



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Cancérologie*

Présentée et soutenue par *Julien FAMILIADES*
Le 14 décembre 2010

Titre : *Anomalies moléculaires du gène PAX5 dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de la lignée B*

JURY

Pr. Georges DELSOL, PU-PH, Toulouse
Pr. Ali TURHAN, PU-PH, Poitiers
Dr. Yves DENIZOT, CR1, Limoges
Dr. Stéphane MANCINI, CR1, Marseille
Pr. Eric DELABESSE, PU-PH, Toulouse
Pr. Pierre BROUSSET, PU-PH, Toulouse

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologies de Toulouse*
Unité de recherche : *INSERM U563, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan*
Directeur(s) de Thèse : *Pr. Pierre BROUSSET et Pr. Eric DELABESSE*
Rapporteurs : *Pr. Ali TURHAN et Dr. Yves DENIZOT*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Georges Delsol de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans son laboratoire.

Je tiens à remercier mes deux directeurs de thèse les Pr. Pierre Brousset et Pr. Eric Delabesse, pour leur encadrement de qualité. Vous avez su me stimuler dans les moments les plus difficiles afin de pouvoir continuer à avancer dans le droit chemin scientifique.

Je remercie les membres du jury : Ali Turhan, Yves Denizot et Stéphane Mancini d'avoir accepté de m'évaluer et d'avoir consacré du temps à la lecture de mon manuscrit. Merci au Pr. Georges Delsol d'avoir accepté d'être président de mon jury.

Je tiens à remercier tout particulièrement Cyril Broccardo qui m'a encadré durant toute ma thèse. Ton travail n'a pas toujours été de tout repos, tu as su me guider, me faire m'interroger sur mes différents projets et me remettre sur les rails quand cela était nécessaire. Je te remercie pour tout le temps qu'il a consacré aux corrections de mes demandes de financement de thèse, de mes posters, de mes présentations orales. Un merci tout particulier pour la correction de mon manuscrit de thèse ainsi que pour toutes les répétitions qui m'ont permis d'être prêt le jour J. Merci pour ta patience et ta constance.

Puisque seuls restent les écrits, je veux remercier chaque personne qui m'a accompagné durant cette longue et dure épreuve :

Je tenais à dédier mon travail à ma famille. Merci à mes parents que me supportent depuis toujours et qui m'ont encouragé à continuer dans ce qu'il me plaisait, merci pour m'avoir supporté et soutenu durant ma thèse qui fut complexe. Merci à mes grands parents de m'avoir cuisiné des petits plats entre midi et deux heures.

Charlotte : tu m'as remis dans le droit chemin. Comme l'a souligné Mr Delsol lors de ma soutenance, grâce à toi mon réveil s'est mis à refonctionner, les manips se sont mises à avancer et à marcher. Tu m'as même relooké afin que je ne fasse pas trop tache pour l'entrée dans ma nouvelle vie. Cette fois c'est à ton tour de plonger, je vais essayer te soutenir comme tu l'as fait.

Etienne : dit « Painchoc », un grand esprit avec qui j'ai passé beaucoup de très bons moments. On s'est soutenu tout au long de la thèse et ça faisait du bien parler et échanger avec une personne qui comprenait la situation. Merci pour ta bonne humeur, les abeilles et les oiseaux s'en souviennent, je ne l'oublierai jamais. Tu le sais painch' : tu es fou, te me fais rire, je me fends la margoulette... Saiiiiiiiint Briiiiice, hahahahaha !!!

Julie : la pipelette du bureau, tu me faisais rire quand tu parlais toute seule avec tout le monde qui travaille à coté. Tu es une personne intègre, avec qui on n'y va pas par 4 chemins quand on a des soucis avec toi, c'est agréable. Merci pour les Tiramisus qui nous ont permis de tenir lors de journées éreintantes. Merci pour ta joie et ta bonne humeur qui nous ont voulu quelques bons rires, entre autre quand tu racontais les potins du laboratoire. Merci aussi à Lolo ta moitié avec qui j'ai passé de bons moments de déconne et qui fait les Charlottes aux pêches comme personnes !!

Cathy : une perle de savoir dans le monde des biotech. J'ai eu plaisir travailler avec toi j'ai appris de nombreuses choses. Comme pour Julie, merci pour les bonnes choses légères que tu m'as fait goûter comme le Kouign-amann si cher à ta Bretagne natale. Tu as toujours eu le mot juste, merci pour ta patience.

Jeanine : vous êtes une personne exceptionnelle et je ne mâche pas mes mots. Vous m'avez adopté dès que je suis arrivé, j'ai toujours pu compter sur vous, vous êtes à l'écoute de tout le monde. Merci pour les « Tea time » et les remontages de moral. Merci beaucoup de m'avoir accompagné durant ma thèse.

Jeff : mon Luc, merci d'avoir partagé en plus du côté labo le côté sportif de la vie de labo. Fan du BO tu as parié sur le mauvais cheval dans ce monde en rouge et noir. Tu as quitté la carrière scientifique pour devenir médecin, bon courage mon Luc. Merci pour ta gentillesse.

Alan : Coloc, nous avons partagé le pc et le bureau pendant 3 ans avec beaucoup de plaisir, tu as pu goûter aux joies de la colocation avec de très belles histoires comme mes amis les 3 nains ou les 2 annésiques. Je ne t'en ai jamais tenu rigueur de faire un sport comme le badminton ou d'avoir des petites cuisses mais bon merci de m'avoir supporté durant cette période.

Jérôme : Jéjé, tu es une personne serviable, toujours sympathique. Merci pour les parties engagées de basket et de tennis, qu'on a disputé pour décompresser.

Emilie Laprévotte : La madame « ouin-ouin » du labo, très curieuse, grâce à toi les potins du labo n'avaient plus de secret pour moi. Fan de Mickael Jackson tu nous as contaminé à la « Jackson mania », toujours à fond quand il s'agit des places de concerts de la famille Jackson. Tu es toujours souriante et pleine de vie, merci pour ta bonne humeur.

Will : le petit nouveau venu du Grand Nord : Troyes. Merci pour les coups de mains techniques qui m'ont été très utiles et pour les « hors boulot » qui nous ont permis de passer des bonnes petites soirées à la toulousaine.

Emilie Dejean : merci pour ta bonne humeur. Ta décontraction naturelle m'a permis de voir les meetings d'un autre œil.

Céline, Cécile, MP : les filles d'à côté, merci pour leur bonne humeur et leur gentillesse.

Les « Guy Laurent » : le bureau des étudiants, un brouhaha continu dans lequel il est impossible travailler, merci pour votre gentillesse et votre disponibilité pour parler science ou « ouin-ouin ».

Les titulaires : je remercie dans l'ensemble l'équipe Georges Delsol et l'équipe Guy Laurent et Bernard Payrastra dont les échanges scientifiques m'ont beaucoup appris et m'ont permis de m'épanouir dans le laboratoire.

Je tiens aussi à remercier tous les acteurs du GRAALL03 et du GFCH grâce à qui mes travaux ont pu être réalisés.

Merci à la plateforme de cytométrie en flux : Fatima, Laure et Valérie, qui m'ont appris l'art de l'analyse cellulaire. Merci pour votre patience et votre aide que vous nous avez apporté

avec Etienne, pour les tris de pro-B « apocalyptiques » et les sessions de LSR II sans formation afin de finaliser nos données sur le fonctionnel.

Je remercie aussi tous mes amis hors laboratoire qui ont partagé mes angoisses et m'ont aidé à leur manière à franchir ce cap. Un grand merci aussi à mon kinésithérapeute qui m'a remis sur pied rapidement après mon opération des ligaments croisés.

Sommaire

Abréviations.....	7
Chapitre I : Introduction bibliographique.....	11
1. Hématopoïèse.....	12
1.1. Ontogénèse des cellules sanguines.....	12
1.1.1. Les cellules hématopoïétiques.....	13
1.1.2. Le microenvironnement hématopoïétique.....	13
1.1.3. Les facteurs de croissance.....	14
1.1.3.1. Les facteurs activateurs.....	15
1.1.3.2. Les facteurs répresseurs.....	16
1.1.4. Les facteurs de transcription.....	17
1.2. Lymphopoïèse B.....	19
1.2.1. Les grandes étapes de la lymphopoïèse B.....	19
1.2.1.1. Engagement des progéniteurs lymphocytaires.....	19
1.2.1.2. Différenciation des cellules pro-B en B matures.....	20
1.2.1.3. La différenciation terminale.....	24
1.2.2. Régulation de l'expression des gènes impliqués dans la lymphopoïèse.....	25
1.2.3. Reprogrammation des lymphocytes B.....	27
1.2.4. Molécules de transduction du signal.....	29
2. Le gène PAX5.....	31
2.1. La famille des gènes « Paired Box ».....	31
2.2. La structure du gène PAX5.....	33
2.2.1. Les domaines de PAX5.....	34
2.2.2. Les isoformes de PAX5.....	36
2.3. Contrôle de l'engagement dans la lignée B par PAX5.....	37
2.4. Régulation transcriptionnelle des cibles de PAX5.....	39
2.4.1. Répression.....	40
2.4.2. Activation.....	41
2.5. Réarrangements des immunoglobulines dépendant de PAX5.....	42
2.6. Différenciation plasmocytaire.....	45
3. Les leucémies aiguës lymphoblastiques B.....	47
3.1 La leucémie aiguë lymphoblastique.....	47
3.1.1. Les anomalies moléculaires associées aux LAL-B.....	50
3.1.2. Anomalies affectant les facteurs de transcription.....	52
3.1.2.1. Les réarrangements MLL.....	52
3.1.2.2. TCF3-PBX1, t(1;19)(q23;p13).....	53
3.1.2.3. TEL-AML1, t(12;21)(p13;q22).....	53

3.1.3. Anomalies affectant le cycle cellulaire	54
3.1.4. Anomalies numériques	54
3.1.4.1. Hyperdiploïdie (>50 chromosomes).....	55
3.1.4.2. Hypodiploïdie (<45 chromosomes).....	55
3.2. Oncogenèse lymphoïde médiée par PAX5.....	56
3.2.1. IGH-PAX5	56
3.2.2. PAX5 dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de type B	57
3.2.2.1. Les translocations impliquant PAX5.....	57
3.2.2.2. Les autres mutations affectant PAX5.....	59
3.2.2.2.1. Mutations ponctuelles de PAX5.....	59
3.2.2.2.2. Délétions et amplifications partielles de PAX5	59
3.2.2.2.3. Délétions totales de PAX5	59
Chapitre II : Résultats expérimentaux	61
Objectif du travail.....	63
1. PAX5 est fréquemment muté dans les LAL-B de l'adulte (étude du GRAALL03)	65
2. De nouvelles translocations de PAX5 retrouvées dans les LAL-B (étude du GFCH)....	89
3. Etude fonctionnelle des mutants de PAX5 dans un modèle <i>ex vivo</i>	117
Chapitre III : Discussion et perspectives	121
1. Statut du gène <i>PAX5</i> dans les LAL-B	122
2. Translocations de PAX5.....	125
3. Impact des altérations de PAX5 sur la différenciation B	127
4. Perspectives	129
Références bibliographiques.....	131
Résumé en anglais.....	145

Abréviations :

+/+ : homozygote positif

+/- : hétérozygote

-/- : homozygote négatif

μHC : isotype μ de la chaîne lourde des immunoglobulines

ABL : Abelson

ADN : acide désoxyribonucléique

AID : activation-induced cytidine deaminase

AML1 : Acute Myeloid Leukemia 1

Bcl-6 : B-cell lymphoma 6 protein

BCR : récepteur du lymphocyte B

BCR : Break Point Cluster Region

Blimp-1: B lymphocyte-induced maturation protein 1

BSAP : B-cell-specific activator protein

CFU-S : Colony Forming Unit in Spleen

CLP : Common Lymphocyte Progenitors,

CSF : Colony Stimulating Factor

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CSR : Class Switch Recombinaison

DACH2 : Dachshund 2

dic : chromosome dicentrique

EBSs : ETS-Binding Sites

EGIL : European Group for the Immunological characterization of Leukemias

ELN : élastine

ELP : progéniteurs lymphoïdes précoces

EPO : érythropoïétine

FISH : Fluorescence *In Situ* Hybridization

FOXP1 : Forkhead Box P1

GC : gene conversion

GOLGA6 : golgi autoantigen, golgin subfamily a 6

GRAALL : Group of Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia

GRAAPH : Group of Research on Adult Acute Philadelphia Leukemia

HAT : histones acétylases

HDAC : histones désacétylases

HLH : hélice-boucle-hélice

HMT : histone méthyltransférase

Ig : immunoglobuline

IgSF : superfamille des immunoglobulines

IL : interleukine

ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif

ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

KI : knock in

LAL : leucémies aiguës lymphoblastiques

LAM : leucémies aiguës myéloblastiques

LIF : Leukemia Inhibiting Factor

LMC : leucémies myéloïdes chroniques

LPL : lymphomes lymphoplasmocytaires

MLL: Mixed Lineage Leukemia

NCoR1 : Nuclear receptor Co-Repressor 1

NK : Natural Killer

NLS : Nuclear Localization Signal

O.M.S. : Organisation Mondiale de la Santé

PST : proline, sérine et thréonine

PAX5 : protéine PAired boX 5 humaine

Pax5 : protéine PAired boX 5 murine

PAX5 : gène PAired boX 5 humaine

Pax5 : gène PAired boX 5 murine

RAG : Recombinaison Activating Gene

RCA-RACE : Rolling Circle Amplification-Rapid Amplification of cDNA Ends

RSS : recombinaison sequence signal

SCF : Stem Cell Factor

SCL : Surrogate Light Chain

SHM : somatic hypermutation

SNC : système nerveux central

TAOK1 : TAO kinase 1

TBP : TATA Binding Proteines

TCR : récepteur des cellules T

TEL : Translocation, ETS, Leukemia

TGF β : Transforming growth Factor β

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TRX : thioredoxine

XBP-1: X-box Binding Protein 1

Zn F : motif à doigt de zinc

Chapitre I :

Introduction bibliographique

1. Hématopoïèse

1.1. Ontogenèse des cellules sanguines

L'hématopoïèse est le processus de formation des cellules sanguines tout au long de la vie d'un individu. Elle assure le renouvellement continu et régulé des différentes cellules sanguines. Le siège de l'hématopoïèse varie durant l'embryogenèse ; lors de la vie intra-utérine, l'hématopoïèse s'effectue au niveau du tissu conjonctif embryonnaire puis au niveau hépatique et splénique. Les premières lignées de cellules souches d'origine mésodermique apparaissent d'abord au niveau des îlots de Wolff et Pander (groupe angioformateur regroupant des cellules endothéliales et des cellules souches hématopoïétiques, CSH) présents dans le sac vitellin, puis elles se développent dans le mésoblaste (mésoderme extraembryonnaire). Ces cellules souches hématopoïétiques dérivent probablement d'un centre intraembryonnaire (Tavian et al., 1999; Tavian et al., 2001). Ce dernier se situerait dans la splanchnopleure autour de l'aorte dorsale au niveau du cordon ombilical. A ce stade l'érythropoïèse est assurée par la rate. Au cours de la phase myéloïde, la descendance fille de ces cellules souches migrent via le système vasculaire dans la moelle osseuse et assurent progressivement la formation du sang. L'hématopoïèse devient médullaire au début du développement des ébauches osseuses, pour se poursuivre exclusivement après la naissance dans la moelle osseuse. Les CSH sont capables d'autorenouvellement et de se différencier en n'importe quelle cellule sanguine en fonction du type de stimulation qu'elles reçoivent. Ces stimulations proviennent de facteurs extrinsèques provenant du microenvironnement et de facteurs intrinsèques comme les facteurs de transcription. Mes travaux de thèse se sont intéressés à la caractérisation d'un de ces facteurs intrinsèques, *PAX5*, gène régulateur du maintien des cellules dans la lignée B. Plus de la moitié des LAL-B n'ont pas de marqueurs permettant d'appréhender la maladie, que ce soit du point de vue de la prise en charge ou de leur pronostic. Le succès du Glivec (Deininger et al., 2005) dans les LAL-B Ph1+ montre l'importance de comprendre les événements primaires de la transformation leucémique. La caractérisation de nouveaux oncogènes ou antioncogènes récessifs est un objectif maintenant réalisable suite au développement récent d'outils d'analyse globale du génome permettant une étude à très haute résolution.

