA probe, detected with FITC-avidin (white arrows). (A) : patient 1, (B) : patient 2, (C) : patient 3, (D) : patient 4. In all cases we could see the green RhoH/TTF spots on the short arm of chromosomes 4, near the centromere. On the derivative chromosome 4 (der 4), the spots were splitted, as part of the signal was transferred onto the telomeric extremity of the long arm of the derivative chromosome 3 (der 3).

### Figure 3. RT-PCR analysis of two patients with t(3;4)

The RT-PCR experiments were performed for patients 1 and 3 and on Raji and VAL cell lines, as negative and positive controls, respectively. (A) : schematic representation of the different TTF-LAZ3 and LAZ3-TTF fusion transcripts, with the table of results indicating the sizes of the different PCR products. The hatched and white boxes indicate RhoH/TTF and

LAZ3 exons, respectively. Assays n° I or II were performed to search for the TTF-LAZ3 fusion transcripts, by priming within RhoH/TTF exon 1a or 1b, respectively, and within LAZ3 exon 3. Assay n° III was made to search for the reciprocal LAZ3-TTF fusion transcript, by priming within LAZ3 exon 1a and RhoH/TTF exon 2. Assay n° I gave rise to two PCR products, containing or not RhoH/TTF exon 1b (product 2: 350 bp or product 1: 150 bp). Assay n° II was performed to confirm the junction of RhoH/TTF exon 1b to LAZ3 exon 2 observed in assay n° I. This PCR reaction did'nt allow to distinguish between exon 1b alone or exons (1a-1b) together. (B) : electrophoretic migration of the three different RT-PCR assays. 0 : control (no RNA); R : Raji cell line, 1 : patient 1 ; V : VAL cell line ; 3 : patient 3.

#### **Figure 4. Northern blot analysis in two patients with t(3;4)**

Expression was analyzed in Raji (R) and VAL (V) cell lines, respectively as negative and positive controls, and in RNAs from patients 1 and 3. Total RNA samples (20 µg) were hybridized with the 1.4 kb cDNA probe (Dallery *et al.*, 1995). Actin expression was tested in the same samples to evaluate both quantity and quality of RNA samples.

#### **Figure 5. FISH analysis of patient 5 with t(4;14)**

(A) the probes used were : (i) two  $\alpha$ -satellite probes, a spectrum orange labelled probe specific for chromosome 4 and a texas red labeled probe specific of chromosomes 14/22 (Oncor) (ii) a biotin-labeled RhoH/TTF DNA probe, detected with FITC-avidin (white arrows). A green RhoH/TTF signal (two spots) was observed on normal chromosome 4, and also observed on both derivative chromosomes 4 and 14, splitted by the translocation. (B) probes : a spectrum orange labeled painting probe specific for the long arm of chromosome 14 (14q), and the same biotin-labeled RhoH/TTF probe. We could see the green RhoH/TTF signal on the

normal and derivative chromosomes 4 and on the derivative chromosome 14 (white arrows).

(C) probes : a spectrum orange labeled probe specific for chromosome 4 (Vysis), and a biotin-labeled IgH (cos 3/64 and cos Ig6) cosmid probe, detected with FITC-avidin (white arrows).

Two green signals were visualized, one of them normally located on the 14q32 region, and the other on the derivative chromosome 4, near the centromere (red signal).

(D) probes : a spectrum orange labeled probe specific for chromosome 4 (Vysis), and a biotin-labeled IgH (cos 3/64, cos Ig6, and cos Ig10) cosmid probe, detected with FITC-avidin (white arrows).

Three green signals were observed, one of them on the derivative chromosome 4, the two others on normal and derivative chromosomes 14.

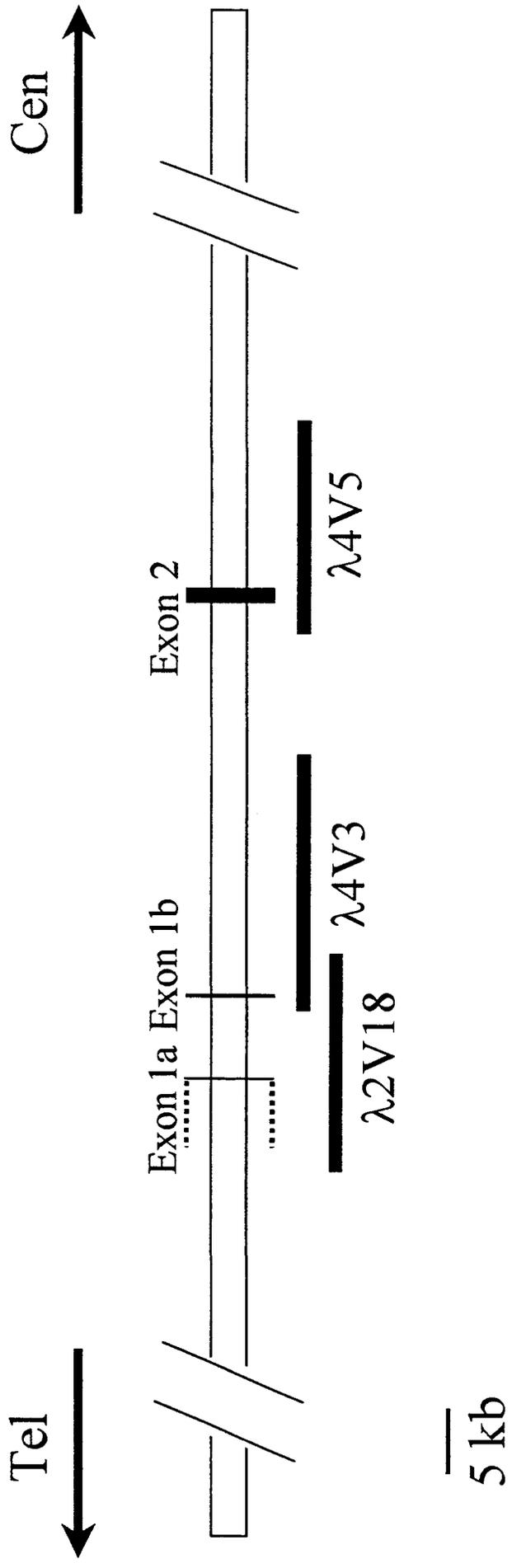
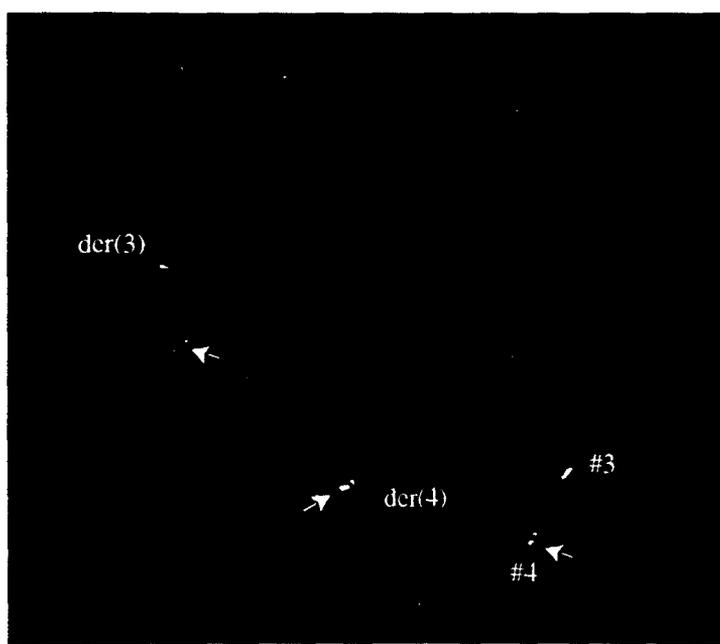
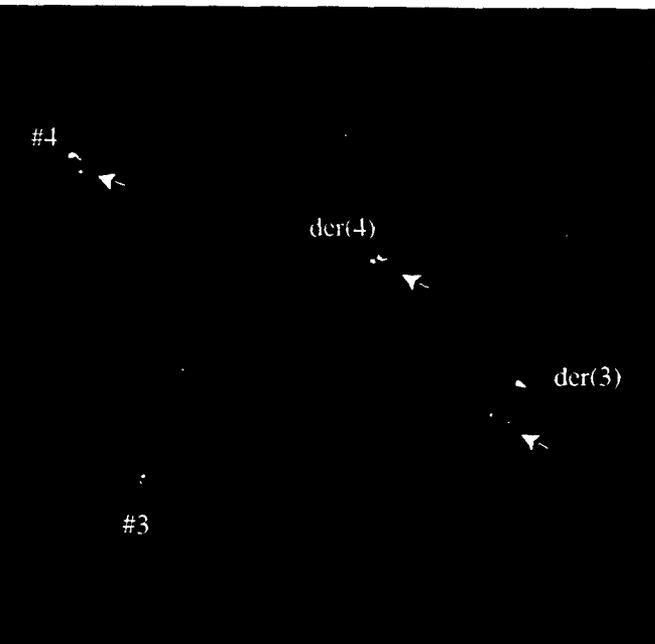
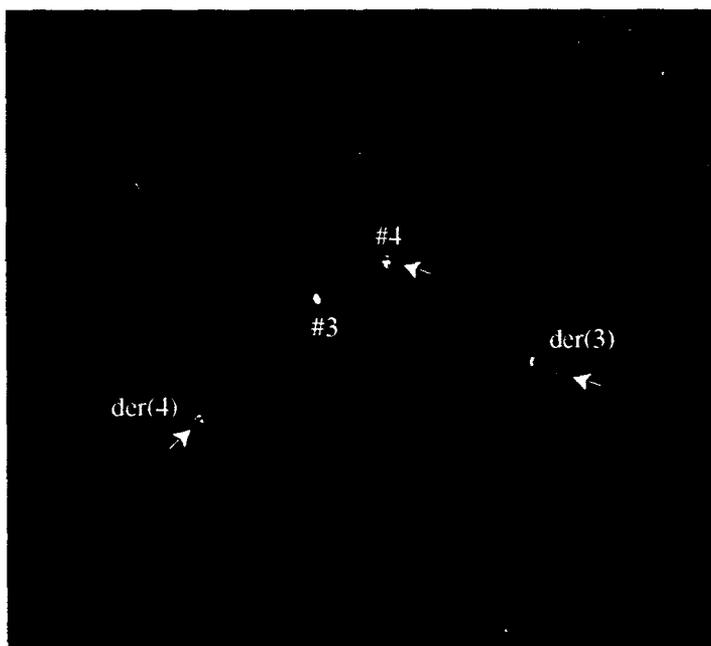
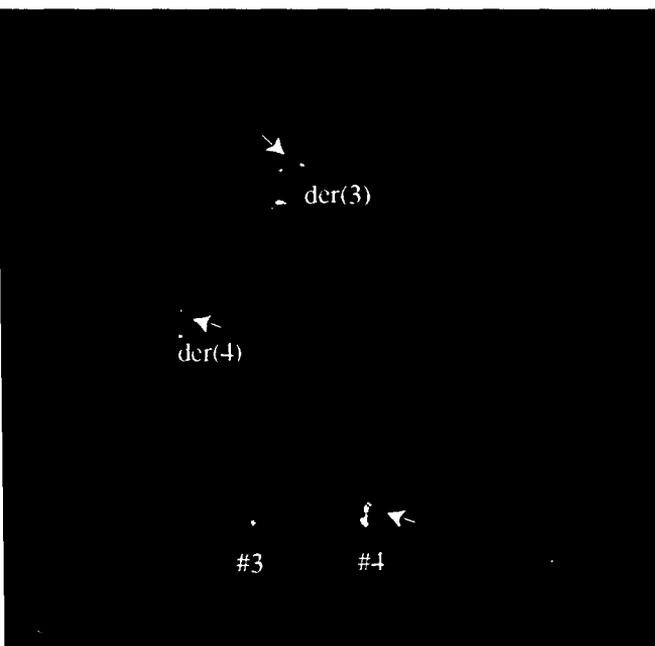