1.1.1. Les cellules hématopoïétiques

On distingue quatre compartiments d'importance inégale dans le système hématopoïétique en fonction de la maturation des cellules, plus les cellules avancent moins elles sont multipotentes :

- le compartiment des cellules souches multipotentes dont les cellules sont quiescentes. En 1961, Till et McCulloch ont irradié à dose létale des souris et leur ont réinjecté des cellules médullaires syngéniques normales. Ils ont observé la formation de nodules spléniques composés de cellules hématopoïétiques. La cellule à l'origine de ces colonies est désignée par le terme CFU-S pour « Colony Forming Unit in Spleen ». Ils ont montré que ces cellules possèdent un potentiel multipotent,
- le compartiment des progéniteurs hématopoïétiques dont les cellules sont engagées dans une ou plusieurs voies de différenciation et qui ont une capacité d'autorenouvellement réduite. Elles deviennent pluripotentes,
- le compartiment des précurseurs hématopoïétiques dont les cellules sont morphologiquement reconnaissables et engagées dans une voie de différenciation. Elles sont capables d'un nombre limité de mitoses,
- le compartiment des cellules matures fonctionnelles possédant le caractère spécifique d'une lignée donnée.

1.1.2. Le microenvironnement hématopoïétique

Le microenvironnement hématopoïétique est un système complexe qui ajuste très précisément les besoins physiologiques et qui lutte contre les agressions extérieures. Il est régulé par un système complexe de facteurs de croissance et d'inhibiteurs le tout dans un écosystème très adapté : le microenvironnement médullaire. Ce microenvironnement fournit aux cellules souches hématopoïétiques des signaux régulateurs très importants pour le

maintien des CSH. La différenciation des CSH et leur prolifération sont des évènements contrôlés par des éléments externes (cytokines entre autres) et par des éléments internes (les facteurs de transcription). L'hématopoïèse doit être parfaitement régulée afin de conserver une homéostasie des cellules sanguines. Il participe à l'organisation générale de la moelle osseuse. Il donne aux cellules souches les conditions intercellulaires satisfaisantes pour assurer l'hématopoïèse. Les cellules du stroma médullaire, fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages, cellules épithéliales et adipocytes, sont organisés au sein des niches hématopoïétiques. Ces niches sécrètent les matrices extracellulaires permettant l'adhésion des cellules souches en particulier grâce au collagène et sécrètent des facteurs de croissance permettant les processus physiologiques cellulaires.

1.1.3. Les facteurs de croissance

Les "facteurs de croissance hématopoïétiques" sont des molécules cruciales pour la survie, la différenciation, la multiplication et la maturation des cellules de l'hématopoïèse. Le premier facteur de croissance isolé a été l'érythropoïétine (EPO) (suspecté par George Rathmann depuis 1906), il a été cloné chez l'Homme en 1985 (Lin et al., 1985). Depuis, de nombreux autres facteurs ont été découverts, clonés et synthétisés. Ils permettent de grands espoirs dans le traitement des maladies de l'hématopoïèse et certains sont déjà utilisés en thérapeutique, comme le G-CSF (CSF = Colony Stimulating Factor) (Neupogen®, Granocyte®) et du GM-CSF (Leucomax®) qui sont utilisés entre les chimiothérapies pour diminuer l'intensité et la durée de la leucopénie, réduisant ainsi les risques infectieux. Les facteurs de croissance hématopoïétiques sont des glycoprotéines agissant comme des "hormones hématopoïétiques". Cependant, à l'exception de l'EPO, ces facteurs sont synthétisés par un grand nombre de cellules présentes dans divers organes : les cellules constituant le stroma cellulaire (cellules endothéliales, fibroblastes) et les cellules hématopoïétiques (monocytes/macrophages, lymphocytes). Elles ont aussi le nom de cytokine et pour celles synthétisées par les lymphocytes, de lymphokines et interleukines (IL). Ces cytokines reconnaissent leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques.

1.1.3.1. Les facteurs activateurs

Chez l'Homme, on distingue schématiquement 3 types de facteurs de croissance selon leur lieu d'action au cours de l'hématopoïèse:

- Les facteurs de promotion : ils permettent l'engagement des cellules souches dans le cycle cellulaire et sensibilisent les cellules souches multipotentes à l'action des autres facteurs de croissance. Ce sont principalement l'IL-6 et le SCF (Stem Cell Factor), le Flt3-ligand, le LIF (Leukemia Inhibiting Factor) qui interviennent dans les stades précoces de l'hématopoïèse.
- Les facteurs multipotents : ils permettent la survie et la différenciation des cellules souches les plus immatures lorsque celles-ci ont été sensibilisées par les facteurs de promotion. Ce sont principalement l'IL-3 et le GM-CSF intervenant sur les cellules souches et les jeunes progéniteurs.
- Les facteurs restreints : ils agissent sur les cellules souches engagées et favorisent la multiplication cellulaire et la maturation des précurseurs. Cet effet est limité à une lignée cellulaire. Ce sont principalement : le G-CSF (lignée granuleuse neutrophile), le M-CSF (lignée monocytaire), l'IL-5 (lignée granuleuse éosinophile), l'IL-4 (lignée granuleuse basophile), l'IL-6 (lignée mégacaryocytaire), l'EPO (lignée érythroïde) et la TPO (thrombopoïétine, mégacaryocytaire).

Parmi ces facteurs, l'interleukine 7 (IL-7) a un rôle majeur dans la lymphopoïèse et particulièrement dans la lymphopoïèse B. Cette interleukine, produite par les cellules stromales, joue un rôle crucial dans l'expansion et dans la survie des précurseurs (Sudo et al., 1989). Le récepteur à l'IL-7 est composé d'une chaîne spécifique α , IL-7 R α et d'une chaîne γ commune aux autres récepteurs aux interleukines. Les complexes interleukine/récepteur sont importants dans la lymphopoïèse. Le rôle de ce complexe consiste en une activation de la prolifération et en un blocage de la différenciation. L'IL-7 agit via STAT5 sur de nombreux effets cellulaires dont les réarrangements de la chaîne lourde des immunoglobulines (Bertolino et al., 2005). Il joue aussi un rôle important dans la reconstitution hématopoïétique

après une transplantation de moelle osseuse (Alpdogan et al., 2003), il contribue à l'immunopathologie de l'arthrite (Hartgring et al., 2006) et les cellules cancéreuses produisant l'IL-7 conduisent à l'ostéoclastogenèse dépendante du TNF α (Roato et al., 2006). Son expression est donc finement régulée afin de permettre l'entrée des cellules dans la lignée B.

1.1.3.2. Les facteurs répresseurs

D'autres facteurs ont un effet inhibiteur sur l'hématopoïèse. Le TGF β (Transforming growth Factor β) est un facteur de croissance inhibant la croissance des progéniteurs précoces. Le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) est produit par les monocytes et les lymphocytes T, il agit de manière différente suivant les facteurs de croissance associés.

Les interférons sont des cytokines essentielles à la communication entre les cellules immunitaires. Ils sont produits par de nombreuses cellules (dont les lymphocytes) notamment lorsqu'elles sont attaquées par un virus. Ils ont des effets anti-mitotiques (bloquant ainsi la réplication de certains virus) et activent les macrophages et la phagocytose.

L'action de ces facteurs sur les cellules souches hématopoïétiques, conduit au développement de deux principales lignées de cellules sanguines. Ce sont des populations homogènes de cellules ayant acquis un programme de différenciation spécifique. La lignée lymphoïde est à l'origine des lymphocytes B et des lymphocytes T. L'autre lignée, myéloïde, est à l'origine de quatre types cellulaires distincts : les érythrocytes, les granulocytes, les monocytes et mégacaryocytes. Néanmoins la représentation traditionnelle de l'hématopoïèse a été modifiée avec la compréhension des mécanismes de plasticité cellulaire, permettant aux progéniteurs de s'engager dans une autre voie de différenciation en fonction des facteurs présents (Figure 1).

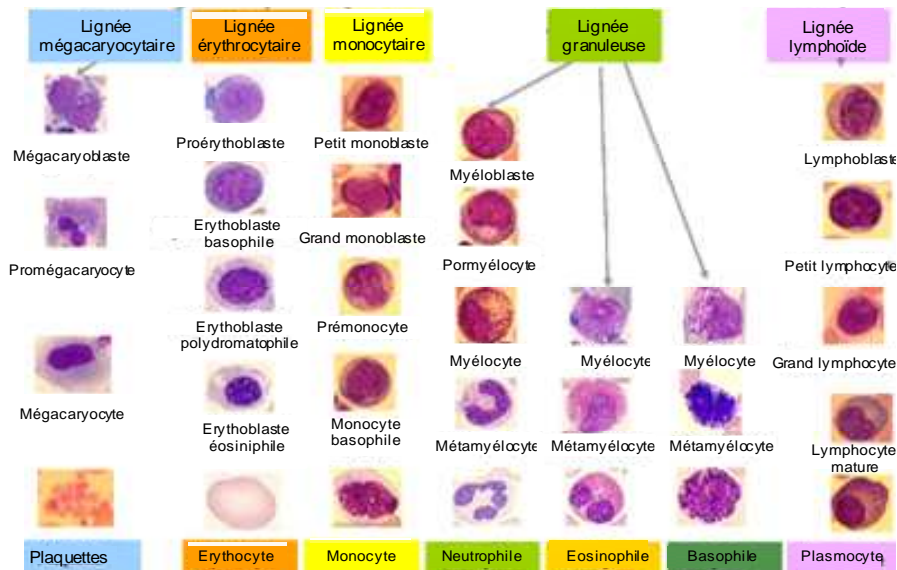


Figure 1 : Schéma pyramidal de l'hématopoïèse montrant la morphologie des cellules de chaque lignée aux différents stades de différenciation.

1.1.4. Les facteurs de transcription

La mise en place des programmes au sein des cellules hématopoïétiques, fait intervenir d'autres molécules comme les facteurs de transcription. Ils contrôlent le programme génique de chaque lignée. Dans l'hématopoïèse, les facteurs de transcription clés jouent un rôle central dans la spécialisation des cellules. Ils agissent à deux niveaux soit en reconnaissant des séquences d'ADN *cis*-régulatrices au niveau du promoteur des gènes, soit en se liant aux protéines. Les interactions protéines/ADN se font de manière spécifique. Il existe différents types d'interaction que l'on peut classer en fonction de la force de liaison, on peut avoir : des ponts salins formés entre les phosphates et les chaînes latérales d'acides aminés chargés positivement ; des liaisons hydrogène pouvant s'établir entre les phosphates, sucres et bases des acides nucléiques et les liaisons peptidiques ou les chaînes latérales des acides aminés hydrophiles ; des interactions d'empilement (stacking) impliquant les chaînes latérales des acides aminés aromatiques et les bases nucléotidiques ; des interactions hydrophobes entre les bases des acides nucléiques et les chaînes latérales des acides aminés non polaires.

Dans la lymphopoïèse B, via les stimulations du microenvironnement, un réseau complexe et extrêmement hiérarchisé de facteurs de transcription permet le bon déroulement

du programme de différenciation B : PU.1, E2A, EBF1 et Ikaros (pour revue, Nutt and Kee, 2007).

La famille ETS regroupe de nombreux facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de gènes impliqués dans diverses activités cellulaires et dans des processus de prolifération et d'apoptose. Parmi les 29 membres décrits de la famille des ETS, 9 sont connus pour leur implication dans l'hématopoïèse : Ets1, Ets2, GABP, Fli1, Elf1, MEF, ESE1, PU.1, and SpiB. PU.1 est un régulateur important dans le devenir des cellules hématopoïétiques et dans la transcription de gènes spécifiques de la lignée B (Hagman and Lukin, 2006). Tous les membres de cette famille présentent un domaine de liaison à l'ADN appelé EBSs (pour ETS-Binding Sites) qui reconnaît des séquences ayant le motif 5' A/GGAA (Gallant and Gilkeson, 2006).

D'autres facteurs de transcription comme E2A et EBF1, jouent un rôle important dans l'établissement de la lignée lymphocytaire B. La structure de ces acteurs clés de la différenciation B est différente. E2A est constitué d'un domaine basic hélice-boucle-hélice (bHLH) permettant la dimérisation de cette protéine et une interaction à l'ADN. EBF1 quant à lui possède aussi un domaine hélice-boucle-hélice (HLH) qui facilite sa dimérisation mais possède un domaine de liaison à l'ADN distinct, un motif à doigt de zinc (Zn F). Ce motif permet une spécificité dans la liaison à l'ADN (Hagman and Lukin, 2006).

Ikaros est quant à lui un facteur de transcription essentiel dans le développement normal lymphocytaire. Il est abondant dans les progéniteurs hématopoïétiques embryonnaires, dans le développement des thymocytes et des cellules T matures, dans les cellules B et les cellules NK (Natural Killer). Ce facteur compte de nombreuses isoformes ayant des rôles physiologiques différents et des structures différentes. La forme pleine taille d'Ikaros est constituée de deux domaines distincts à doigt de zinc : un domaine N-terminal de liaison à l'ADN séquence spécifique et un domaine d'oligomérisation en C-terminal (Yoshida et al., 2006).

1.2. Lymphopoïèse B

Le rôle du système immunitaire est de répondre à la diversité des antigènes (Ag) d'où le besoin de produire de la diversité. Les lymphocytes B sont un constituant majeur du système immunitaire. Cellules clefs de la réponse immunitaire humorale, elles produisent les anticorps, molécules d'immunoglobulines réparties en cinq classes chez l'Homme (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM). Chaque lymphocyte est caractérisé par l'expression d'un seul récepteur de reconnaissance de l'antigène, lui conférant une spécificité unique. Ils sont générés à partir des CSH par un processus de différenciation complexe, chez l'embryon dans le foie fœtal puis dans la moelle osseuse avant la naissance. Après la naissance, les CSH sont nichées dans la moelle osseuse où elles poursuivent tout au long de la vie l'hématopoïèse. Les étapes intermédiaires des voies de signalisation du développement ont été très étudiées et caractérisées durant ces deux dernières décennies, révélant l'importance des facteurs de transcription.

1.2.1. Les grandes étapes de la lymphopoïèse B

1.2.1.1. Engagement des progéniteurs lymphocytaires

Dans la moelle osseuse, les CSH se différencient en progéniteurs lymphocytaires communs (Common Lymphocyte Progenitors, CLP). Le potentiel de différenciation de ces cellules est limité aux lignées T, B et NK, désignant cette population comme la plus précoce de la lignée lymphoïde (Kondo et al., 1997). De plus, le développement de ces cellules est associé avec une perte du potentiel prolifératif et une augmentation du potentiel de différenciation accompagné de l'expression de gènes spécifiques de chaque lignée.

L'expression à la surface du récepteur à l'IL-7 est un marqueur des CLP (Kondo et al., 1997) et intervient de manière critique avec Flt3 (récepteur à tyrosine kinase de son ligand FL, agissant précocement sur la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques) pour l'engagement dans le développement précoce des lymphocytes B. D'autres marqueurs comme les facteurs de transcription Ikaros ou PU.1 agissent aussi à un niveau très précoce permettant la formation de progéniteurs. En effet, l'action de ces facteurs

précoces a été montrée dans des souris déficientes pour Ikaros qui présentent un déficit d'expression de Flt3 (Yoshida et al., 2006) alors que PU.1 permet l'initiation de IL-7R α et Ebf1 (DeKoter et al., 2002; Medina et al., 2004). Les facteurs de transcription essentiels à l'engagement dans la lignée B sont alors exprimés : EBF1 et E2A (Figure 2). Ils jouent un rôle important dans les stades les plus précoces du développement B (Hagman and Lukin, 2005; Murre, 2005). L'absence de EBF1 ou de E2A entraîne un blocage des cellules B arrêtées en stade pré-pro-B (pour revue, Nutt and Kee, 2007). Ces facteurs activent en coordination l'expression des gènes lymphoïdes B (O'Riordan and Grosschedl, 1999) en partie par l'activation de facteurs dits « pionniers » afin d'initier les changements épigénétiques et les remodelages de la chromatine au début de la différenciation (Maier et al., 2004). Cette première étape de la différenciation B voit l'apparition du marqueur spécifique de la lignée B, CD45R (B220 chez la souris, principal marqueur de surface des cellules lymphoïdes, un épissage alternatif détermine la spécificité de lignée de ce marqueur) au stade pré-pro-B. Toutefois, l'expression d'EBF1 et d'E2A n'est pas suffisante pour l'engagement total des progéniteurs B dans la lignée lymphoïde B.

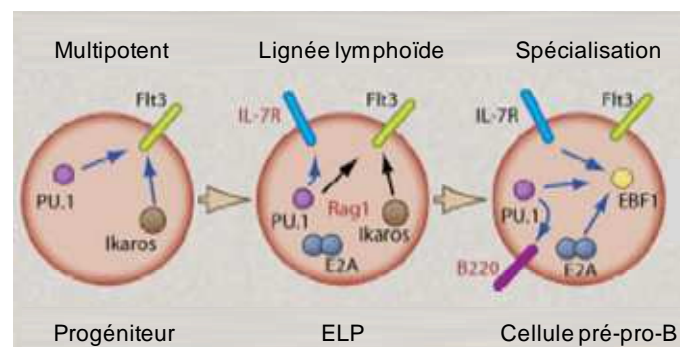


Figure 2 : Expression et régulation des différents facteurs de transcription au début de la différenciation B (pour revue, Nutt and Kee, 2007).

1.2.1.2. Différenciation des cellules pro-B en B matures

Dans le système immunitaire, les cellules pro-B sont le siège des premiers réarrangements des immunoglobulines, clé de voute de la diversité des anticorps. Elles commencent la recombinaison fonctionnelle des segments V (variable), D (diversity) et J (joining) (Bassing et al., 2002). La structure des immunoglobulines (Ig), qu'elles soient

exprimées à la surface des lymphocytes B (où elles ont la fonction de récepteur de l'antigène) ou excrétées par les plasmocytes (dans ce cas on les appelle aussi anticorps), repose sur l'assemblage de deux chaînes lourdes (H pour Heavy) identiques entre elles et deux chaînes légères (L pour Light) également identiques. Les chaînes lourdes sont unies entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures. Les chaînes légères sont unies aux chaînes lourdes par un pont disulfure proche de leur extrémité carboxyterminale. Chaque chaîne est composée d'une région constante C et d'une région variable V. L'association des domaines V des chaînes lourdes et légères définit le site de fixation à l'antigène tandis que les domaines C des chaînes lourdes confèrent ses propriétés effectrices à l'immunoglobuline. Le grand nombre de segments V, D et J disponibles, les multiples combinaisons entre ces éléments (diversité combinatoire) ainsi que l'imprécision de leurs jonctions (diversité jonctionnelle) contribuent considérablement à la diversité des Ig. Les recombinaisons somatiques respectent globalement l'ordre précis suivant : (selon le modèle " ordonné " proposé par Alt et Baltimore) jonctions DJ dans le locus IgH, puis VDJ (avec exclusion allélique), suivies de jonctions VJ dans le locus Ig κ puis Ig λ (avec à nouveau exclusion allélique) (Alt et al., 1984).

Les facteurs de transcription permettent le bon déroulement de la différenciation B et les premiers réarrangements des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines. Le réarrangement de la chaîne lourde des immunoglobulines s'effectue en 2 étapes, le réarrangement des segments D_H et J_H suivi de leur recombinaison avec V_H (Bassing et al., 2002). Les facteurs de transcription EBF1 et E2A contrôlent la première étape du réarrangement D_H-J_H en activant l'expression des gènes *RAG* et en permettant l'accessibilité des régions D_H-J_H au niveau du locus des IgH.

Les gènes *RAG* (pour Recombinaison Activating Gene) codent deux recombinases RAG1 et RAG2 dont l'expression est restreinte à la lignée lymphoïde. Ils jouent un rôle important dans le réarrangement et la recombinaison des gènes des immunoglobulines durant le processus de recombinaison VDJ (McBlane et al., 1995; Oettinger et al., 1990). Ces réarrangements sont essentiels pour la différenciation finale des cellules T et B matures (Hikida et al., 1996). Les protéines RAG1 et RAG2 reconnaissent les séquences spécifiques de recombinaison (RSS) et s'y fixent, entraînant la formation d'une cassure simple brin de l'ADN à la jonction d'heptamères et de la région codante des régions variables. Ces séquences situées en 3' des régions V. RAG1 se lie directement sur les RSS et recrute RAG2 pour former le complexe de clivage actif (Difilippantonio et al., 1996).

Les récepteurs pré-B sont alors présentés à la surface des cellules leur permettant de poursuivre leur développement (seules 55% des cellules atteignent le stade pré-B) conduisant à la mise en place des réarrangements des chaînes légères κ ou λ des immunoglobulines (Figure 4). Cette étape voit la disparition en surface du récepteur pré-B et l'apparition du récepteur B définitif. Ce récepteur B va maintenir la survie et l'homéostasie des cellules B, il va aussi permettre la transmission d'un signal régulateur déterminant le devenir des lymphocytes B (survie, prolifération, différenciation, anergie, mort) lors de l'interaction avec un ligand spécifique. Enfin la dernière fonction de ce récepteur va permettre aux cellules B d'internaliser spécifiquement l'antigène puis de le « présenter » très efficacement, formant ainsi avec les lymphocytes T une « synapse immunologique » où les partenaires échangeront des co-sigaux activateurs.

Tze et collaborateurs ont envisagé que le développement des cellules B à un stade immature de la différenciation serait dépendant du niveau d'expression du BCR, initialement haut, et seulement plus tard durant ce stade, pourrait rencontrer des antigènes auto réactifs. La conséquence fonctionnelle de cette interaction serait la diminution des immunoglobulines de surface via endocytose. Une perte suffisante du signal basal pourrait conduire à une réinitialisation des recombinaisons RAGs. Leurs travaux suggèrent que les signaux basaux du BCR contrôlent les décisions développementales clés de la transition des cellules pré-B aux cellules B immatures (Tze et al., 2005).

Ce deuxième point de contrôle sélectionne les cellules et leur permet un engagement au stade B immature. Les cellules B immatures expriment à leur surface un IgM correspondant au récepteur B et sortent de la moelle osseuse afin d'être activées par un antigène. Ce stade correspond également à l'étape de sélection négative permettant d'acquérir un répertoire de cellules B tolérantes, voyant l'apparition de marqueurs tels que CD22 (molécule exprimée en début et en fin de différenciation B, elle participe à l'adhésion des cellules au sein de la « synapse immunologique »), CD23 (molécule clé dans l'activation et la croissance des cellules B) et CD40 (molécule exprimée à la surface des cellules matures mais pas sur les plasmocytes, elle agit sur la formation du centre germinatif et est impliquée dans le développement des cellules B mémoires). La transduction du signal se fait via des motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) et ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif, ils agissent comme des transducteurs intracytoplasmiques) exprimés sur la portion intracytoplasmique du BCR et ayant des rôles antagonistes. Ces deux motifs deviennent fonctionnels après phosphorylation de leurs tyrosines par des tyrosines-kinases de la famille Src.

Les cellules B matures naïves possèdent à leur surface des IgM et des IgD, et circulent entre les différents organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques) à la rencontre de l'antigène spécifique (Scher et al., 1976).

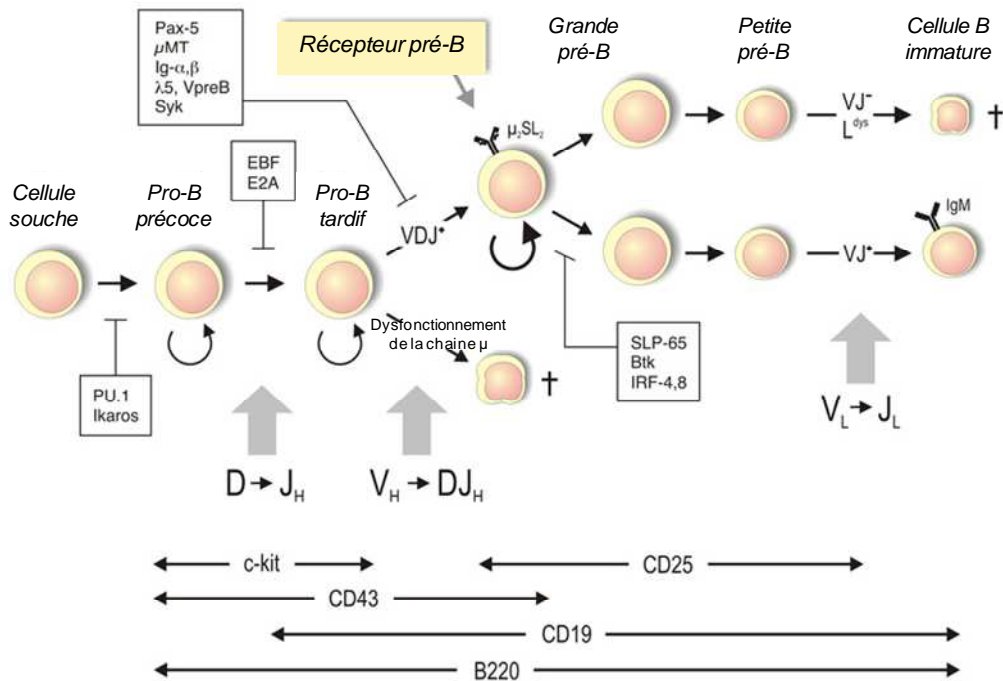


Figure 4 : Différenciation des cellules de la lignée lymphocytaire B (groupe de Thomas Winkler).

1.2.1.3. La différenciation terminale

La fixation de l'antigène par le récepteur B provoque à la fois la prolifération du lymphocyte mais aussi sa différenciation en cellule effectrice. Ce mécanisme requiert une collaboration avec les lymphocytes T CD4+ Th2 et fait intervenir des protéines membranaires (CD40 des lymphocytes B et CD40L des lymphocytes T) et des cytokines (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10). Au niveau des organes lymphoïdes secondaires, les cellules B s'orienteront vers la zone marginale ou vers la zone folliculaire en fonction de leur devenir. Dans la zone marginale, les lymphocytes activés sous forme de plasmocytes, produiront un grand nombre d'IgM permettant une opsonisation (processus biochimique favorisant la phagocytose de cellule infectée par un pathogène) des pathogènes. Dans la zone folliculaire, les cellules B pourront soit être relarguées dans la circulation entraînant un retour dans la moelle osseuse au niveau des niches hématopoïétiques, soit terminer leur maturation. Cette maturation

s'accompagne d'une commutation isotypique de la chaîne lourde des immunoglobulines (changement de la classe des immunoglobulines) et l'hypermutation somatique (modification de l'affinité pour l'antigène). La maturation des lymphocytes B ainsi terminée, la différenciation en cellules plasmocytaires (productrices d'anticorps) ou en cellules mémoires (permettant une réponse secondaire plus rapide et plus efficace) sera achevée.

C'est AID (Activation-Induced Deaminase) qui augmente la diversité aux anticorps produits contre des pathogènes spécifiques. AID est une enzyme essentielle dans la régulation des commutations isotypiques (CSR), des hypermutations somatiques (SHM) et de la conversion de gène (GC). La stimulation antigénique induit ces trois types d'altérations génétiques dans les cellules B activées (Honjo et al., 2002). L'hypermutation somatique génère des mutations ponctuelles aléatoires dans les gènes des segments variables V (Arakawa and Buerstedde, 2004). Dans le locus des immunoglobulines, la commutation isotypique permet les échanges isotypiques des IgM avec les autres isotypes IgE, IgG et IgA, ajoutant une diversité des immunoglobulines contre un antigène donné. Elle a lieu dans la région S du locus de C_H et se fait en clivant, juxtaposant et joignant S_μ et l'une des autres régions S localisées en 5' de chaque gène C_H. Le système AID-dépendant est un mécanisme complexe faisant intervenir des nombreux co-facteurs ainsi que les recombinaisons et les mutateurs permettant la spécificité des immunoglobulines (Honjo et al., 2004). L'expression des AID est restreinte au niveau des centres germinatifs et AID contrôle la SHM et la CSR permettant la mise en place de la diversité dans les réarrangements des gènes des immunoglobulines afin de produire différents isotypes d'anticorps de forte affinité. PAX5 active directement AID. La conversion génique quant à elle est un événement de recombinaison de l'ADN qui intervient durant les divisions méiotiques. Ce mécanisme permet l'échange entre certains gènes du segment V afin de diversifier l'affinité des immunoglobulines.

1.2.2. Régulation de l'expression des gènes impliqués dans la lymphopoïèse

L'étude de la régulation de l'expression de Pax5 a été réalisée chez la souris. Une question importante mais largement mal connue concerne les régulateurs de Pax5 qui se lient sur ses séquences promotrices conduisant à son activation et lui permettent de débiter de la différenciation B. Dans la hiérarchie transcriptionnelle, Pax5 est placé en aval des gènes codant

les facteurs de transcriptions Pu.1, Ikaros, E2a et Ebf1, qui sont exprimés dans les cellules pro-B des souris *Pax5*^{-/-} (Nutt et al., 1997).

Le réseau régulateur de facteurs de transcription contrôle le développement précoce des cellules B. A faible dose, Pu.1 active la transcription des gènes requis pour les différentes étapes de la différenciation B, incluant Ebf1 et IL-7R α . Ebf1 peut s'autoréguler. Ebf1 influence aussi l'expression d'E2a. Ces deux facteurs sont nécessaires à la production de Pax5. Ils activent en synergie la transcription du programme B et les réarrangements des gènes des immunoglobulines (Figure 5).

De plus, la transcription de Pax5 est diminuée dans les cellules pro-B de souris hétérozygotes pour les gènes *E2a* et *Ebf1* (souris *E2a*^{+/-} *Ebf1*^{+/-}) (O'Riordan and Grosschedl, 1999), et l'expression de *Ebf1* dans des cellules déficientes pour *E2a* entraîne un engagement dans la lignée en activant *Pax5* (Seet et al., 2004). Ebf1 et Stat5 se lient sur l'élément régulateur en amont de l'exon 1A de *Pax5* (Hirokawa et al., 2003; O'Riordan and Grosschedl, 1999). Toutefois, il reste à caractériser la fonction des promoteurs et des enhanceurs de *Pax5* afin de pouvoir définir les régulateurs s'y fixant et activant son expression. *Pax5* exerce un rétrocontrôle sur Ebf1 permettant un maintien du taux de Ebf1 normal dans les lymphocytes B (Fuxa et al., 2004; Nera et al., 2006; Roessler et al., 2007).