Figure 1



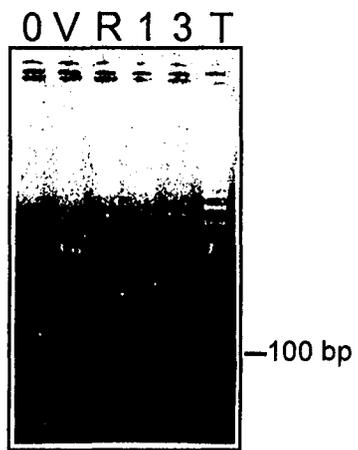
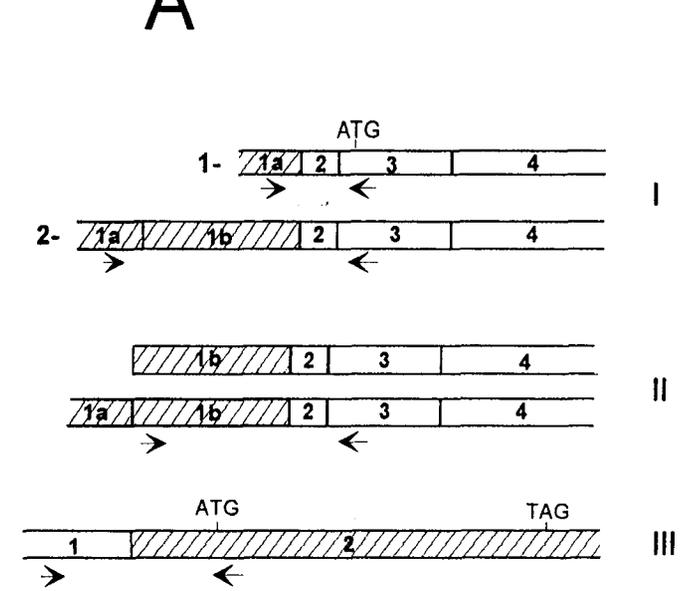
B



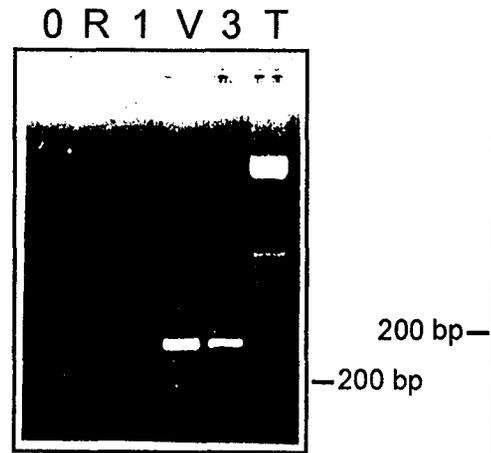
D

Figure 2

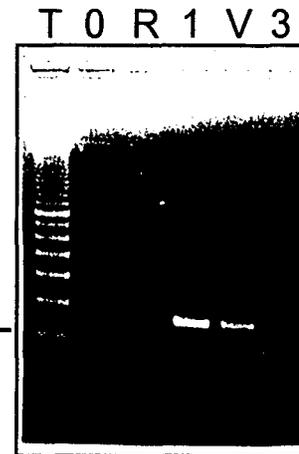
Assay n°- Primer's pairs	Fusion transcripts	PCR products (bp)	Raji	VAL	1	3
I- SZ60-PC8	derivative 3 :					
	1- <i>TTF(1a)-LAZ3</i> 2- <i>TTF(1a-1b)-LAZ3</i>	150 350	- -	+ +	+ -	+ +
II- CV1-PC8	derivative 3 :					
	<i>TTF(1b)-LAZ3</i> or <i>TTF(1a-1b)-LAZ3</i>	320	-	+	-	+
III- SZ17-SZ18	derivative 4 :					
	<i>LAZ3-TTF</i>	274	-	+	+	-