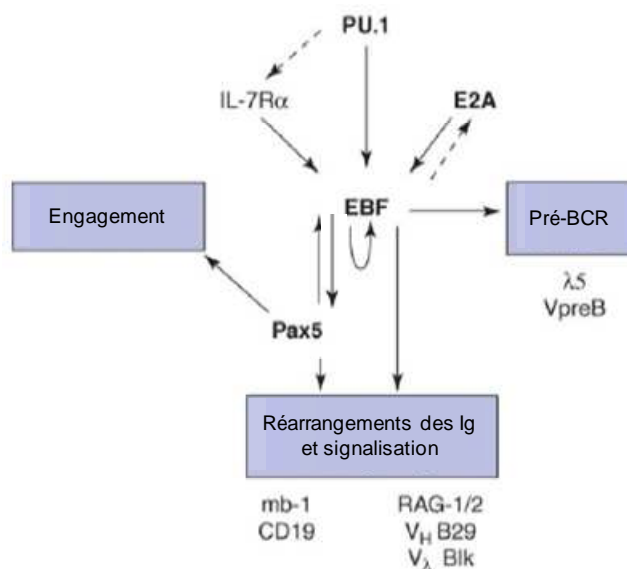


Figure 5 : Interaction existant entre les principaux facteurs de transcription de la lignée B (Hagman and Lukin, 2006).

1.2.3. Reprogrammation des lymphocytes B

Au cours du développement, ces CSH perdent leur plasticité et acquièrent un potentiel de différenciation leur permettant de se différencier en cellules fonctionnelles et de maintenir le programme d'expression des gènes de la lignée sélectionnée. Cette différenciation est définie comme un événement unidirectionnel et irréversible en conditions physiologiques. Des études récentes ont renversé ce dogme en montrant que des cellules différenciées avaient la capacité de dédifférenciation en fonction de la stimulation (expression forcée de facteur de transcription d'autres lignées ou stimulation ectopique de cytokines) (Cobaleda and Busslinger, 2008).

Lors des dernières étapes de la différenciation B, après stimulation par un antigène, les cellules peuvent emprunter deux voies, soit garder leur potentiel B en se différenciant en cellules B mémoires soit changer de voie en devenant ainsi des plasmocytes. L'absence de *Pax5* dans des cellules B matures non activées, induit leur conversion en lymphocytes T fonctionnels (Cobaleda et al., 2007a) (Figure 6). Cette hypothèse fut testée par des expériences de perte ou gain de fonctions. L'expression forcée du facteur de transcription C/EBP- α (exclusivement exprimé dans les progéniteurs myéloïdes) dans les lymphocytes B de la moelle osseuse ou de rate conduit à une trans-différenciation des cellules B infectées en macrophages fonctionnels, quelques jours après leur mise en culture *in vitro* (Xie et al., 2004).

Deux systèmes peuvent intervenir dans la transformation des cellules B. La reprogrammation des cellules B se fait en ajoutant un facteur clé d'une autre lignée. Le facteur C/EBP- α active le programme génétique de la lignée myéloïde et réprime l'expression des gènes de la lignée B en interférant avec l'activité transcriptionnelle de *Pax5* (Heavey et al., 2003). L'expression rétrovirale de *Pax5* dans des CLP empêche la différenciation myéloïde médiée par C/EBP- α (Hsu et al., 2006). La plasticité quant à elle, se produit lorsqu'un facteur crucial est enlevé dans les cellules. *Pax5* est requis pendant le développement B pour maintenir l'expression des gènes spécifiques de la lignée B et réprimer l'expression des gènes de lignées inappropriées (Delogu et al., 2006; Horcher et al., 2001; Schebesta et al., 2007). Des souris transgéniques *Pax5* fl/-, développent des lymphomes de cellules progénitrices agressives, suggérant que les cellules ayant perdu *Pax5* réacquièrent un potentiel d'auto renouvellement similaire à celui des cellules souches (Cobaleda et al., 2007a).

Cependant, ces lymphomes diffèrent des cellules pro-B *Pax5* -/- de part leurs réarrangements des loci des gènes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines,

indiquant ainsi une déprogrammation de cellules B matures (Cobaleda et al., 2007a). De plus, la perte de Pax5 conduit à une extraordinaire plasticité des cellules B matures.

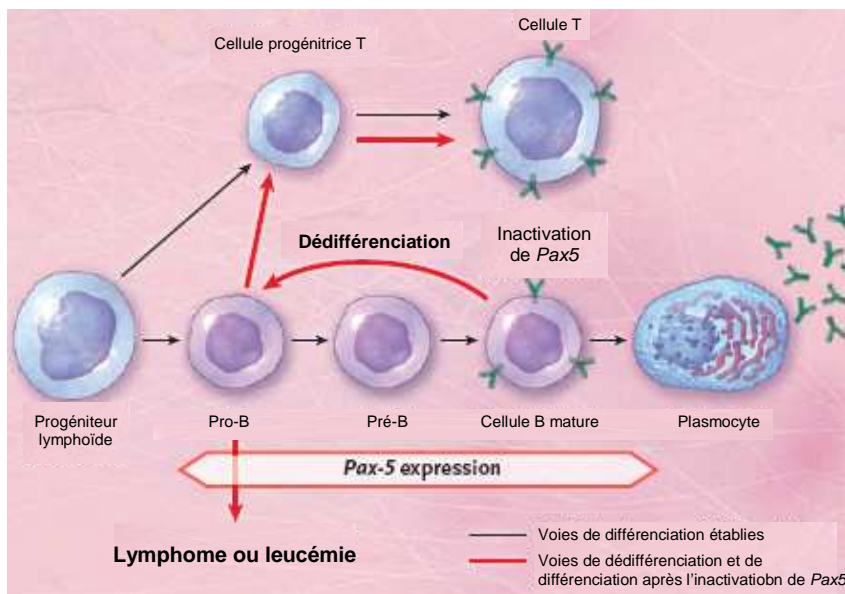


Figure 6 : Conversion des cellules B en cellules T. Schéma résumant les travaux de l'équipe de Busslinger sur la dédifférenciation des cellules B matures en progéniteurs et en lymphocytes T dans des souris transgéniques permettant la délétion conditionnelle de *Pax5* (pour revue, Nutt, 2008).

En conditions physiologiques, l'expression de *Pax5* est diminuée durant la différenciation terminale des cellules B matures en plasmocytes, qui est initiée en réponse à la stimulation du BCR par des antigènes étrangers (Nera and Lassila, 2006). La perte de *Pax5* dans le contexte de forte signalisation du BCR, résulte en la différenciation des cellules B matures en plasmocytes, tandis que l'inactivation de *Pax5* en absence de signalisation du BCR initie la dédifférenciation en progéniteurs lymphoïdes non engagés. Pax5 active les gènes cibles codant les composants essentiels de la signalisation du BCR comme le Cd79a, Cd19 et Blnk (Cobaleda et al., 2007b). La signalisation du BCR est perdue en absence de Pax5, ce qui est connu pour être essentiel dans la survie des cellules B matures. Une modification dans la transduction du signal du BCR contribuerait au processus de dédifférenciation.

1.2.4. Molécules de transduction du signal

Ces molécules interviennent dans la signalisation liée au BCR, dans la transduction du signal. Elles vont permettre l'induction de divers processus physiologiques durant la différenciation B. L'immunophénotypage des cellules B permet de caractériser le stade de différenciation des cellules B par une technique de cytométrie en flux permettant la détection de sous-types cellulaires au sein d'une population hétérogène. La séquence de maturation des cellules B implique l'expression progressive d'un certain nombre de molécules de surface identifiées (Figure 7).

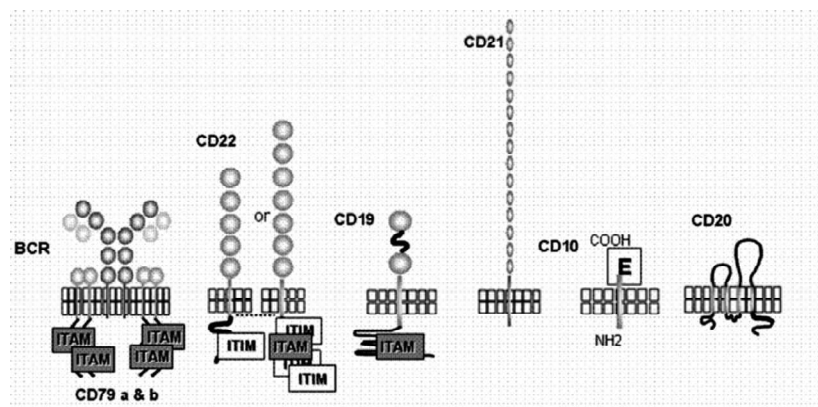


Figure 7 : Structures moléculaires des antigènes de la différenciation B.

Le récepteur des cellules B (*BCR* pour B-cell receptor) est une structure complexe spécifique, composée d'une immunoglobuline de surface, une queue courte intracytoplasmique, associée avec deux hétérodimères *CD79a* et *CD79b* (Chu and Arber, 2001). Ces derniers sont caractérisés par un domaine extracellulaire de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) et de longues queues intracellulaires portant un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). La transduction du signal sera transmise par l'engagement du BCR via l'activation des motifs sur les facteurs *CD79*.

Le marqueur *CD19* est une molécule de surface jouant un rôle dans la signalisation du BCR en recrutant des kinases (Src). C'est une molécule formée de deux domaines IgSF extracellulaires et d'une longue queue intracytoplasmique portant un motif ITAM. *CD19* est une molécule clé dans le développement et l'activation des cellules B indépendamment de la présence du BCR (Carter et al., 2002; Poe et al., 2001).

CD20 est une molécule impliquée dans le développement et la différenciation des cellules B en cellules plasmocytaires. Elle est constituée de 4 domaines transmembranaires, dont les extrémités C-terminale et N-terminale sont dans le cytoplasme, et de deux boucles extracellulaires. Cette molécule semble agir comme un canal à ions calciques et régule l'activation des cellules B. *CD20* est la cible d'un anticorps monoclonal thérapeutique (Rituximab®) largement utilisée dans les lymphomes humains non Hodgkiniens (Gokbuget and Hoelzer, 2004).

CD21 n'appartient pas à la superfamille des immunoglobulines. Il est composé d'une longue série de courtes séquences consensus, repliées par unités de 60 résidus, appartenant à la famille des régulateurs des gènes activateur du complément. *CD21* est un récepteur permettant la dégradation de fragments de la fraction C3 du complément et semble être impliqué dans l'activation des cellules B que ce soit sur la reconnaissance des complexes immunologiques ou des antigènes opsonisés. Ce marqueur est aussi utilisé par le virus Epstein Barr comme récepteur cellulaire, expliquant le tropisme des cellules B de ce virus, capable d'être immortaliser et d'induire des lymphomes B (Poe et al., 2001).

CD22 est une molécule IgSF qui possède deux isoformes, une constituée de sept domaines et une queue intracellulaire comportant trois motifs ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) et un ITAM, le second est un variant épissé avec cinq domaines extracellulaires et une queue intracytoplasmique avec un motif ITAM. Ces signaux inhibiteurs semblent être impliqués dans le contrôle des réponses des cellules B aux antigènes (Poe et al., 2001).

CD10 est une enzyme aussi connue sous le nom d'endopeptidase neutre ou d'enképhalinase. Elle est largement exprimée par les entérocytes dans l'intestin, les cellules épithéliales du tubule rénal, mais aussi par les tissus polymorphonucléaires et les tissus du cerveau. L'angiotensine et la bradykinine comptent parmi ses substrats. Son rôle dans la maturation des cellules B est toujours obscur mais il pourrait être impliqué dans la régulation de la croissance et la différenciation des progéniteurs en interférant avec des facteurs actifs solubles ou pro actifs.

2. Le gène PAX5

2.1. La famille des gènes « Paired Box »

Parmi les facteurs de transcription permettant le développement des cellules B, PAX5 a été décrit comme gardien de l'identité B (Cobaleda et al., 2007b). Il appartient à la famille des gènes « paired box » (*PAX*). On dénombre à ce jour neuf membres dans cette famille, de *PAX1* à *PAX9* (Stapleton et al., 1993; Walther et al., 1991). La structure de base de tous les membres est constituée d'un domaine de liaison à l'ADN appelé paired box, d'un domaine de transactivation en C-terminal, à laquelle peut s'ajouter un octamère et/ou un homéodomaine complet ou partiel dans la partie centrale de la protéine. La structure de la séquence primaire des membres de cette famille est très proche. Ils jouent des rôles divers et variés dans l'organogenèse pendant le développement embryonnaire en régulant la prolifération, le renouvellement cellulaire, dans la résistance à l'apoptose, dans la migration des précurseurs embryonnaires et dans la coordination de programmes de différenciation spécifique. Leur spécialisation dépend du type cellulaire dans lequel chaque gène est exprimé. Les gènes *PAXs* sont regroupés en quatre classes, en fonction de critères morphologiques (pour revue, Lang et al., 2007) (Figure 8).

- Classe I : *PAX1* et *PAX9* ne possèdent pas d'homéodomaine. *PAX1* est indispensable au développement de la colonne vertébrale et *PAX9* à celui de divers organes et éléments du squelette.
- Classe II : *PAX3* et *PAX7* ont l'octamère et l'homéodomaine entier. *PAX3* et *PAX7* marquent les progéniteurs myogéniques et régulent leur entrée dans le programme de différenciation des muscles squelettiques. Des résultats récents ont souligné l'importance des populations cellulaires *PAX3/7* dans le développement du muscle squelettique et sa régénération.

- Classe III : PAX2, PAX5 et PAX8 ont l'octamère mais un homéodomaine partiel. PAX2 est impliqué dans le développement rénal et PAX8 dans la formation de cellules folliculaires productrices de thyroxine dans la glande thyroïde.
- Classe IV : PAX4 et PAX6 possèdent l'homéodomaine complet mais pas l'octamère (Stuart and Gruss, 1995). PAX4 et PAX6 quant à eux interviennent dans le développement des cellules pancréatiques. PAX4 est essentiel pour la différenciation des cellules beta pancréatiques productrices d'insuline.


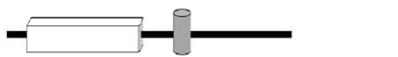

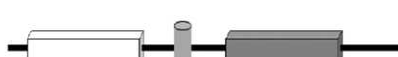

Famille PAX	Structure de la protéine/domaines 	Membres de la famille PAX	Expression embryonnaire	Pathologies associées
I		PAX1	Squelette, thymus, divers organes	Syndrome Klippel-Feil Syndrome Jarcho-Levin
		PAX9	Squelette, thymus, dents	Syndrome Jarcho-Levin Oligodentie
II		PAX2	Rein, SNC	Dysplasie hyperproliférative du rein, hyperplasie rénale, cancer de la vessie et du rein, syndrome Coloboma
		PAX5	Cellules B, SNC	Lymphomes
		PAX8	Rein, thyroïde, SNC	Hypothyroïdisme congénitale, adénomes/carcinomes de la thyroïde
III		PAX3	Crête neurale, SNC, somites/muscle	Syndrome Waardenburg de type I/III, mélanome, rhabdomyosarcome
		PAX7	Crête neurale, SNC, somites/muscle	Rhabdomyosarcome
IV		PAX4	Pancréas, intestin	Diabète
		PAX6	Pancréas, intestin, SNC et oeil	Aniridie, cataractes/ anomalies de Peter

Figure 8 : Protéines de la famille PAX. Les protéines PAX varient de par la présence ou l'absence de l'octapeptide (cylindre gris) et/ou de l'homéodomaine (pavé gris). Le domaine de paired est représenté par un pavé blanc. L'expression embryonnaire des domaines est listée (SNC : système nerveux central). Les pathologies associées sont décrites dans la dernière colonne (pour revue, Lang et al., 2007).

PAX5 est le seul gène de cette famille à être exprimé dans l'hématopoïèse. Les protéines PAX5 humaine et Pax5 murine présentent 99% d'homologie. Chez la souris, son expression est détectée d'abord dans le développement du système nerveux central au niveau embryonnaire (dans le mésencéphale, région du tronc cérébrale reliée au cerveau et dans la moelle épinière), puis dans le foie fœtal pour se poursuivre dans la moelle osseuse. Pax5 est

localisé lors du développement embryonnaire uniquement au niveau du neuroépithélium tegmental et à l'extrémité postérieure du mésencéphale (Adams et al., 1992).

2.2. La structure du gène *PAX5*

Durant la lymphopoïèse B, *PAX5* est exprimé du stade pro-B au stade B mature, puis son expression s'éteint pour permettre la différenciation plasmocytaire. La délétion homozygote de *Pax5* dans les modèles murins conduit à une trans- ou une dé-différenciation des cellules B dans plusieurs autres lignées de cellules hématopoïétiques (Cobaleda et al., 2007a; Nutt et al., 1999; Rolink et al., 1999). *PAX5* est ainsi impliqué à la fois dans le maintien de l'identité B et dans le contrôle de la différenciation terminale. *PAX5* reconnaît ses cibles via son domaine N-terminal et contrôle la transcription par l'intermédiaire des séquences régulatrices inhibitrices et activatrices du domaine C-terminal. Il est composé de 11 exons. Après la naissance, *PAX5* est un facteur de transcription essentiel pour l'engagement définitif des cellules dans la lignée B. Il code la protéine BSAP (B-cell-specific activator protein). Au niveau génomique, chez l'Homme, le gène *PAX5* est localisé sur le chromosome 9 dans la région p13 où il est régulé par deux promoteurs distincts : le premier en amont contenant la TATA-box associé avec l'exon 1A et le second en aval sans TATA-box couplé avec l'exon 1B (Busslinger et al., 1996). Les processus de régulation de ces promoteurs ne sont pas connus, néanmoins, chaque promoteur induit la transcription d'une région 5'UTR différente et du premier exon qui se lie à une région codante commune (exons 2-10) par épissage donnant naissance à deux principales isoformes *PAX5a* et *PAX5b* (Figure 9).

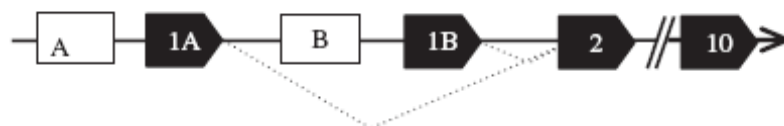


Figure 9 : Structure schématique de *PAX5* montrant les deux régions promotrices alternatives qui régulent l'expression des régions des exons 1A et 1B, suivies des exons 2 à 10 communs (Robichaud et al., 2008).

L'expression de *Pax5* à partir des deux promoteurs semble finement régulée à la fois lors de son activation ou lors de son extinction. Une seule séquence enhancer en amont du promoteur 1A était jusqu'à très récemment identifiée et dirigeait l'expression de *Pax5* dans le système nerveux central.

Une parution récente est venue compléter ces connaissances en montrant qu'il existait une séquence enhancer de 5 kb dans l'intron 5-6 de *Pax5* (Decker et al., 2009) donnant la spécificité d'expression de *Pax5* dans les lymphocytes B. Les auteurs ont déterminé une région minimale de 343pb contenant les sites de fixation pour les facteurs de transcription PU.1, NF- κ B, IRF4 et IRF8. De nombreux épissages alternatifs additionnels conduisent à l'expression d'isoformes protéiques décrites mais dont les mécanismes de régulation restent mal connus.

2.2.1. Les domaines de PAX5

PAX5 est formé de différents domaines intervenant dans l'activité de la protéine (Figure 10). Il est constitué de :

- Un domaine de liaison à l'ADN permettant l'interaction avec d'autres facteurs de transcription. Le domaine « paired box » est divisé en deux sous domaines contenant un motif hélice-boucle-hélice homéodomaine-like et il est caractérisé par une séquence consensus définissant son affinité pour les promoteurs de ses gènes cibles. Ce domaine commun aux protéines de la famille PAX, fonctionne comme une région de liaison à l'ADN comprenant les sous domaines N- et C-terminal (Czerny et al., 1993). La nature bipartite du domaine paired permet une spécificité plus variée des sites de liaisons (Czerny et al., 1993). Le recrutement des protéines de la famille Ets se fait au niveau du domaine N-terminal du site de liaison à l'ADN de PAX5 (Fitzsimmons et al., 1996). Cette interaction altère la séquence de reconnaissance du domaine à l'ADN des facteurs Ets (Garvie et al., 2001).
- Un octapeptide dont la présence conduit à une diminution de l'activité transcriptionnelle de la protéine PAX5. Il interagit avec Grg4 (aussi appelé TLE4 protéine co-répresseur), un des quatre membres de la famille des protéines Groucho

(Koop et al., 1996; Stifani et al., 1992). Ces protéines Groucho sont recrutées au niveau de cet octapeptide et possèdent un potentiel répresseur (Fisher and Cauchy, 1998).

- Un homéodomaine partiel associé avec les protéines de la TATA-box, régule la machinerie transcriptionnelle. Eberhard et Busslinger ont montré que les TATA Binding Proteins (TBP) et le gène du rétinoblastome (*Rb*, suppresseur de tumeur régulant négativement le cycle cellulaire) interagissaient directement avec PAX5, conduisant à une régulation de la machinerie transcriptionnelle et du contrôle de la prolifération cellulaire. Néanmoins ce domaine est nécessaire mais pas suffisant pour l'interaction avec ces deux protéines parce qu'elles se lient sur d'autres motifs de PAX5 conduisant à une interaction complète menant à un effet physiologique (Eberhard and Busslinger, 1999).
- Un signal de localisation au noyau permettant à la protéine de pénétrer dans le noyau afin de se fixer sur ses cibles à réguler. Ce domaine est essentiel pour une action normale de PAX5 dans les processus de régulation dans lesquels il intervient.
- Un domaine de transactivation et de répression. L'analyse structure/fonction de PAX5 a mené à l'identification d'un domaine de transactivation de 55 acides aminés localisé dans des séquences PST (proline, sérine et thréonine) riches en C-terminal. Ce domaine exerce une fonction activatrice analogue à celle d'un enhancer et il est soumis à une forte régulation négative par les séquences adjacentes situées à l'extrémité C-terminal (Dorfler and Busslinger, 1996). La transcription des gènes est régulée par l'interaction du domaine de transactivation avec des histones acétylases (HAT), telles que CBP (CREB binding protein) (Emelyanov et al., 2002) ou le complexe SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase complex : ce complexe est une HAT qui lie de nombreuses protéines lui permettant d'agir sur ses cibles. Son activité est ciblée au niveau de certains promoteurs par des interactions avec des activateurs transcriptionnels) (Barlev et al., 2003).

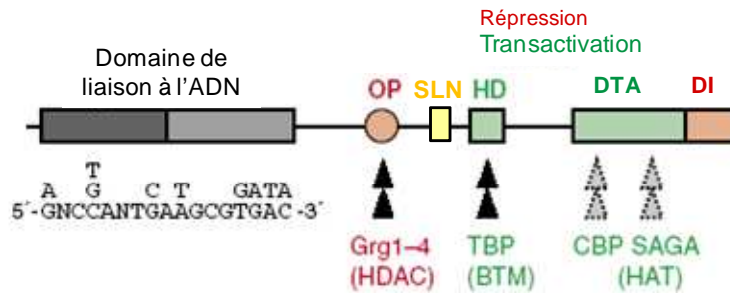


Figure 10 : Domaines fonctionnels et protéines interagissant avec PAX5. La séquence consensus du domaine de liaison à l'ADN et les différentes molécules interagissant avec les différents sites sont représentés. BTM, basal transcription machinery; HAT, histone acétyltransférase; HD, homéodomaine; HDAC, histone désacétylase; DI, domaine inhibiteur; OP, octapeptide; DTA, domaine de transactivation; TBP, TATA-binding protein; SLN, signal de localisation au noyau (Cobaleda et al., 2007b).

2.2.2. Les isoformes de PAX5

Chez l'Homme et la souris, les deux isoformes majoritaires de *Pax5* sont exprimées dans différents types cellulaires, *Pax5a* exclusivement dans le système hématopoïétique et *Pax5b* est exprimé de manière ubiquitaire. L'épissage alternatif de *Pax5* donne lieu à l'expression de deux autres isoformes minoritaires Pax5d et Pax5e (Figure 11). L'isoforme Pax5d a perdu les exons 6 à 10 alors que l'isoforme Pax5e a perdu l'exon 2 et les exons de 6 à 10. Les épissages de Pax5 augmentent ses capacités régulatrices de l'expression des gènes. Une étude a montré que les deux isoformes Pax5d et Pax5e avaient un fort potentiel régulateur sur l'activité de Pax5a (Lowen et al., 2001). D'un point de vue structural, le fait que Pax5d n'ait pas de domaine de transactivation et qu'il se lie sur les cibles de Pax5a avec la même affinité, il est considéré comme un dominant négatif de Pax5a (Lowen et al., 2001). Ce suppresseur transcriptionnel voit son expression augmenter en fin de différenciation B afin d'inhiber l'expression de Pax5a et de ses cibles, et de stimuler l'expression de gènes plasmocytaires. De plus, Pax5d inhibe la prolifération (Lowen et al., 2001). Pax5e quant à lui, est exprimé dans les cellules B aux stades précoces. Il semble avoir l'action inverse de Pax5d en activant la prolifération. Toujours dans la même étude, il apparaît que Pax5e interagit fortement avec le

complexe protéique de la thioredoxine (TRX) intervenant dans la prolifération des cellules B. TRX est une molécule d'oxydoréduction jouant un rôle protecteur contre une grande variété de stress oxydatif grâce à ses propriétés de capture des radicaux libres. Elle a la possibilité d'activer d'autres facteurs de transcriptions comme Ref-1, NF-kB et Pax8, il est donc possible que Pax5e soit impliquée dans les mouvements dans le noyau de TRX. La séquence C-terminal de Pax5e pourrait jouer un rôle crucial dans la régulation rédox. Il semblerait donc que Pax5e ait un rôle de co-activateur (Lowen et al., 2001). Cette étude de Zwollo et collaborateurs a démontré l'évidente implication de ces isoformes dans l'activation et la différenciation des cellules de la lignée B en modulant la fonction de Pax5a, Pax5d comme inhibiteur de cette activité et Pax5e comme activateur de la prolifération des cellules B associé avec la protéine TRX.

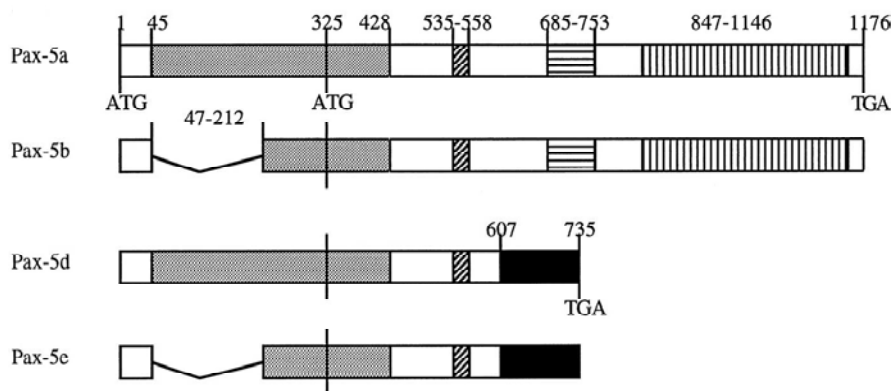


Figure 11 : Structure des différentes isoformes de Pax5.

2.3. Contrôle de l'engagement dans la lignée B par PAX5

Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en cellules B, en premier par la génération de progéniteurs multipotents lymphoïdes, qui par la suite se différencient via les progéniteurs lymphoïdes précoces (ELP) en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) menant à la perte de leur multipotence. Ces CLP ont un potentiel de cellule B, T et de NK. L'engagement des progéniteurs dans la lignée B dépend de E2A et de EBF1 puisqu'en absence de ces facteurs de transcription, les cellules ne peuvent pas initier le développement B. PAX5 quant à lui, permet le maintien de ce programme B, de ce fait son absence conduit à un blocage des cellules B à un stade précoce de la différenciation lymphocytaire B. La lymphopoïèse B est alors arrêtée à un stade très précoce de la différenciation B marquant

toutefois l'apparition de progéniteurs B220+ (marqueur de la lignée, CD45R chez l'Homme) dans le foie fœtal d'embryon de souris *Pax5* déficient (Nutt et al., 1997). Les souris déficientes pour le gène *Pax5* qui naissent, possèdent un retard de croissance et 95% d'entre elles meurent dans les trois semaines qui suivent. Les 5% restant survivent jusqu'à l'âge adulte, ils sont fertiles mais demeurent sévèrement affectés. Ces souris ont de graves lésions du système nerveux central. Cependant, le développement des cellules B se poursuit jusqu'au stade pro-B dans la moelle osseuse de souris adulte *Pax5* *-/-*, ce qui indique une implication cruciale de *Pax5* dans la lymphopoïèse B fœtale et adulte (Urbanek et al., 1994). L'interleukine 7 (IL-7) permet la prolifération des cellules *Pax5* *-/-*, mais bloque leur différenciation. Toutefois, en présence d'autres cytokines spécifiques, les cellules *Pax5* *-/-* gardent un caractère pluripotent leur permettant de se différencier en macrophages, granulocytes, cellules dendritiques, ostéoclastes et cellules NK fonctionnelles (Nutt et al., 1999) (Figure 12). De plus, ces cellules peuvent complètement restaurer le développement des thymocytes dans les souris *Rag2* déficientes et différencient *in vitro* en cellules T sur un stroma de cellules exprimant le DL1 (Notch ligand Delta-like 1) (Hoflinger et al., 2004). *Pax5* est clairement défini comme le facteur crucial du maintien des cellules dans la lignée B en réprimant l'expression de gènes spécifiques d'autres lignées.

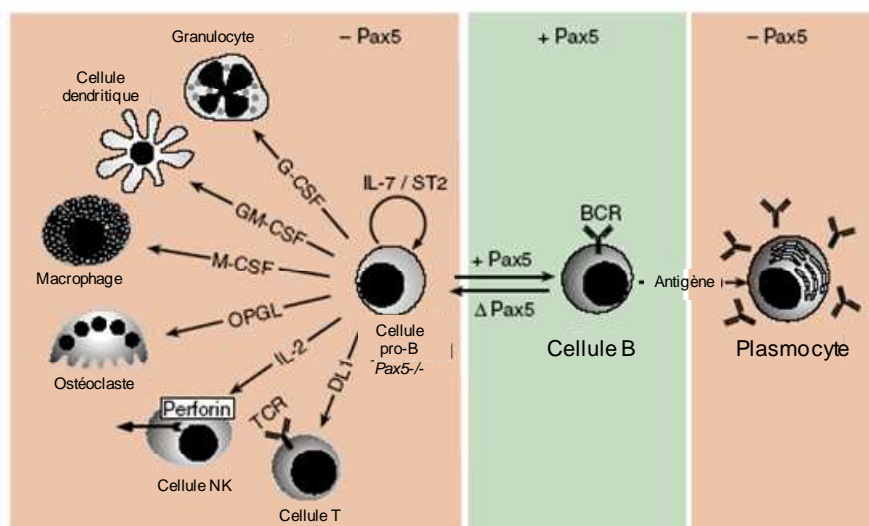


Figure 12 : Engagement dans la lignée B dépendant de *Pax5*. Les cellules *Pax5* *-/-* bloquées en pro-B sont capables de se différencier en plusieurs types cellulaires hématopoïétiques, *in vitro* en présence de cytokines spécifiques ou *in vivo* après transplantation (Cobaleda et al., 2007b).