I  
derivative 3



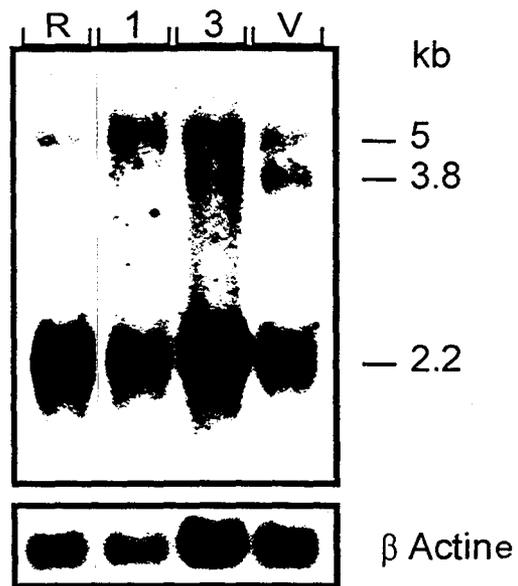
II  
derivative 3



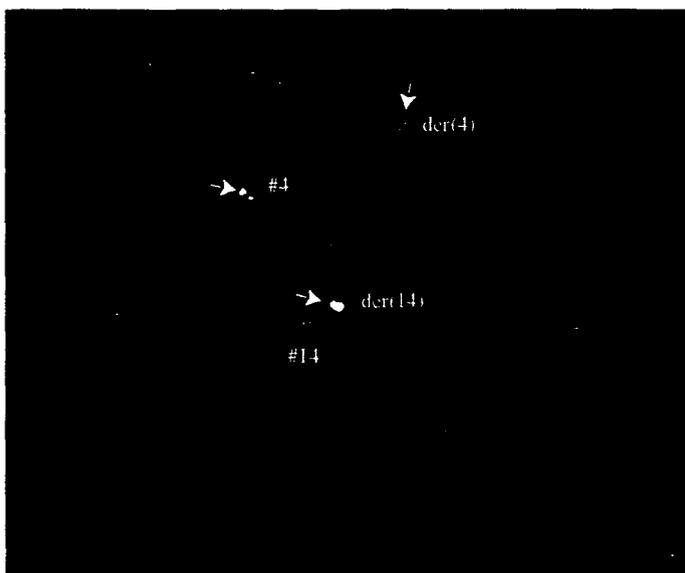
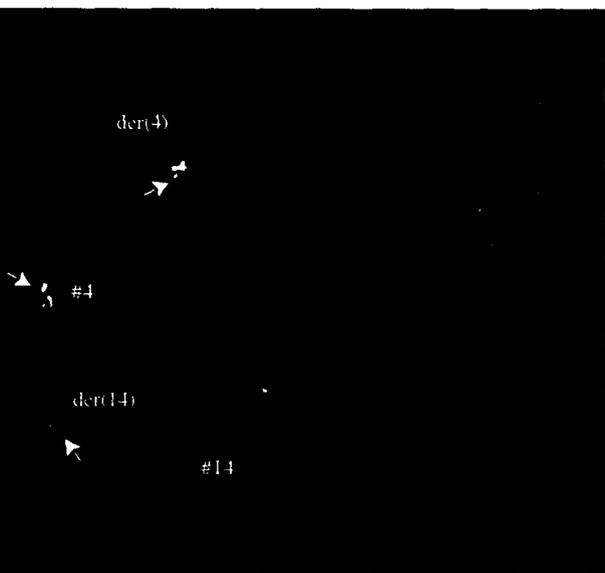
III  
derivative 4

**B**

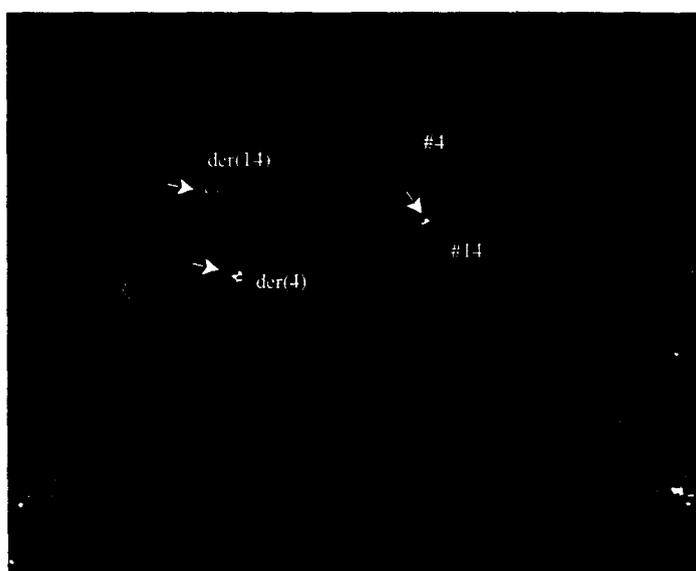
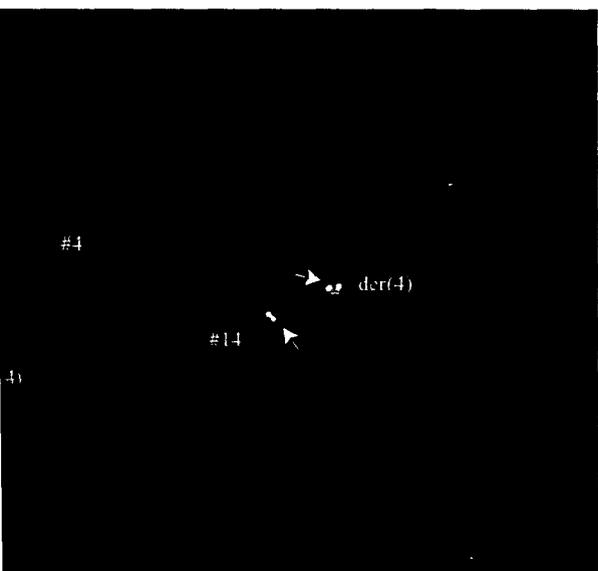
**Figure 3**



**Figure 4**



B



D

Figure 5

Gene	Exon	Primer	Primer sequence	pairs → transcripts	pairs → transcripts
<b>LAZ3/BCL6</b>	1a 1a	M20 SZ17	5'-ATCCGAGAGCCTCTGCTTATGAGG-3' 5'-GCAAGAAGTTTCTAGGAAAGGCCG-3'	M20-PC8: exons (1a-2-3)	<b>derivative 3</b> *SZ60-PC8: <i>TTF(1a)</i> -LAZ3 + <i>TTF(1a-1b)</i> -LAZ3 SZ62-PC8: idem (control)
	3 3	PC8 SZ20	5'-TGGATACAGCTGTCAGCCGGCG-3' 5'-TGGCGGGTGAAGCTGGATACAG-3'		*CV1-PC8: <i>TTF(1b)</i> -LAZ3 or <i>TTF(1a-1b)</i> -LAZ3 SZ19-SZ20: idem (control)
<b>RhoH/TTF</b>	1a 1a	SZ60 SZ62	5'-TTGGATTTCTGAGTGGGCAAGGC-3' 5'-GTGAGGCTGTGAGATGGGAGAATC-3'	SZ60-SZ61: exons (1a-2) + (1a-1b-2)	<b>derivative 4</b>  *SZ17-SZ18: <i>LAZ3-TTF</i>
	1b 1b	CV1 SZ19	5'-ACACACACTAACCCAACC-3' 5'-TCCTATGAGGAAATCAACCACAGTG-3'	SZ62-SZ61: idem (control)	
	2 2 2	SZ61 VZ3 SZ18	5'-GGGAATGCAAGCCAGGTAGGTCTG-3' 5'-AGGACCTCTGACGGCGATTTGC-3' 5'-GGGAATGCAAGCCAGGTAGGTC-3'	CV1-VZ3: exons (1b-2) or (1a-1b-2)	

**Table 1.** Primers designed from *LAZ3/BCL6* and *RhoH/TTF* in the RT-PCR analysis

\* : illustrated in Figure 3

Patient	Age	Sex	Lymphoma type and stage*	Material	Karyotypes
1	39	F	Follicular stage III	BM	49-50, X del X (p21), dic(1,12)(?p21;q24), t(3;4)(q27;p13), + i (6) (p10), t(14;18)(q32;q21), i (17)(q10), + (0-1) add (19)(q13), der(21) t(1;21)(q11;p11), + mar1 x 2. <b>(15)</b> .
2	70	F	Follicular stage IV	LN	48, XX, + X x 2, t(3;4)(q27;p13), del (6) (q12), t(14;18)(q32;q21), del (18)(q21). <b>(20)</b> .
3	52	F	Follicular stage III	LN	45, XX, add (1)(p36), - 6, der(8) t(8;8)(p22;q13), t(14;18)(q32;q21). <b>(6)</b> . 45, idem, t(3;4) (q27;p13). <b>(4)</b> .
4	53	F	Follicular stage III	LN	46, XX, t(3;4)(q27;p13), i (6) (p10), t(14;18)(q32;q21). <b>(5)</b> . 47, idem, + mar 1. <b>(5)</b> .
5	62	F	Multiple myeloma	BM	46, XX, t(4;14)(p13;q32). <b>(3)</b> . 46, XX. <b>(18)</b> .