L'engagement dans une lignée et la différenciation en cellules matures étaient considérés comme des processus unidirectionnels et irréversibles en conditions physiologiques. L'engagement des progéniteurs hématopoïétiques dans la lignée B et leur développement en lymphocytes B matures dépendent d'une manière critique de la cinétique d'expression de *Pax5*. Busslinger et collaborateurs ont montré que la délétion conditionnelle de *Pax5 in vivo* dans des cellules B matures des organes lymphoïdes périphériques, entraînait une dédifférenciation des ces cellules en progéniteurs relocalisés dans la moelle osseuse. Elles sont aussi capables de dériver en lymphocytes T fonctionnels (Cobaleda et al., 2007b). Cette étude a montré aussi que ces souris développaient des lymphomes agressifs.

Néanmoins, l'expression forcée de *Pax5* dans des cellules souches hématopoïétiques ou des progéniteurs érythro-myéloïdes empêche l'engagement des cellules dans la lignée B (Anderson et al., 2007; Souabni et al., 2002). Cependant l'expression précoce de *Pax5* dans les progéniteurs lymphoïdes conduit à un fort développement de la lignée B (Cotta et al., 2003; Souabni et al., 2002). Dans un contexte développemental important, *Pax5* semble dépendre de la collaboration avec les autres facteurs de transcription pour induire la différenciation B des progéniteurs.

2.4. Régulation transcriptionnelle des cibles de PAX5

Les progéniteurs hématopoïétiques non engagés expriment les gènes de différentes lignées par un procédé connu sous le nom de « lineage priming » (Hu et al., 1997). Ce phénomène commun aux différentes lignées, permet l'orientation des cellules dans une voie spécifique suite à l'expression de gènes particuliers. Les CLP et les cellules *Pax5* *-/-* expriment non seulement des gènes lymphoïdes mais aussi une multitude de gènes érythro-myéloïdes réprimés par *Pax5* lors de l'engagement dans la lignée B (Delogu et al., 2006). Ce mécanisme pourrait être à l'origine de la reprogrammation des cellules B ayant perdu *Pax5*. Pendant l'engagement dans la lignée B, *Pax5* façonne le programme d'expression des gènes des progéniteurs lymphoïdes B en réprimant les gènes des lignées inappropriées et tout en stimulant ceux de la lignée B (Nutt et al., 1999; Nutt et al., 1998) (Figure 13).

			<u>Impliqués dans :</u>
Gènes réprimés par Pax5 dans les cellules B	<i>Ccl3</i> (MIP-1 α ; S)	<i>Cd9</i> (MIP-1 γ ; S)	<i>Ccr2</i> (R)
	<i>Ccr5</i> (R)	<i>Itgal</i> (LFA-1; R)	<i>Cd47</i> (IAP; R)
	<i>Tspan7</i> (Tm4sf2; R)	<i>Emb</i> (Embigin; R)	<i>Vav3</i> (ST)
	<i>Igf2</i> (S)	<i>Flt3</i> (Flk2; R)	<i>Ly6a</i> (Sca1; R)
	<i>Tnfrsf11</i> (OPGL; S)	<i>Csf1r</i> (M-CSFR; R)	<i>Lilrb4</i> (Gp49b; R)
	<i>Cd33</i> (Siglec-3; R)	<i>Ramp1</i> (CGRP-R; R)	<i>Fcer1g</i> (FcR- γ ; R)
	<i>Grp2</i> (Mona; ST)	<i>Lat2</i> (NTAL; ST)	<i>Lmo2</i> (TF)
	<i>Notch1</i> (R, TF)	<i>Tord</i> (R)	<i>Cd28</i> (R)
	<i>Grp2</i> (Mona; ST)	<i>Ppp3ca</i> (CnA- α ; ST)	<i>Lck</i> (ST)
	<i>Satb1</i> (TF)		
	<i>Igj</i> (J-chain; S)	<i>Sdc1</i> (CD138; R)	<i>Prdm1</i> (Blimp1; TF)
Gènes activés	<i>Cd19</i> (R)	<i>Cr2</i> (CD21; R)	<i>Fcer2a</i> (CD23; R)
	<i>Cd40</i> (R)	<i>Cd72</i> (R)	<i>Cd79a</i> (I α ; R)
	<i>Blnk</i> (SLP65; ST)	<i>Ebf1</i> (TF)	<i>Lef1</i> (TF)
	<i>C2ta</i> (CITA; TF)	<i>Aicda</i> (AID)	

Figure 13 : Cibles de Pax5. En orange, les gènes réprimés et en vert les gènes activés. En gras sont représentés les gènes qui ont été caractérisés comme des cibles directes de Pax5. Les gènes soulignés sont sous contrôle de Pax5 uniquement dans les cellules B matures. R, récepteur de surface; S, protéine sécrétée; ST, transducteur de signal intracellulaire; TF, facteur de transcription ou co activateur (Cobaleda et al., 2007b).

2.4.1. Répression

Pax5 inhibe l'expression de gènes spécifiques des lignées myéloïdes (récepteur au M-CSF) (Nutt et al., 1999) et lymphocytaires T (Notch1) (Souabni et al., 2002). Une étude de Delogu et collaborateurs a recherché les cibles de Pax5 et a identifié 110 gènes réprimés par Pax5, impliqués dans la communication intercellulaire, l'adhésion, la migration, les processus nucléaires et le métabolisme cellulaire (Delogu et al., 2006). Plus précisément, Pax5 diminue l'expression de plusieurs récepteurs de surface et de protéines de transduction du signal dans les progéniteurs précoces ou dans les différents types de cellules hématopoïétiques. Parmi les protéines de surface, on retrouve le récepteur Flt3 ou la protéine Ly6a (Sca1) qui contrôlent la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, la sous-unité Ramp1 du récepteur CGRP (calcitonin gene-related peptide) qui est impliquée dans le développement myéloïde, ou le récepteur Gp49b (lilrb4) qui est exprimé par les cellules NK (Delogu et al., 2006). Les molécules de signalisation intracellulaire comptent la molécule adaptatrice Grp2

(Mona) du récepteur des cellules T, les voies de signalisation du récepteur M-CSF et l'adaptateur transmembranaire NTAL (Lat2) des voies de signalisation des récepteurs Fc γ et Fc ϵ (Delogu et al., 2006). Pax5 réprime plusieurs voies de signalisation de transduction de diverses lignées non B, rendant ainsi les cellules B engagées insensibles aux stimulations des facteurs spécifiques d'autres lignées.

Les progéniteurs lymphoïdes altèrent leurs propriétés adhésives et migratoires durant l'engagement des cellules dans la lignée B, étant donné que les cellules pré-pro-B et pro-B sont en contact au niveau des différentes niches dans la moelle osseuse (Tokoyoda et al., 2004). En accord avec cette observation, Pax5 diminue la régulation de l'expression des chimiokines CCL3 et CCL9, du récepteur aux chimiokines CCR2 et CCR5, de la sous-unité α_L (Itgal) du récepteur aux intégrines LFA-1 ainsi que les protéines associées aux intégrines CD47 et la tetraspanine (Tm4sf2) (Delogu et al., 2006).

La répression par Pax5 des gènes des lignées non B, est cruciale pour la mise en place de la lignée B. La caractérisation de Flt3 et Csf1r, cibles directes de Pax5, indique que Pax5 est capable de médier la répression de gènes en se liant aux régions promotrices proximales (Holmes et al., 2006; Tagoh et al., 2006). En effet, l'expression forcée de Flt3 dans les cellules souches hématopoïétiques, indique que la répression de l'expression de Flt3 par Pax5 est essentielle pour la lymphopoïèse B normale.

2.4.2. Activation

L'activation des gènes spécifiques de la lignée B est la seconde fonction de Pax5 pour l'engagement des cellules (Delogu et al., 2006). L'équipe de Busslinger a identifié 170 gènes activés par Pax5 en comparant le profil d'expression de cellules Pax5 sauvages et Pax5 $^{-/-}$ (Schebesta et al., 2007). L'évaluation des données de « puces à ADN » a permis la confirmation de cibles de Pax5 telles que Cd19, Blnk, Cd79a, Lef1, Ebf1 et Bcl-x, des protéines nucléaires telles que Spib, Irf4, Irf8, Bach2, et Ikzf3 (Aiolos) qui régulent la formation du centre germinatif. De plus, leurs données ont mis en exergue l'importance du rôle de Pax5 dans le contrôle de l'adhésion des cellules B et leur migration en régulant l'expression de récepteurs membranaires et des protéines de signalisation, conduisant à un remodelage du squelette d'actine. L'identification des gènes activés par Pax5 confirme le rôle essentiel que ce facteur de transcription joue dans le contrôle de la transduction du signal des récepteurs pré-B (pré-BCR) et des récepteurs B (BCR), qui constituent des points de contrôle

importants dans le développement B (Busslinger, 2004). Il active ainsi des gènes cibles des composants essentiels des voies de signalisation des pré-BCR comme la chaîne $Ig\alpha$ de transduction du signal (appelé aussi Cd79a ou mb-1) (Fitzsimmons et al., 1996; Nutt et al., 1997), les récepteurs stimulateurs Cd19 et Cd21 (Horcher et al., 2001; Kozmik et al., 1992; Nutt et al., 1998), le récepteur inhibiteur Cd72 (Horcher et al., 2001; Ying et al., 1998) et l'adaptateur central Blnk (aussi appelé SLP65) (Schebesta et al., 2002). Pax5 semble être en interaction directe avec certains gènes, et pour d'autres, il semble qu'il ait un rôle d'activateur d'une voie de signalisation conduisant à une régulation du gène cible. En effet, dans les souris déficientes pour *Pax5*, l'expression CD19 et Blnk est diminuée, ce qui suggère une activation dépendante de Pax5. De plus, Pax5 contribue à la régulation du réseau des cellules B en activant Lef1 (Nutt et al., 1998), en maintenant l'expression de Ebf1 (Fuxa et al., 2004; Nera et al., 2006; Roessler et al., 2007) et en induisant l'expression du co-activateur CIITA (Horcher et al., 2001; Mikkola et al., 2002), qui à son tour active les gènes des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (Horcher et al., 2001).

2.5. Réarrangements des immunoglobulines dépendant de PAX5

Tant que les gènes codant les chaînes d'anticorps ne sont pas réarrangés ils ne sont pas fonctionnels. Cependant, les gènes VH sont transcrits (Yancopoulos and Alt, 1985) et cette transcription est nécessaire car elle va permettre d'apporter des modifications épigénétiques sur les histones au niveau des séquences à réarranger. En effet, les histones H3 et H4 seront acétylées (Xu and Feeney, 2009) et la lysine 4 de l'histone H3 sera diméthylée ou triméthylée (Xu and Feeney, 2009). Ces modifications vont ainsi permettre à la machinerie de recombinaison de se fixer au niveau des segments V, D ou J (Espinoza and Feeney, 2007). De plus, ces modifications apparaissent d'abord au niveau des chaînes lourdes puis des chaînes κ et enfin auprès des chaînes λ . De ce fait, ces changements épigénétiques joueraient un rôle dans la chronologie des réarrangements. Il est également important de noter que certains éléments des répertoires V, D et J sont plus fréquemment recombinaison que d'autres. Ce biais est également corrélé avec ces modifications épigénétiques (Espinoza and Feeney, 2007).

Pax5 est impliqué dans ce processus. La recombinaison D_H-J_H n'a pas besoin de Pax5 pour être réalisée en revanche, $V_H-D_HJ_H$ qui mobilise les segments V_HJ558 , nécessite Pax5.

En effet chez les souris *Pax5*^{-/-}, on constate une diminution du taux de réarrangement entre D_H - J_H et V_H J558 (Nutt et al., 1997). Ce gène est situé dans la partie distale du « cluster » des gènes V. Paradoxalement, les réarrangements V_H les plus proximaux semblent aussi accessibles que les réarrangements distaux, ce qui tendrait à prouver que Pax5 contrôle la recombinaison distale V_H - D_H J_H de la même manière que l'accessibilité de la chromatine (Hesslein et al., 2003). Cependant, dans des cellules pro-B sauvages, Pax5 induit une contraction du locus des IgH (Fuxa et al., 2004; Kosak et al., 2002), conduisant à un repliement en boucle des sous domaines individuels des IgH (Roldan et al., 2005; Sayegh et al., 2005). La contraction du locus des IgH entraîne la recombinaison V_H - D_H J_H en facilitant la formation de synapses entre les segments distaux et proximaux (Figure 14).

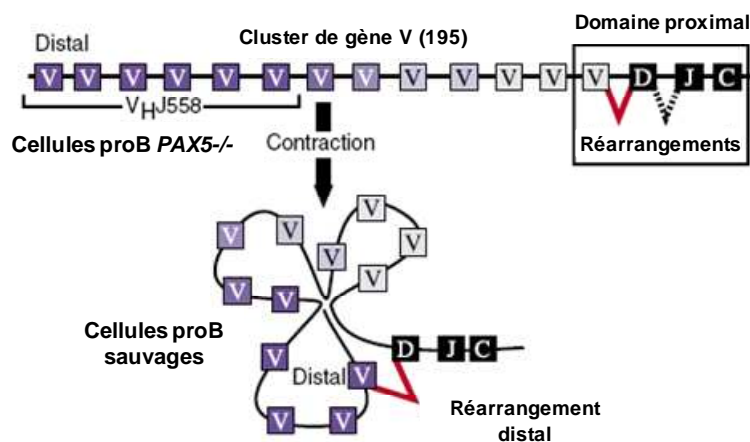


Figure 14 : Contraction du locus des IgH dans les cellules pro-B dépendant de Pax5 (Cobaleda et al., 2007b).

De plus, Pax5 recrute le complexe répresseur de l'histone méthyltransférase Ezh2 (PRC2) conduisant à des changements de la chromatine et à la formation de boucles au niveau du locus des IgH (Su et al., 2003).

La signalisation du récepteur à l'IL-7 a été proposée pour réguler l'accessibilité et le réarrangement des gènes V_H distaux, particulièrement la famille V_H J558. Cette activation mobilise la cascade de signalisation médiée par la molécule STAT5, entraînant la transmission du signal durant les étapes les plus précoces de la différenciation B. Néanmoins la fonction de Stat5 est indépendante de Pax5 dans la régulation des réarrangements des gènes V_H J558 (Bertolino et al., 2005). Pax5 est toutefois impliqué dans d'autres aspects de la régulation de la chromatine des IgH (Johnson et al., 2004). Un mécanisme clé régulant la recombinaison des gènes des immunoglobulines semble être impliqué dans les changements

de structure de la chromatine dus à une modification et/ou une substitution des histones nucléosomales. L'acétylation des histones H3 et H4 est corrélée avec cette recombinaison et elle est couramment impliquée dans l'augmentation de l'accessibilité des segments des gènes des immunoglobulines pour la transcription. Pax5 semble nécessaire et suffisant pour lever le blocage de la recombinaison V(D)J induit par la diméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (Johnson et al., 2004; Morshead et al., 2003). De plus, Pax5 agit comme un transactivateur de la recombinaison $V_H-D_HJ_H$ médiée par RAG. Il se lie directement aux régions codantes des gènes V_H et interagit physiquement avec le complexe RAG1-RAG2 qui augmente le clivage RSS (recombinaison sequence signal bordant les segments V, D, J et permettant le réarrangement des IgH) et permet la recombinaison du gène V_H (Zhang et al., 2006).