**Table 2.** Clinical and cytogenetic data concerning the five patients

BM : bone marrow

LN : lymph node

\*Ann Harbor classification

Cell line and Patients	FISH Splitting of <i>RhoH/TTF</i> probe	FISH Splitting of <i>LAZ3</i> probe or <i>IgH</i> probe		SOUTHERN <i>RhoH/TTF</i> rearrangement	RT-PCR Fusion transcripts
VAL	+	+		+	<i>TTF(1a)</i> - <i>LAZ3</i> <i>TTF(1a-1b)</i> - <i>LAZ3</i>  <i>LAZ3-TTF</i>
1	+	+		+	<i>TTF(1a)</i> - <i>LAZ3</i>  <i>LAZ3-TTF</i>
2	+	+		nd	nd
3	+	+		nd	<i>TTF(1a)</i> - <i>LAZ3</i> <i>TTF(1a-1b)</i> - <i>LAZ3</i>
4	+	+		nd	nd
5	+		+	+	nd

**Table 3.** FISH and molecular data concerning the five patients and the VAL cell line (nd: not determined)

# Molecular cloning and structural analysis of cDNAs that encode 3 small GTP-binding proteins from sugar beet

Clonage et analyse structurale d'ADNc de betterave sucrière codant pour 3 petites protéines se liant au GTP

EMMANUELLE DALLERY <sup>(1)</sup>, SABINE QUIEF <sup>(1)</sup>, KAMAL E. BEN JILANY <sup>(2)</sup>, JEAN-PIERRE KERCKAERT <sup>(1)</sup>, DANIEL HAGÈGE <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> INSERM U. 124, IRCL, place Verdun, 59045 Lille, France.

<sup>(2)</sup> INSERM U. 13, 170, boulevard Ney, 75877 Paris, France.

<sup>(3)</sup> Biochimie-physiologie végétales, UBO, BP 809, 29285 Brest, France.

## RÉSUMÉ

Le criblage d'une banque d'ADNc de plantules étiolées de *Beta vulgaris* L. Hilma a permis l'isolement de 3 clones homologues à *ras*. Deux de ces gènes (*rab1Bv* et *rab2Bv*) appartiennent au groupe Rab/Ypt. Les séquences polypeptidiques qui en ont été déduites montrent de très fortes homologies avec Ara3 d'*Arabidopsis thaliana* (93 % avec *Rab1Bv*) et Rgp2 d'*Oryza sativa* (97 % avec *Rab2Bv*). Le troisième gène (*rho1Bv*) appartient à la famille Rho. Les homologies entre les protéines *Rho1Bv* et *Rho1Ps* de *Pisum sativum* sont très importantes (98 %). *Rho1Bv* est la seconde protéine de plante appartenant à la famille Rho décrite dans la littérature. Les très fortes homologies notées pour toutes ces petites protéines se liant au GTP et leur conservation dans des familles de plantes telles que les *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae* et *Poaceae* suggèrent que ces protéines contrôlent des voies de la transduction des signaux très conservées dans l'évolution. ▲

**Mots clés :** *Beta vulgaris*, protéines G, Rab, Rac, Ras, Rho, transduction des signaux, trafic vésiculaire.

## ABSTRACT

Isolation of homologous *ras*-related genes from sugar beet has never been reported. Screening cDNA library from *Beta vulgaris* L. Hilma resulted in the isolation of 3 *ras*-homologous clones. Two of these genes (*rab1Bv* and *rab2Bv*) belong to the Rab/Ypt group. The deduced polypeptidic sequences from them show strong homologies to Ara3 (93% with *Rab1Bv*) of *Arabidopsis thaliana* and Rgp2 (97% with *Rab2Bv*) of *Oryza sativa*. The third gene (*rho1Bv*) belongs to the Rho family. The homology of *Rho1Bv* protein with *Rho1Ps* from *Pisum* is very high (98%). *Rho1Bv* is the second representative plant Rho protein described in the literature. The homologies of all these 3 small GTP-binding proteins indicate that these proteins are conserved in plant families like *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae* and *Poaceae* and could control important transductional pathways conserved along the processes of evolution. ▲

**Key words:** *Beta vulgaris*, Rab, Rac, Ras, Rho, G proteins, signal transduction, vesicular traffic.

## VERSION ABRÉGÉE

Un nombre croissant d'articles suggère que des voies de transduction des signaux, semblables à celles décrites chez l'animal, existent chez les végétaux. De nombreuses petites protéines liant au GTP ont été clonées et séquencées. Si l'existence de protéines H-, K- ou N-Ras n'a pas été établie, de nombreuses

protéines apparentées aux sous-familles Rab/Ypt et Rho ont été décrites. Une fonction universelle pour Ras dans le contrôle de la décision cellulaire de croître et de se différencier a été proposée et un rôle dans la régulation de la division cellulaire a été postulé pour Rho chez *Pisum*. Dans toutes les cellules eucaryotes, Ras contrôlerait une cascade MAP kinase-dépendante. L'activité MAP kinase dépend de la phosphorylation de résidus thréonine et tyrosine par une MAP-kinase-kinase à double spécificité, telle que Raf. Une protéine de type Raf (CTR1) a été isolée chez *Arabidopsis*. Elle agit comme un régulateur négatif dans la voie de biosynthèse de l'éthylène. Ce résultat est important car une interaction entre Ras et Raf dans la transduction des signaux liés à la crois-

Note présentée par Jean-Louis Bonnemain.

Note remise le 18 septembre 1995, acceptée après révision le 3 janvier 1996.

Corresponding author : D. Hagège.

sance a été établie dans les cellules animales. Le rôle de Ras pourrait être le recrutement de Raf vers la membrane plasmique. Les protéines Ras percevraient les modifications du milieu extérieur et réguleraient la transduction des signaux, les kinases activant ou inhibant certaines voies. Plusieurs MAP kinases ont été isolées chez *Arabidopsis*. Même si la plupart des signaux initiateurs de réponse, chez les plantes, leur sont spécifiques et si des différences dans les modes de régulation existent très vraisemblablement, par rapport au monde animal, il est probable que les cascades de phosphorylation soient conservées chez les cellules eucaryotes, dans de nombreuses voies de la transduction des signaux. Une meilleure connaissance des protéines apparentées à Ras permettrait donc de posséder des outils pour l'examen des mécanismes de la transduction des signaux et du trafic intracellulaire des plantes. Dans cet article, nous présentons, pour la première fois, le clonage et l'analyse structurale de petites protéines G apparentées à Ras chez la betterave sucrière.

Une banque d'ADNc de *Beta vulgaris* L. Hilma préparée à partir de plantules étiolées a été étalée et criblée à l'aide d'un oligonucléotide dégénéré (5' CTYTGWCCWGCNGTATCCCA 3'; W = A ou T; Y = C ou T; N = G, A, T ou C) complémentaire de la séquence codant pour WDTAGQE, domaine très conservé dans toutes les protéines apparentées à Ras. Cinq clones positifs ont été identifiés en condition de lavage à moyenne stringence. Trois d'entre eux ont donné un signal positif après un second criblage. Après séquençage et comparaison avec des séquences déjà publiées, ces clones ont été nommés *rab1Bv*, *rab2Bv* et *rho1Bv*. Les fragments *rab1Bv* (1080 bp) et *rab2Bv* (1215 bp) possèdent respectivement un cadre ouvert de lecture de 645 bp et 642 bp, ainsi que 210 et 225 bp (*rab1Bv*) et 180 et 393 bp (*rab2Bv*) en régions 5' et 3' non traduites. Le fragment *rho1Bv* (710 bp) contient un cadre ouvert de lecture de 591 bp ainsi que 90 et 29 bp en régions 5' et 3' non traduites. Les protéines codées par *rab1Bv* et *rab2Bv* sont respectivement constituées de 215 et 214 acides aminés, pour une masse moléculaire de 23,8 kDa. *Rab1Bv* est homologue à *Ara3* d'*Arabidopsis* (93 % d'homologie, 90 % d'identité). *Rab2Bv* est très proche de *Rgp2* d'*Oriza sativa* (97 %

d'homologie, 77 % d'identité). Les domaines I à VII, très conservés dans toutes les petites protéines G, sont retrouvés dans *Rab1Bv* et *Rab2Bv*. Pour *Rab2Bv*, on notera, avec *Ara2*, une petite divergence au niveau du domaine V, où la sérine en position 127 est remplacée par une cystéine. *Rab1Bv* et *Rab2Bv* diffèrent entre elles au niveau de ce domaine V (NKxDx) et au niveau du domaine effecteur supposé interagir avec des protéines de type GAP, présent sous les formes STIG (*Rab2Bv*) et TTIG (*Rab1Bv*). L'une des caractéristiques de ces protéines est la présence d'une sérine dans le premier domaine conservé (à la place d'une glycine en position 12 des protéines Ras). Les très fortes homologies de ces protéines avec *Ara3* et *Rgp2* suggèrent qu'elles puissent jouer un rôle dans le trafic vésiculaire.

L'analyse et les caractéristiques structurales du gène *rho1Bv* et de la protéine *Rho1Bv* mette en évidence que la betterave sucrière (*Beta vulgaris* cv Hilma) et le pois (*Pisum sativum* cv Alaska ou extra early Alaska) possèdent le même gène *rho*. La protéine déduite est constituée de 197 acides aminés pour une masse moléculaire estimée de 21,5 kDa. *Rho1Bv* est homologue à 98 % (identité 96 %) avec *Rho1Ps*. Ces protéines présentent 64 % d'identité avec *Rac2* humain et environ 55 % d'identité avec *CDC42* humain et de levure. *Rho1Bv* pourrait jouer un rôle dans la régulation de la division cellulaire (par analogie avec *Rho1Ps*). Le dendrogramme réalisé à partir de 25 petites protéines G montre que *Rab1Bv*, *Rab2Bv* et *Rho1Bv* appartiennent à 3 groupes distincts. *Rab1Bv* appartient à un groupe qui inclut *Ara3*, *Ypt2*, *Ric1*, *Ara5*, *Ypt1* et *Rab1A*. Le groupe auquel est rattaché *Rab2Bv* contient *Rgp2*, *Ara2*, *Ric2*, *Ypt3* et *Rab2*. *Rho1Bv* est membre d'un groupe plus important dans lequel on retrouve *G25B*, *Rac1*, *Rac2*, *RhoG*, *RhoA*, *Rho1* et *Rho2*.

Les très fortes conservations et les identités des séquences, observées pour *Rab1Bv*, *Rab2Bv* et *Rho1Bv* avec certaines petites protéines se liant au GTP connues chez les plantes, permettent de conclure que des gènes semblables codent des produits très voisins, dans des familles telles que les *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae* et *Poaceae*. Ces gènes jouent très probablement des rôles très importants dans la transduction des signaux et dans le développement des cellules des plantes. ▲

An increasing number of reports suggests that transductional pathways similar to those previously described in animals could exist in plants. Even if in plants most of the signals inducing response are specific to them and if, when compared to animals, differences in their regulation modes exist, it is likely that the phosphorylation cascades will be conserved in many eukaryotic signal transduction pathways. Numerous small GTP-binding proteins have been cloned and sequenced. If the occurrence of H-, K-, or N-Ras plant proteins has not yet been established, Ras-related ones from the Rab/Ypt and Rho subfamilies have been described [1, 2]. A universal function in the control of the cell decision to grow and to differentiate has been proposed for Ras [3]. A role in the regulation of cell division has been suggested for Rho in *Pisum* [4]. It has been proposed that in any eukaryotic cell Ras could control a mitogen activated protein (MAP) kinase cascade [5]. MAP kinase activity depends on the concomitant phosphorylation of both a threonine and a tyrosine residues by a dual-specificity MAP kinase kinase (MAPKK) [6]. In addition, Raf is a protein that clearly functions like a MAPKK [7]. It is interesting to note that a protein kinase (CTR1) homologous to Raf and described as a negative regulator of ethylene response pathway has been

isolated from *Arabidopsis* [8]. This result is of importance because an interaction between Ras and Raf has been established in a growth promoting transduction pathway. The simplest role for Ras in Raf activation could be the recruitment of Raf towards the plasma membrane [9]. Kinases are effective on-off switches and a GTPase such as Ras may be a sensitive sensor of the extracellular milieu and could regulate signal transduction pathways [6]. Several other MAP kinases have been isolated in *Arabidopsis* [10, 11] which led to the assumption that the phosphorylation cascades could be conserved in eukaryotic cells among various signal transduction pathways. Thus, the knowledge of Ras and Ras-related factors should provide important tools for examining molecular mechanisms such as signal transduction and intracellular traffic in plants. At this time, several genes encoding ras-related small GTP-binding proteins have been found in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana plumbaginifolia* and *Pisum sativum* [4, 12-21]. Conversely up to now, it seems that no work dealing with sugar beet genes has been published. In the present report we describe the cloning and the structural analysis of the first 3 ras-related small GTP-binding proteins from sugar beet (*Beta vulgaris* L. Hilma).

**(A) rab1Bv**

GAATTCGAAAAACAGGAAGAAAAGCGAAG

31 AAAGTAAAGAGAGAGAGAGAAAAGAGGAGATCGCAAACCAAGTGTGTGCATCATCTGAGATTGTGGGAAAATTAAGCTTTTTTCGA  
 121 GTGTTAATTCATCAAAAGCTTTTTTTTTCTTACTTTGGAAAATATCTGTGTGAAAATTTTTCCGTTTTTTGGAGGTTTGGATTA

211 ATGGCTGCTCCACCTGGCAGAGCTCGCGCTGATTATGATTATCTTATCAAACTTCTTTTGATAGGCGATAGTGGTGTGGGTAAGAGTTC  
 M A A P P A R A R A R A D Y D Y L I K L L L I G D S G V G K S C 30

301 CTTCTCCTGCCGTTCTGATGCTTCTTCCACCAAGGTTTCATCACCACCATTGGTATCGATTTAAGATTCCGACCATAGAGCTTGAT  
 L L L R F S D G S F T T S F I T T I G I D F K I R T I E L D 60

391 GGCAAGCGGATTAAGTGCAGATATGGGATACTGCTGGTCAGGAACGGTTTCAGGACTATTACAACGGCATATTATCGTGGAGCCATCGGT  
 G K R I K L Q I W D T A G Q E R F R T I T T A Y Y R A L A D E 90

481 ATTCTGCTGGTGTATGATGTTACTGATGAGTGGTTCATCAACAATATCAGAAATGGATACGCAACATTGAGCAGCATGCTTCTGATAAT  
 I L L V Y D V T D E S S F N N I R N W I R N I E Q H A S D N 120

571 GTGAACAAGATTCTGGTAGGGAACAAGGCTGACATGGATGAGAGCAAAGGGCTGTGCCACGGCTAAAGGACAAGCTCTAGCTGATGAG  
 V N K I L V G N K A D M D E S K R A V P T A K G Q A L A D E 150

661 TACCGGATTAATTTCTCGAACTAGTGCAAAAACAACTTAAATGTGGAGGAGCTTTTCTTTTCAIAGCAGACACATTAAGCAAAGG  
 Y G I K F F E T S A K T N L N V E E V F F S I A R D I K Q R 180

751 CTTGCAGATTCTGATACAGGCAAGGCTCAACCATCAATTACAATTAACCCAGCCGACCAATCAGGCAATCAAGCAGCACTAATCA  
 L A D S D P R Q E A T A S I T T I K P A D Q S G N Q A A K S 210

841 GCTTGTCTCGGTTCTTAAGGAACCGGCACTTAAGTGGACAGGCGATCTGGCGGTATGTGTGCAAAACAGATAAATCTGATTGTGATCA  
 A C C G S \* 215

931 CAATGTGATGGATCTTGTAAATATTGTTACCATCATGTTTCTTAAATCTGCTTTAGTGTGCGAAAGATAGTTTCTTATTAAGTAGTT  
 1021 ATTTGTTCTAGTGGCACTCTTTTCATTAATGTCTAAATTAATCTGTTTAAAGCAGC

**(B) rab2Bv**

1 TTTTTCACACCCTTCTCTTTCACCAAACCTCTCTCTTCTCTCTCTCAITTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGCTCAATTTCCA  
 91 ACACATATCTTTCACCAACACTCCTTCTGAGCAACATCTTCTCATCAAAATCAAAATAGGGTTCTGACGTATTAAGATTTCGGAGAA

181 ATGGCAATAGAGTATCAGCAATATGATTACCTCTTCAAGATCGTATTGATCGGGTATTGAGTGGTAAATCTAACATACTTTCG  
 M A N R V D H E Y D I L F K I V L I G D S G V G K S N I L S 30

271 AGTTTACGAGGATCAATTTTGGTAAATCCACCATTGGTGTGAGTTGCAACTCGTACTCTTCAGGTAGGAAAGACT  
 R F T R N E F C L E S K S T I G V E F A T R T L Q V E G K T 60

361 GTGAAGCGCAGATATGGGATACTGCTGGTCAGGAGCGTTATCGGGCTATCACCAGTCTTACTACAGAGGCTGTGGTGTCTTCTT  
 V K A Q I W D T A G Q E R Y R A I T S A Y Y R G A V G A L L 90

451 GCTACGATATACTAAGACAAACATTTGATAATGTCCAGAGGCTGGCTCGTGAACCTGGCAGCACCAGATTCTAATATGTCATT  
 V Y D I T K R Q T F D N V Q R W L R E L R D H A D S N I V I 120