Gonda et collaborateurs ont montré que la balance entre les activités de Pax5 et d'Id2 (inhibitor of differentiation 2, protéine ayant un rôle régulateur dans la coordination de la prolifération et de la différenciation finale des cellules B) jouait un rôle clé dans l'expression d'AID (activation-induced cytidine deaminase) (Gonda et al., 2003). Les facteurs de transcription agissent sur l'expression d'AID, de manière positive pour certains gènes comme E47 (une des deux protéines codées par E2A) ou de manière négative pour d'autres comme Id2. Des données précédentes montrent que les protéines de la famille Id étaient impliquées dans la différenciation et la maturation des cellules B (Sun, 1994). Cependant, les souris Id2^{-/-} ont un répertoire de la population dans la moelle osseuse et dans la rate tout à fait normal. L'effet répresseur qu'exerce Id2 sur l'expression d'AID, est le résultat de l'inhibition de l'effet de Pax5 dans les cellules B activées. L'interaction entre Id2 et Pax5 de nature biochimique est faible et indirecte. Une telle régulation semble tout à fait possible connaissant le mécanisme de répression du gène d'AID après son activation (Honjo et al., 2004). Le locus des IgE est régulé par les principaux facteurs de transcription impliqués dans la lymphopoïèse B. Il n'est exprimé que dans les cellules activées. La régulation d'AID et du locus d'IgE semble être la même (Figure 15).

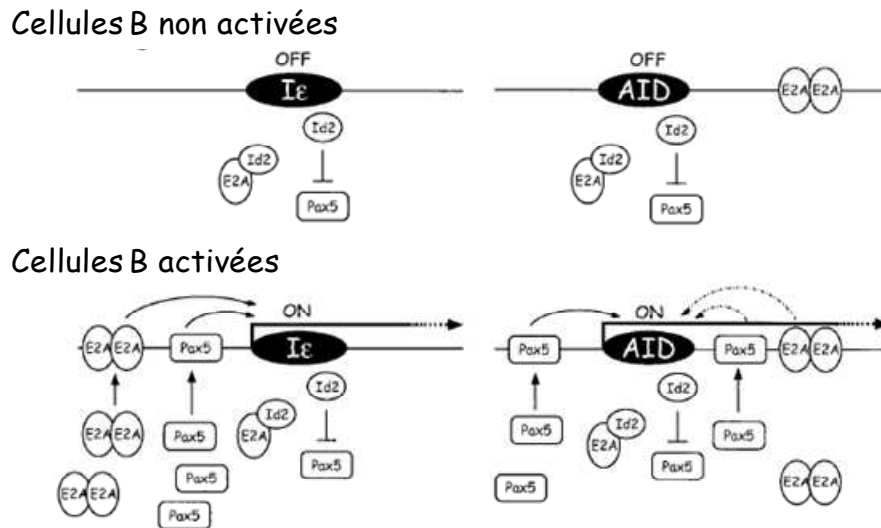


Figure 15 : Modèle de régulation d'AID et IgE par E2A, Pax5 et Id2 (Gonda et al., 2003).

2.6. Différenciation plasmocytaire

Les cellules plasmocytaires ont un rôle crucial dans la réponse immunitaire adaptative en produisant une grande quantité d'immunoglobulines solubles. Pendant leur différenciation, beaucoup de caractéristiques des cellules B sont perdues et leur structure cellulaire change pour devenir des cellules sécrétrices. Les régulateurs clés essentiels pour la différenciation, sont :

- Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1), facteur majeur, éteint le programme d'expression des gènes des cellules B (Shaffer et al., 2002) et est seul suffisant pour induire le développement des cellules plasmocytaires (Angelin-Duclos et al., 2002; Shapiro-Shelef et al., 2003).
- XBP-1 (X-box Binding Protein 1) est impliqué dans le remodelage morphologique des cellules. Il nécessite la collaboration de Blimp-1 pour la mise en place du programme plasmocytaire. Il est aussi impliqué dans la synthèse protéique totale des cellules et dans la sécrétion des anticorps produits par les plasmocytes (Shaffer et al., 2004).

Les facteurs de transcription Pax5 et Bcl-6 (B-cell lymphoma 6) sont les principaux inhibiteurs de la différenciation plasmocytaire. Pax5 inhibe l'expression de XBP-1 (Reimold et al., 1996) et Bcl-6 agit directement en inhibant l'induction de Blimp-1 (Tunayaplin et al., 2004). Il existe un rétrocontrôle négatif de Blimp-1 sur Bcl-6 et Pax5 (Lin et al., 2002) (Figure 16). Dans des cellules DT40 (chicken B cell lymphoma line) dont l'expression de Pax5 est inhibée, Nera et collaborateur ont observé une induction de Blimp-1 et de XBP-1 conduisant à la formation de plasmocytes (Nera et al., 2006). Cette étude montre le caractère essentiel de la répression de Pax5 pour la différenciation plasmocytaire. Dans le processus de transformation des cellules B en plasmocytes, la répression de Pax5 est nécessaire pour l'expression de XBP-1 ou la chaîne J (permettant la polymérisation des monomères d'immunoglobulines) associée à la sécrétion d'immunoglobulines. XBP-1 est requis pour le développement des plasmocytes fonctionnels et pour la sécrétion d'immunoglobulines (Iwakoshi et al., 2003).

Au niveau des centres germinatifs, AID donne la diversité aux anticorps. L'expression forcée de Blimp-1 dans des cellules de la lignée B de souris, montre une sous-expression d'AID via la répression de Pax5 (Shaffer et al., 2002). De plus, Bcl-6 fortement exprimé dans les centres germinatifs (Allman et al., 1996; Cattoretti et al., 1995), bloque l'expression de Blimp-1 (Reljic et al., 2000; Shaffer et al., 2000; Tunayaplin et al., 2004). En régulant la formation des centres germinatifs et l'expression de Blimp-1, Bcl-6 contribue indirectement à l'expression d'AID. Dans des cellules DT40 déficientes pour *Pax5* dans lesquelles l'expression de Bcl-6 a été restaurée, l'expression d'AID est réprimée (Nera et al., 2006) suggérant que l'expression de Bcl-6 est dépendante de celle de Pax5.

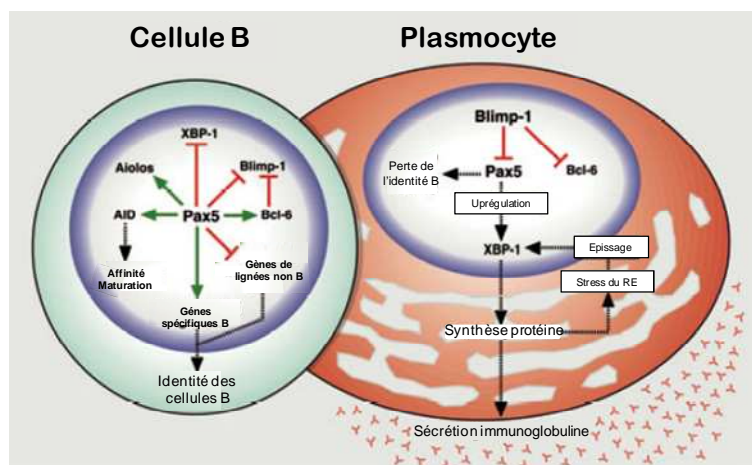


Figure 16 : Rôle de Pax5 dans l'inhibition de la différenciation des plasmocytes. Les flèches vertes représentent une activation et les flèches rouges une inhibition de l'expression du gène cible (Nera and Lassila, 2006).

3. Les leucémies aiguës lymphoblastiques B

3.1 La leucémie aiguë lymphoblastique

La leucémie aiguë est une pathologie hétérogène du système hématopoïétique caractérisée par une prolifération de cellules immatures et par un blocage de la différenciation. Elle regroupe différentes pathologies comme les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), et les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) principalement, qui diffèrent d'un point de vue morphologique, clinique, et dans la réponse aux traitements. La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est le cancer le plus fréquent chez l'enfant. Elle touche approximativement 31 enfants par million d'enfants âgés de moins de 15 ans par année aux Etats-Unis (Spector et al., *Epidemiology Cambridge* : Cambridge University Press, 2006). Chez l'adulte, cette pathologie affecte 10 cas par an par million. Le pic d'incidence principal de la maladie se situe entre 2 et 5 ans chez l'enfant et un deuxième pic est observé chez l'adulte autour de 50 ans.

La LAL de la lignée B se caractérise par une prolifération clonale et une accumulation de cellules blastiques (progéniteurs) malignes dans la moelle osseuse. Les observations faites sur le développement des leucémies aiguës lymphoblastiques B chez l'enfant de 2 à 5 ans ont donné naissance à deux hypothèses émises par des scientifiques britanniques quant à la mise en place de la maladie dépendante de pathogènes (Figure 17) :

- La première hypothèse, de Kinlen, suggère que les « clusters » de LAL chez l'enfant seraient dus à une immunité diminuée et à un agent infectieux transmis au sein d'une population (Kinlen and Petridou, 1995).
- La deuxième hypothèse, de Greaves, est basée sur un modèle à deux événements dans la mise en place de la maladie avec la présence pré-natale de clones leucémiques et la présence d'un événement secondaire déclencheur de la pathologie (Greaves, 1997).

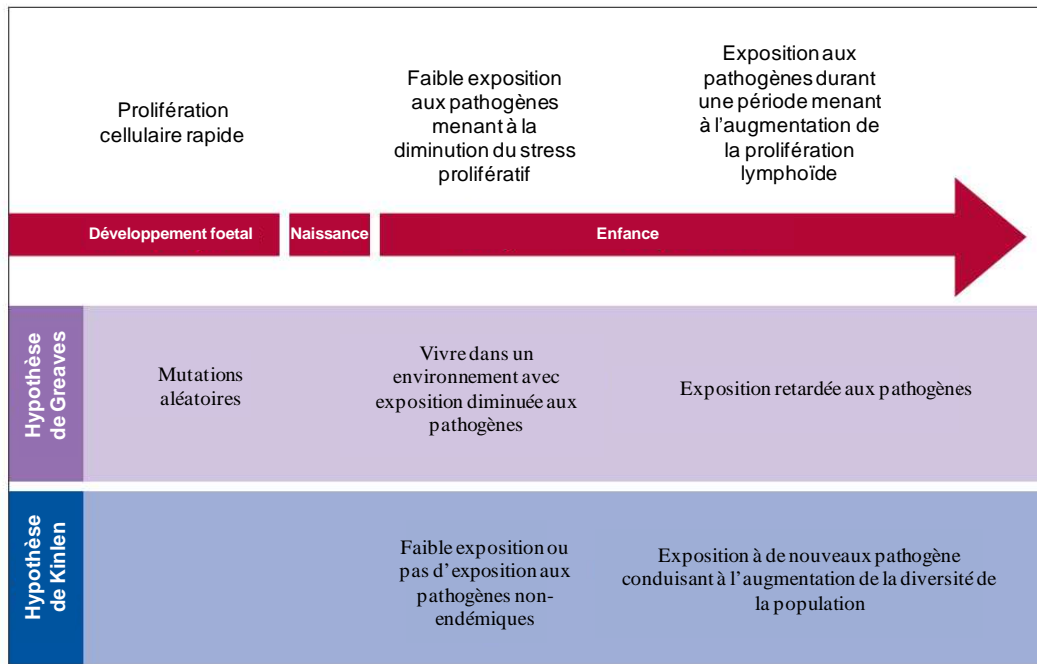


Figure 17 : Modèle de développement des leucémies basé sur l'infection par des pathogènes (pour revue, Pui et al., 2008).

Peu de choses sont connues sur les facteurs de risques entraînant une LAL-B pédiatrique, excepté l'exposition pré-natale aux rayons X et d'autres syndromes spécifiques tels que le syndrome de Down (trisomie 21) ou le syndrome de Klinefelter (présence chez des hommes, d'un chromosome X supplémentaire dont le seul signe constant est l'azoospermie liée à la sclérose des tubes séminifères et responsable de la stérilité) qui favorisent l'apparition de cette pathologie. Il existe une longue liste de facteurs ayant pour conséquence d'augmenter les risques de maladie : le sexe, l'âge, l'origine ethnique, la catégorie socio-professionnelle font partie des risques reconnus (Buffler et al., 2005), on trouve aussi les problèmes de tabac, d'alcool, de régime alimentaire, l'exposition aux pesticides ou autres solvants et une forte exposition à des champs magnétiques. De plus le facteur ethnique agit considérablement, en effet, aux Etats-Unis, les blancs ont deux fois plus de risque que les afro-américains de développer une LAL-B.

Le diagnostic des LAL-B se fait lors de la présence de plus de 20% blastes de la lignée B dans la moelle osseuse. Les classifications des LAL ont évolué. Deux classifications ont été développées. La première, la French-American-British (FAB) classification des leucémies aiguës, proposée en 1976, était couramment acceptée et utilisée en clinique (Bennett et al., 1976). Elle classe les LALs en 3 catégories basées sur la morphologie des cellules :

- L1: ce sont des petites cellules lymphoïdes dont la chromatine est homogène dans lesquelles il n'y a pas de nucléole. Le cytoplasme est faiblement représenté et le noyau est régulier. On les retrouve dans 25 à 30 % des cas,
- L2: ce sont de grosses cellules hétérogènes dont la chromatine est en dentelle. Le noyau est irrégulier, il y a des nucléoles et un cytoplasme bien important. On les retrouve dans 65 à 70 % des cas,
- L3: ce sont des grosses cellules homogènes avec une fine chromatine gravée nucléaire. Le nucléole est visible et le cytoplasme est fortement basophile et vacuolé. On les retrouve dans 5 à 10 % des cas.

La deuxième classification des LALs a été récemment proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) basée sur les différences cytogénétiques.

D'un point de vue cytogénétique, les anomalies chromosomiques acquises sont souvent retrouvées dans les blastes des patients. Plus de 80% d'enfants et 70% d'adultes atteints de LAL possèdent des caryotypes anormaux. Ces anomalies sont retrouvées chez les adultes et les enfants mais la distribution est différente. Elles peuvent être de nature numérique et structurale (translocations, délétions, inversions ou autres réarrangements impliquant des gènes à fort potentiel oncogénique, menant à la rupture de la différenciation ou des voies de signalisation et de prolifération).

Les LALs sont les résultats de nombreuses lésions génétiques importantes des progéniteurs sanguins qui différencient en cellules T ou en cellules B. Des mutations au sein de ces cellules conduisent à une capacité d'auto renouvellement important et à l'arrêt de la différenciation de ces cellules à un stage précis (Armstrong and Look, 2005; Pui et al., 2004). Afin de pouvoir distinguer les différentes cellules blastiques B, basées sur les étapes de maturation des cellules B et sur les antigènes présents à la surface des blastes, l'EGIL (European Group for the Immunological characterization of Leukemias) propose une classification en 1995 des LAL-B. Il distingue quatre groupes allant respectivement du plus immature au plus mature de B-I à B-IV (Figure 18).

	cyCD79a, CD22, CD19	CD10	μ cyto	IgK
B-I (Pro-B)	+	-	-	-
B-II (B commune)	+	+	-	-
B-III (Pré-B)	+	+	+	-
B-IV (B mature)	+	+/-	+/-	+

Figure 18 : Classification EGIL des cellules B.

3.1.1. Les anomalies moléculaires associées aux LAL-B

Les mutations apparaissant dans le génome résultent de plusieurs phénomènes. Elles ne sont pas rares, et certaines sont même spontanées, alors que d'autres sont induites (par une forte température). Ces altérations sont le résultat d'accident de réplication, dues à l'instabilité chimique des bases ou des modifications dues à l'environnement. Elles interviennent en mitose lors de la réplication pour certaines ou lors de la ségrégation chromosomique pour d'autres, de manière anarchique. Le système de réparation de l'ADN n'est pas toujours fiable, se traduisant par l'apparition d'anomalies moléculaires telles que les mutations ou les translocations. Via l'activation de gènes spécifiques, ces anomalies sont caractéristiques des leucémies humaines et en particulier les LALs.