541 ATGATGGCTGGAAACAGTCCGATCTAAAGCATCTGAGAGCGCTCTCAGAAAGATGGACAGGCGCTTGGTCAAAAGGCGGCGCTTCG  
 M M A G N K S D L K H L R A V S E E D G Q A L A E K E G L S 150

631 TTTCTTGACATCAGCATAGACAGTCAACATCGAGAAGCTTTCCAAACGATATAACAGAGATTACTATATAATAGCAAGAA  
 F L E T S A L E A V N I E K A F Q T I L T E I Y I S K K 180

721 GCTTACGAGCCCAAGAGCTTCTAGCACTTCCCGGTCAAGGTACAACCATCAATGTCCCGATGATCAGCCCAATCAGAGGAGATCG  
 A L A A Q E A S S N L P G Q G T T I N V A D A S A N Q R R S 210

811 TGCTTCTACTTCAAGGTATAATCAAGCGTCAAGAGGATAGCTAGCAAGCATCAGGCTCTCTCTTCTCTCTCTTTTATTTACCA  
 C C S T \* 214

901 AAAATTTCCCTTATTTTTTACCTTTATAATTTCTGGGGCATGAGACAAATGAGAAACCTTTCGATCATTGAGTGTGATCAGGATTG  
 991 ACGAGCTTGTGAAGTGAATACCCTAGAGTTATTGTTATTTAGCTCAGAAGCGCTCCCAATTCATTTGTTGATTAGTTCCCTTTCTG  
 1081 TTCAGTTGATTTGAACTAAGTGGTAGTGACCTACCCCAAGATTTGATGTCAATATGCACTTATTTTTGAAGGATGTTGACTAGAACC  
 1171 TTTCAATATATGCACTTAAACATAGACCAATATCTTGTG

**(C) rho1Bv**

1 TTGATTGATCAAGAGGAGAGAGAGAGTGGAGGTTGTTGAAATAGAAGATCGTTAGATATTTTTTTTTTAAATTTTTTTTGTAAAAA

91 ATGAGTCTTCCAGGTTCAAAAATGTTTACAGTGGTGAAGGCGCGTTGGTAAACTTGGTGTGATTCTTACACAGCAACACC  
 M S A S R F I K C V T V G D G A V G K T C L L I S Y T S N T 30

181 TTTCTACGACTAGTGGCCACTGTTTTGCAATTTTCAGTGCCAATGTCTGTTAACGGGGCCACAGTTAATCTGGGATATGGAT  
 F P T D Y V P T V F D N F S A N V V N G A T V N L G L W D 60

271 ACTGCAGCAAGAGGATTAACAGATTAAGACCTTTGAGTTATCGTGGAGCAGATGTTTTATTCTCGCTTCTCCCTTATAGCAAG  
 T A G Q E D Y N R L R P L S Y R G A D V P I L A F S L I S K 90

361 GCTAGTTATGAAATGTTTCTAAGAGTGGATCTGAGTTGAAGCATATGCTCTGCTGCTCCCATGTTCTTGTGGAAACAAAGCTC  
 A S Y E N V S K K W I P E L K H Y A P G V P I V L V G T K L 120

451 GATCTTCCGGATGACAAGCAGTTTTTATCGACCACCTGGTGCAGTTCCAATCACTACAGCTCAGGAGAGCAATTAAGGAAACTGATT  
 D L R D D K Q F F I D H P G A V P I T T A Q G E E L R K L I 150

541 GGGGCTCCTGCTTACATCGAATGCAATCAAAAACAGCAGAAATGTCAAGGCAATTTTTGATGCCACCATTAAGGTCGTCTCAACCA  
 G A P A Y I E C S S K T Q Q N V K A V P D A A I K V V L Q P 180

631 CCAAGACAAGAAAAGTCAAAGGCCACAGAGGCTCTCCATATGTAATTTGTAAAGTGTAAAGAGAAAACAG  
 P K T K K K S K A Q K A C S I L \* 197

Figure 1. Nucleotide and predicted amino acid sequences of the cDNA clones rab1Bv (A), rab2Bv (B) and rho1Bv (C) from sugar beet seedlings.

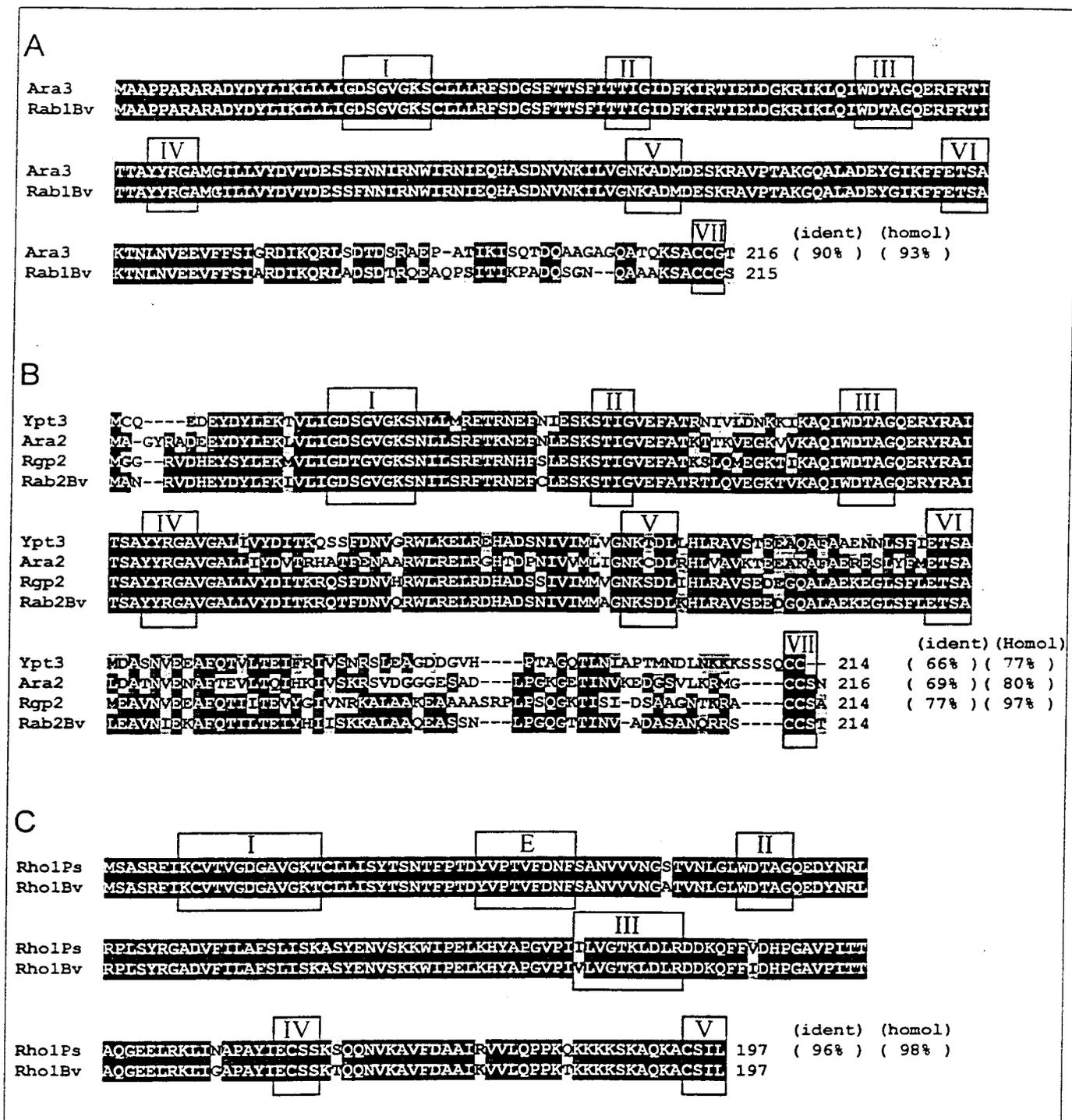


Figure 2. Comparison of amino acid sequences of Rab1Bv (A), Rab2Bv (B) and Rho1Bv (C) from sugar beet seedlings with other small G proteins. Ara2 and Ara3 from [13]; Ric2 from [20]; Ypt3 from [22]; Rho1Ps from [4]. Black or shaded areas indicate identical or conserved amino acids respectively.

## Materials and methods

### cDNA library

A cDNA library prepared from 5-day-old etiolated sugar-beet seedling RNA (*Beta vulgaris* L. Hilma, Nr D 100 KS 38080, Dippe seed production compagny) was kindly pro-

vided by Dr T. Lisowsky (Botanische Institute, University of Düsseldorf, Germany). Poly A<sup>+</sup> RNA was isolated and cDNA synthesized using a Pharmacia kit. Cloning was done in λgt11 vector using EcoRI linkers.

### cDNA cloning and sequencing

The sugar beet cDNA library was plated at 10 000 p.f.u./plate (80 mm) and screened by plaque hybridization with a dege-

nerate oligonucleotide (5' CTYTGWCCWGCNGTATCC-CA 3'; W = A or T; Y = C or T; N = G, A, T, or C) complementary to the sequence encoding WDTAGQE. This peptide corresponds to a highly conserved domain in plant and non-plant *ras*-related genes [1]. About  $3 \times 10^5$  recombinant phages were screened by using the probe labeled at its 5' end with T4 polynucleotide kinase and [ $\gamma^{32}$ P]ATP. Prehybridization (4 h) and hybridization (18 h) were performed at 42° C in 0.75 M NaCl, 0.05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 5 mM EDTA, pH 7.4 and 5x Denhardt's buffer containing 0.5% SDS. Filters were washed in 0.9 M NaCl, 0.09 M sodium citrate, 0.1% SDS twice for 15 min at room temperature, then twice for 10 min at 42° C, dried and exposed to Hyperfilm-MP (Amersham) at -70° C overnight. Positive clones were amplified and their DNA extracted. Their *Eco*RI insert was ligated into pBluescript KS+ phagemid for sequencing on both strands by the dideoxy chain termination method with Sequenase version 2 (USB, Amersham) using T3 and T7 universal primers as well as multiple internal oligonucleotide primers derived from the obtained sequence.

## Results and discussion

### cDNA sequence analysis

Among the  $3 \times 10^5$  recombinant plaques screened with the oligonucleotide probe, 5 clones were identified that hybridized under medium-stringency washing conditions. Three of the selected clones gave a positive signal after a second screening. The DNA sequences of the inserts of these clones were determined (Fig. 1, A to C). After comparison with previously published sequences, they were respectively designated as *rab1Bv*, *rab2Bv* and *rho1Bv*. The 1080 bp *rab1Bv* fragment and the 1215 bp *rab2Bv*, fragment respectively contain a 645 bp and 642 bp ORF, with 210 and 225 bp (*rab1Bv*) or with 180 and 393 bp (*rab2Bv*) 5'- and 3'-untranslated regions, respectively. The 710 bp *rho1Bv* fragment contains a 591 bp ORF with 90 and 29 bp 5' and 3' untranslated regions.

## Structural analysis of encoded proteins

### Rab-encoded proteins

The deduced Rab encoded proteins (Fig. 2, A and B) consist of 215 and 214 amino acids for Rab1Bv and Rab2Bv respectively; both of them have an estimated molecular mass of 23.8 kDa. After comparison with sequences from Swiss Prot Database (version 28), it appears that on the one hand, the sequence of Rab1Bv is 93% homologous (90% identical) to Ara3 [13]. On the other hand, Rab2Bv exhibits a 97% homology (77% identity) with Rgp2 from *Oryza sativa* [21], but is not so different from Ara2 (*Arabidopsis*, 80% homology) [13] and even from Ypt3 (*Schyzosaccharomyces pombe*, 77% homology) [22]. As a matter of fact, the identity between Rab1Bv and Ara3 sequences is nearly 100% up to the residue L<sup>181</sup> (leucine at position 181). But the comparison of Rab2Bv and Rgp2 sequences up to the residue Y<sup>174</sup> (tyrosine at position 174) shows a 89% identity. The region of

maximum divergence between all these proteins usually begins in this area. In all the small GTP-binding proteins published so far, the highest homology is met in 7 domains numbered I to VII. Four of them are involved in GTP-binding (boxes I, III, V and VI). Domain II is considered as the effector region whereas domain IV (YYRGA), common to most Ypt/Rab plant proteins, has an unknown function. Domain VII is referred to the CC-terminal motif [1, 5, 21, 23-28]. Within the homologous regions of Rab1Bv (Fig. 2A), the motifs required for GTP binding (boxes I, III, V, VI), the effector region (box II), the YYRGA domain of unknown function (box IV) and the CC-terminal motif (box VII) are highly conserved. For Rab2Bv (Fig. 2B) all these domains are also conserved except for box V in Ara2 where C (cysteine at position 127) is replaced by S (serine). The phosphate binding loop (GDSGVGKS, box I), the motif which binds the phosphate moiety (WDTAG, box III), YYRGA domain (box IV) and ETSV (box VI) sequence (helper function in the binding or dissociation of guanine base) are identical in Rab1Bv and Rab2Bv. The 2 genes slightly differ in domain V (NKxDx) and in the putative effector domain which interacts with specific effector proteins such as GAP [29] present as STIG in Rab2Bv and as TTIG in Rab1Bv. The site of post-translational fatty acid modification and of subsequent membrane anchoring (2 cysteine residues at the C-end) are common features of almost all Rab/Ypt related proteins. The strong identity and homology between, on the one hand, Rab1Bv and Ara3 and, on the other hand, Rab2Bv and Rgp2 suggest a role for these genes in the intracellular trafficking of specific vesicles. The presence of Ser instead of Gly in the first conserved region (Gly<sup>12</sup> of mammalian GTP-binding Ras-protein) [13], characteristic of these genes, is noticed both in Rab1Bv and Rab2Bv.

### Rho related genes and encoded protein

The analysis and structural features of *rho1Bv* and *Rho1Ps* [4] demonstrate that *Beta vulgaris* cv Hilma and *Pisum sativum* cv Alaska or extra early Alaska own the same *rho* gene. The deduced Rho1Bv encoded proteins (Fig. 2C) consist of 197 amino acids with an estimated molecular mass of 21.5 kDa. The 4 domains (I, II, III, IV) and residues critical for nucleotide binding or GTPase activity, the motif (E) equivalent to the Ras effector domain and the signature sequence (V) for post-translational modification by protein geranylgeranyltransferase I (the C-terminal CAAL where A is an aliphatic amino acid) are conserved. The peptidic alignment demonstrates that the 2 proteins (*Rho1Ps* and *Rho1Bv*) differ only in 3 amino acids at positions 52, 151, 183: a serine, an asparagine and a glutamine in *Rho1Ps* are respectively replaced by an alanine, a glycine and a threonine in *Rho1Bv*. As already reported for *Rho1Ps* [4], *Rho1Bv* is more closely related to the Rac subfamily, with 64% identity to human Rac2 and about 55% identity to yeast and human CDC42; it is more distantly related to the Rho subfamily (about 50% identity).

### Dendogram analysis

A dendogram of predicted amino acid sequences (Fig. 3) from 25 small GTP-binding proteins including the 3 ones found in the seedling cDNA library was produced using

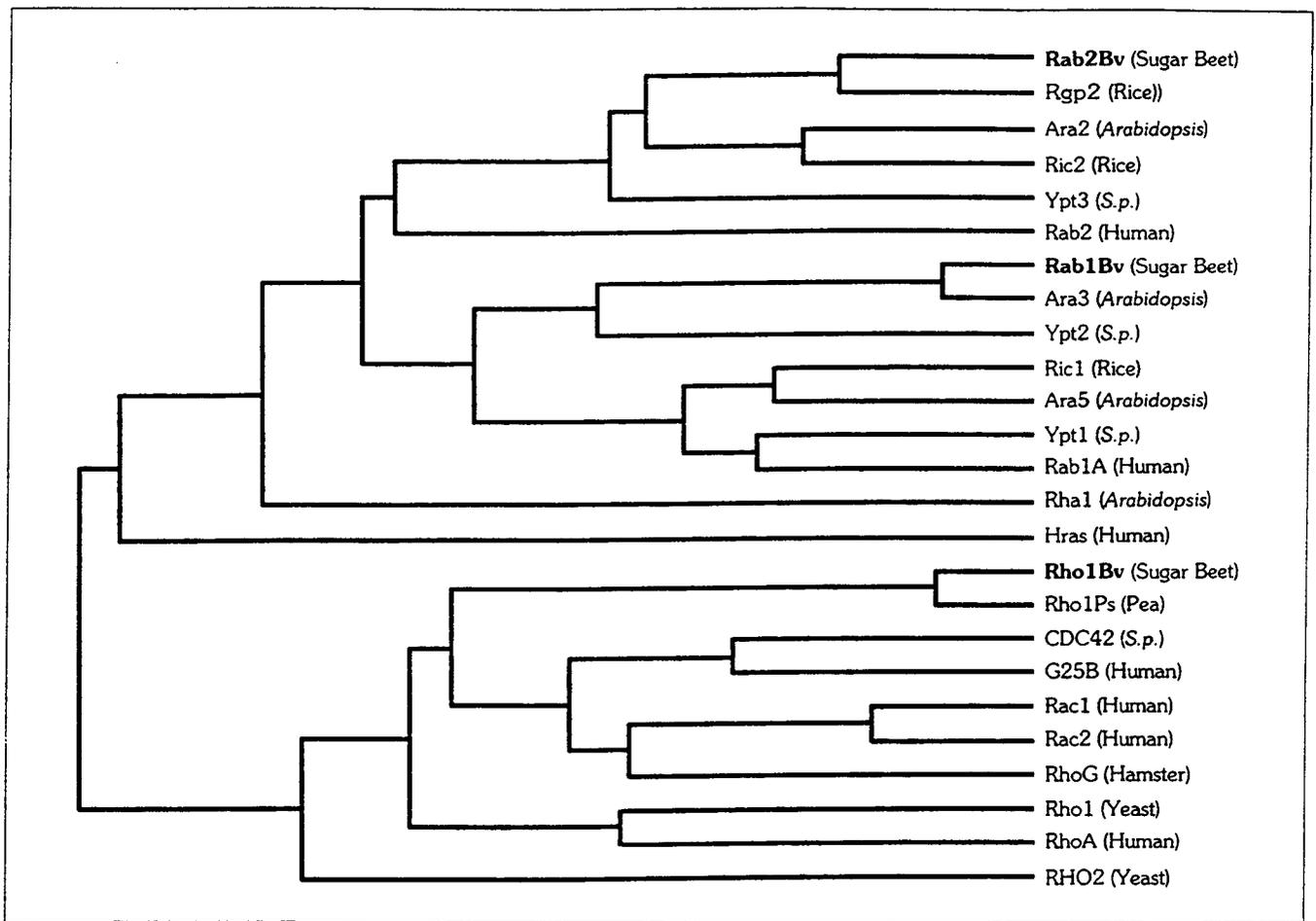


Figure 3. Dendrogram of predicted amino acid sequences of Rab1Bv, Rab2Bv and Rho1Bv within some members of the ras superfamily using CLUSTAL alignment program [30].

the CLUSTAL alignment program [30]. The 3 proteins Rab1Bv, Rab2Bv and Rho1Bv described in this paper belong to 3 distinct groups. Rab1Bv group includes Ara3, Ypt2, Ric1, Ara5, Ypt1 and Rab1A; Rab2Bv group contains Rgp2, Ara2, Ric2, Ypt3 and Rab2; Rho1Bv belongs to a larger group including G25B, Rac1, Rac2, RhoG, Rho1, RhoA and Rho2.

As already proposed, the 2 sugar beet *rab* genes described in this paper could be involved in intracellular trafficking of specific vesicles [30]. It has been suggested that Rho1Ps

(98% homology with Rho1Bv) could play a role in the regulation of cell division [4]. Both the conservation of sequence and the identity between Rab1Bv, Rab2Bv, Rho1Bv and the homologous small GTP-binding proteins previously reported indicate that similar genes can encode similar products in plant families as far as *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae* and *Poaceae*. This leads us to suppose that these genes probably play key roles in signal transduction pathways as well as in cellular and developmental processes in plant cells. ▼

**Acknowledgements:** this work was supported by Region Bretagne, CUB (Communauté Urbaine de Brest) and MESR (Plan Etat-Région).

Sequence data from this article have been deposited with the DDBJ/EMBL/Genbank Data Libraries under accession N° Z49152; Z49190; Z49191.

## REFERENCES

- Terryn N., Van Montagu M., Inzé D. 1993. GTP-binding proteins in plants. *Plant Mol. Biol.* 22: 143-52.
- Kaufman L.S. 1994. GTP-binding signalling proteins in higher plants. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 22: 3-7.
- Dickson B., Hafen E. 1994. Genetics of signal transduction in vertebrate. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 64-70.
- Yang Z., Watson J.C. 1993. Molecular cloning and characterization of *rho*, a *ras*-related small GTP-binding protein from garden pea. *Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8732-6.
- Nishida E., Gotoh Y. 1993. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.* 18: 8-31.
- Hall A. 1994. A biochemical function for Ras at last. *Science* 264: 1413-4.
- Kyriakis J.M., App H., Zhang X., Banerjee P., Brautigan D.L., Rapp U.R., Avruch J. 1992. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 357: 417-21.
- Kieber J.J., Rothenberg M., Roman G., Feldmann K.A., Ecker J.R. 1993. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-41.
- Stokoe D., Macdonald S.G., Cadwallader K., Symons M., Hancock J.F. 1994. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264: 1463-7.
- Mizoguchi T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Kamada K., Shinozaki K. 1993. ATPKs: a gene family of plant MAP kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 336: 440-4.
- Mizoguchi T., Gotoh Y., Nishida E., Yamaguchi-Shinozaki K., Hayashida N., Hamada H., Shinozaki K. 1994. Characterization of cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J.* 5: 111-22.
- Matsui M., Sasamoto S., Kunieda T., Nomura N., Ishizaki R. 1993. Cloning *ara*, a putative *Arabidopsis thaliana* gene homologous to the *ras*-related gene family. *Gene* 76: 313-9.
- Anai T., Hasegawa K., Watanabe Y., Uchimiya H., Ishizaki R., Tsui M. 1991. Isolation and analysis of cDNAs encoding small GTP-binding proteins of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 108: 259-64.
- Anuntalabhochai S., Terryn N., Van Montagu M., Inzé D. 1991. Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a small GTP-binding protein, Rha 1. *Plant J.* 1: 167-74.
- Sano H., Youssefian S. 1991. A novel *ras*-related *rgp1* gene encoding a GTP-binding protein has reduced expression in 5-azacytidine-induced dwarf mutant. *Mol. Gen. Genet.* 228: 227-32.
16. Palme K., Diefenthal T., Vingron M., Sander C., Schell J. 1992. Molecular cloning and structural analysis of genes from *Zea mays* (L.) coding for members of the *ras*-related *ypt* gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 787-91.
17. Dailmann G., Sticher L., Marshallsay C., Nagy F. 1992. Molecular characterization of tobacco cDNAs encoding two small GTP-binding proteins. *Plant Mol. Biol.* 19: 847-57.
18. Terryn N., Anuntalabhochai S., Van Montagu M., Inzé D. 1992. Analysis of *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA encoding a novel small GTP-binding protein. *FEBS Lett.* 299: 287-90.
19. Nagano Y., Murai N., Matsuno M., Sasaki Y. 1993. Isolation and characterization of cDNAs that encode eleven small GTP-binding proteins from *Pisum sativum*. *Plant Cell Physiol.* 34: 447-55.
20. Kidou S., Anai T., Umeda M., Aotsuka S., Tsuge T., Kato A., Uchimiya H. 1993. Molecular structure of *ras*-related small GTP-binding protein genes of rice plants and GTPase activities of gene products in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 332: 282-6.
21. Youssefian S., Nakamura M., Sano H. 1993. Molecular characterization of *rgp2*, a gene encoding a small GTP-binding protein from rice. *Mol. Gen. Genet.* 237: 187-92.
22. Miyake S., Yamamoto M. 1990. Identification of *ras*-related YPT1-family genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 9: 1417-22.
23. Molenaar C.M.T., Prange R., Gallwitz D. 1988. A carboxyl terminal cysteine is required for palmitic acid binding and biological activity of the *ras*-related yeast YPT1 protein. *EMBO J.* 7: 971-6.
24. Pai E.F., Kabsch W., Krenkel U., Holmes K.C., John J., Wittinghofer A. 1989. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of Ha-*ras* oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature* 341: 209-14.
25. Maltese W.A. 1990. Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J.* 4: 3319-28.
26. Bourne H.R., Sanders D.A., McCormick F. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-27.
27. Khosravi-Far R., Lutz R.J., Cox A.D., Conroy L., Bourne J.R., Sinensky M., Balch W.E., Buss J.E., Der C.J. 1991. Isoprenoid modification of *rab* proteins terminating in CC or CXC motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6264-8.
28. Kinsella B.T., Maltese W.A. 1991. *rab*GTP-binding proteins implicated in vesicular transport are isoprenylated *in vitro* at cysteines within a novel carboxyl terminal motif. *J. Biol. Chem.* 266: 8540-4.
29. Sigal I.S., Gibbs J.B., D'Alonzo J.S., Temeles G.L., Wolanski B.S., Socher S.H., Scolnick E.M. 1986. Mutant *ras*-encoded proteins with altered nucleotide binding exert dominant biological effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 952-6.
30. Higgins D.G., Sharp P.M. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene* 73: 237-44.