Les anomalies constitutionnelles sont présentes dès la conception ou se forment lors des premières divisions du zygote. On distingue classiquement les anomalies de nombre qui résultent d'une anomalie de la fécondation ou d'une mauvaise répartition des chromosomes lors d'une division cellulaire, et les anomalies de structure qui impliquent une ou plusieurs cassures chromosomiques suivies d'un recollement anormal.

Les anomalies de structure sont la conséquence de cassures chromosomiques suivies par un ou plusieurs recollements anormaux. Par définition les trisomies et les monosomies partielles résultent de remaniements de structure. Elles peuvent être équilibrées ou non équilibrées. Les anomalies équilibrées n'entraînent pas de déséquilibre du matériel chromosomique et n'ont habituellement pas d'effet phénotypique. Une situation très particulière est celle où la cassure en interrompant un gène entraîne une maladie génétique correspondante. Les anomalies équilibrées peuvent entraîner, lors de la méiose, la formation de gamètes déséquilibrés donnant des zygotes anormaux, ce qui se traduira par la survenue d'avortements ou par la naissance d'enfants porteurs d'anomalies congénitales. Les anomalies non équilibrées peuvent survenir de novo (délétions, translocations non équilibrées de novo, etc...) ou être la conséquence d'un remaniement parental équilibré.

Des réarrangements du génome, notamment les translocations chromosomiques, sont retrouvés de manière récurrente dans les hémopathies malignes. Ces modifications de l'organisation du génome peuvent soit changer l'expression de gènes sans modifier leur fonction (anomalie quantitative), soit aboutir à l'expression d'une protéine de fusion possédant une partie de deux gènes réarrangés de part et d'autre des points de cassure (anomalie qualitative). Les translocations affectent souvent des gènes codant des facteurs de

transcription impliqués dans le contrôle de la différenciation cellulaire. La dérégulation de certains gènes est un mécanisme de transformation retrouvé fréquemment dans les leucémies aiguës. On distingue différents types d'anomalies :

- Des translocations réciproques (t) : ces translocations sont dues à des échanges de segments chromosomiques entre deux chromosomes, les points de cassure s'étant produits ailleurs que dans les régions juxta-centromériques des acrocentriques (chromosome avec un centromère situé près d'une extrémité).
- Des délétions (del) : elles résultent d'une cassure chromosomique avec perte du segment distal (délétion terminale), ou de deux cassures sur un même bras chromosomique avec perte du segment intercalaire (délétion intercalaire). Les délétions terminales supposent un mécanisme de restitution d'un télomère pour assurer la stabilisation du chromosome.
- Des inversions (inv) : elles sont dues à deux cassures sur le même chromosome, suivies de recollement après inversion du segment intermédiaire. Elles sont dites péricentriques si le centromère est compris dans le segment intermédiaire. Elles sont dites paracentriques si les deux cassures se sont produites sur le même bras chromosomique.

Dans environ 40% des LAL-B, on retrouve une des quatre translocations récurrentes conduisant à une modification de la fonction des gènes localisés au point de cassure des chromosomes : BCR-ABL1, les réarrangements de MLL, TEL-AML1 et E2A-PBX1. Ces anomalies moléculaires ne sont pas retrouvées dans les mêmes proportions dans les LAL-B de l'enfant et de l'adulte suggérant des pathologies différentes chez ces deux groupes. Chez l'enfant TEL-AML1 est retrouvée dans $\frac{1}{4}$ des cas alors qu'elle ne représente que 2% chez l'adulte. Inversement, le chromosome de Philadelphie, BCR-ABL1, est présent dans $\frac{1}{4}$ des cas chez l'adulte alors que 3% des enfants sont atteints. L'installation d'une leucémie aiguë nécessite schématiquement au moins deux évènements, un blocage de la différenciation lié à une mutation d'un facteur de transcription et une prolifération incontrôlée, résultat de la dérégulation d'une kinase intervenant dans le cycle cellulaire. Les translocations récurrentes dans cette pathologie ne sont pas équivalentes en fonction, certaines affectent des facteurs de transcription qui auront un effet sur le blocage de la différenciation des cellules B tandis que

d'autres altèrent des kinases ou autres molécules qui déréguleront le cycle cellulaire. On trouve aussi des anomalies dites numériques qui affectent le nombre de chromosome.

3.1.2. Anomalies affectant les facteurs de transcription

3.1.2.1. Les réarrangements MLL

Le gène *MLL* est localisé sur le chromosome 11 en q23. Il code une protéine de 3910 acides aminés, contenant des séquences d'homologies avec les gènes de la drosophile. *MLL* a été identifié réarrangé avec plus de 60 partenaires dans les leucémies aiguës (Meyer et al., 2009). La translocation t(4;11)(q21;q23) est la plus fréquente des réarrangements *MLL* dans les LAL-B. Cette translocation juxtapose *MLL* avec le gène *AF4* sur le chromosome 4. Le gène *MLL* code une histone méthyltransférase (HMT) impliquée dans la régulation épigénétique de la transcription de gènes tels que *HOXs*, étape critique pour le développement embryonnaire normal et l'hématopoïèse. Les gènes *HOXs* sont eux-mêmes impliqués dans la transformation maligne des progéniteurs hématopoïétiques. Les réarrangements chromosomiques impliquant *MLL* sont en particulier associés avec les LALs chez l'enfant de moins de 1 an (85%). Ces enfants ont souvent un immunophénotype pro-B (CD10 -), avec un fort taux de globules blancs, une organomégalie et des atteintes du SNC, associés avec un mauvais pronostic. Les protéines chimères *MLL* se fixent sur leurs cibles au niveau de l'ADN. Les effets nucléaires dus à l'activation des cibles de *MLL* sont associés à l'activité effectrice transcriptionnelle et/ou en recrutant des co-facteurs transcriptionnels (Hox, Pbx, Meis1, EphA7). Le rôle potentiel des inhibiteurs de l'histone désacétylase et de l'ADN méthyltransférase est important dans le traitement des leucémies impliquant les réarrangements de *MLL*. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer définitivement leur activité et poursuivre l'étude des cibles pour évaluer leur effet thérapeutique. La compréhension de la leucémogénèse induite par *MLL* pourraient aboutir à des améliorations significatives dans la prise en charge des patients (Liedtke and Cleary, 2009).

3.1.2.2. TCF3-PBX1, t(1;19)(q23;p13)

Cette translocation décrite en 1984, est fortement associée avec un immunophénotype pré-B et des blastes exprimant des immunoglobulines cytoplasmiques en grande quantité. Dans les LAL-B de l'enfant, elle est récurrente, retrouvée en général dans 5 à 6% des cas. L'incidence est similaire chez l'adulte. La translocation t(1;19)(q23;p13) juxtapose le gène *TCF3* (*E2A*) sur le chromosome 19 au gène *PBX1* sur le chromosome 1 pour former le gène de fusion *TCF3/PBX1*. La protéine chimère conduit à un arrêt de la différenciation cellulaire. On note la présence de deux formes t(1;19)(q23;p13) (équilibrée) et der(19) t(1;19)(q23;p13) (déséquilibrée) (Secker-Walker et al., 1992). Cette chimère possède des rôles importants dans l'engagement des cellules progénitrices lymphocytaires dans le programme de différenciation B. Leur dérégulation conduit à un arrêt de la différenciation des cellules. La localisation nucléaire constitutive de E2A-PBX1 pourrait altérer le profil d'expression des gènes cibles de HOX/PBX. C'est la réduction de l'activité de E2A qui contribuerait au développement de la leucémogénèse (Aspland et al., 2001).

Dans les LAL-B, une translocation rare t(17;19)(q22;p13) impliquant *TCF3* a été décrite, laquelle fusionne *TCF3* au gène de *HLF* facteur de transcription leucine zipper localisé sur le chromosome 17. Le gène de fusion *TCF3/HLF* jouerait un rôle dans la suppression du programme de mort cellulaire (Hunger et al., 1992). L'inversion cryptique du chromosome 19, inv(19)(p13;q13), a été reporté aussi avec la fusion *TCF3/FBI*.

3.1.2.3. TEL-AML1, t(12;21)(p13;q22)

Cette translocation entre le bras court du chromosome 12 et le bras long du chromosome 21, a été décrite pour la première fois en 1994 (Romana et al., 1994). Elle implique le gène *TEL* (*ETV6*) en position 12p13 et *AML* (*RUNX1*) en 21q22 formant le gène de fusion *TEL/AML1*. Le diagnostic est basé sur une analyse moléculaire (PCR) du fait de la difficulté à détecter cette anomalie en cytogénétique conventionnelle (FISH) (Romana et al., 1995). La translocation t(12;21) est une anomalie récurrente dans les LAL-B de l'enfant (25% des cas). L'incidence est plus faible chez l'adulte seulement 1 à 3% des cas de LAL-B, celle-ci n'est pas retrouvée après 25 ans. Elle a été détectée chez des fillettes jumelles dont une seule a développé une leucémie (Ford et al., 1998).

Cette translocation a fait l'objet d'études fonctionnelles *in vitro*, cherchant à comprendre le mécanisme de leucémogénèse associé à cette protéine chimérique. L'équipe de Greaves a montré que la chimère issue de la translocation TEL-AML1 dérégulait la voie de signalisation du TGF- β dans les pro-B. La protéine chimère se lie à la principale cible du TGF- β et

empêche l'activation des cibles promotrices. Leurs données suggèrent qu'un mécanisme plausible issu d'une dérégulation du système immunitaire en réponse à une infection, pourrait conduire à l'évolution maligne de clones préleucémiques exprimant TEL-AML1 (Ford et al., 2009).

3.1.3. Anomalies affectant le cycle cellulaire

La translocation t(9;22)(q34;q11) entre le chromosome 9 et le chromosome 22, conduit à la formation du chromosome de Philadelphie (BCR-ABL1). Cette anomalie est caractéristique des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) mais elle est fréquemment retrouvée dans les LALs. La séquence 3' du proto oncogène *ABL1* situé en 9q34 juxtapose la séquence 5' du gène *BCR* située en 22q11, menant à la création d'un gène hybride *BCR/ABL1* (Radich et al., 1994; Tkachuk et al., 1990). Il existe différentes formes de cette protéine chimère : p190, p210 et p230 entre autres. La protéine p190 est la forme majoritaire des LAL-B. L'activation de la prolifération due à la chimère BCR-ABL1 va dépendre des Rac-GTPases, point de départ des autres cascades agissant sur la survie et la prolifération cellulaire (pour revue, Thomas et al., 2008). BCR-ABL1 était associé à un très mauvais pronostic. Récemment, un inhibiteur spécifique a été développé afin de bloquer l'activité tyrosine kinase (TK) de BCR-ABL1, l'imatinib (commercialisé sous le nom de Glivec®) (Deininger et al., 2005). Cette molécule agit comme un inhibiteur de l'activité TK en entrant en compétition avec la protéine chimérique. L'association de cet inhibiteur à la chimiothérapie améliore fortement le pronostic de la maladie.

3.1.4. Anomalies numériques

Il est difficile de préciser les mécanismes transformant mis en jeu par ce type d'anomalies numériques car ces mécanismes se produisent lors des recombinaisons chromosomiques conduisant au gain ou à la perte de matériel pouvant affecter des gènes impliqués soit dans la prolifération soit dans la différenciation. Il n'existe pas d'anomalies récurrentes.

3.1.4.1. Hyperdiploïdie (>50 chromosomes)

L'hyperdiploïdie (51 à 65 chromosomes) dans les LALs de l'enfant est l'anomalie numérique la plus fréquente, retrouvée dans approximativement 30% des cas. L'incidence est plus faible dans les LALs de l'adulte (9%). Il a été montré en 1978 que l'hyperdiploïdie était associée à un bon pronostic, avec une survie à 5 ans supérieure à 80% chez l'enfant. Cette anomalie est associée à un bon pronostic dans les LALs de l'adulte, avec une survie sur 3 ans d'environ 59%.

On distingue deux sous groupes d'hyperdiploïdie dans les LALs de l'enfant avec différents impacts sur le devenir de la pathologie, les patients ayant de 51 à 55 chromosomes (survie à 5 ans de 72%) et les patients ayant de 56 à 67 chromosomes (survie à 5 ans de 86%) (Raimondi et al., 1996). Le gain de matériel chromosomique dans les hyperdiploïdies apparaît être restreint à certains chromosomes comme le 4, 6, 10, 14, 17 (Harris et al., 1992; Heerema et al., 2000; Jackson et al., 1990). Parmi les patients adultes atteints de LAL, 50% des hyperdiploïdies présentent des anomalies chromosomiques structurelles additionnelles dont l'association fréquente avec le chromosome de Philadelphie et d'autres translocations récurrentes (1996).

3.1.4.2. Hypodiploïdie (<45 chromosomes)

L'hypodiploïdie correspond à des caryotypes de 45 chromosomes ou moins. La perte entière de morceaux de chromosomes n'est pas toujours nécessaire à la production de caryotype hypodiploïde car le changement du nombre de chromosome peut se faire suite à la formation de chromosome dicentrique ou de réarrangements déséquilibrés.

L'haploïdie partielle est une anomalie dont le caryotype compte entre 23 et 29 chromosomes, elle représente une anomalie numérique rare dans les LALs, avec une incidence de 0,7 à 2,4%. Elle est associée à un mauvais pronostic et une médiane de survie de 11 mois. Les métaphases de l'haploïdie partielle conservent d'habitude les deux chromosomes sexuels et gagnent préférentiellement du matériel génétique sur les chromosomes 10, 14, 18 et 21, à la manière des hyperdiploïdies.

D'autres groupes d'hypodiploïdie sont décrits. Les cas ayant 45 chromosomes représentent le plus grand groupe d'hypodiploïdie. Les patients possèdent un pronostic intermédiaire, qui semble dépendre du type d'anomalies chromosomiques associées. Par exemple chez l'adulte la monosomie 7 est associée à un mauvais pronostic. Les clones contenant entre 33 et 44 chromosomes sont rarement retrouvés dans des LALs, ils représentent 0,8% des cas mais les

patients ont un mauvais devenir chez l'enfant et l'adulte. Dans ces pathologies, les méthodes moléculaires et la cytogénétique jouent un rôle critique dans la détection des changements numériques afin d'administrer la thérapie adéquate pour ces patients.

3.2. Oncogenèse lymphoïde médiée par PAX5

L'expression de *PAX5* est finement régulée tout au long de la différenciation B. Les mutations et les modifications d'expression de ce facteur de transcription entraînent des pathologies empêchant la différenciation plasmocytaire ou bloquant les cellules B aux stades les plus précoces du développement B.

3.2.1. IGH-PAX5

La translocation $t(9;14)(p13;q32)$ juxtapose le gène *PAX5* sous le contrôle de l'enhancer μ de la chaîne lourde des immunoglobulines (Busslinger et al., 1996) (Figure 19). Le processus de maturation des immunoglobulines dans les cellules B du centre germinatif, peut conduire à des mutations oncogéniques ou des translocations chromosomiques. Des mutations résultantes des SHM aberrantes ciblant l'exon 1B de *Pax5*, sont retrouvées dans des tumeurs des cellules B du centre germinatif dans des lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC). Néanmoins ces mutations ne semblent pas contribuer à la formation du lymphome (Pasqualucci et al., 2001). Au contraire, la translocation $t(9;14)(p13;q32)$ semble être la conséquence d'un défaut dans la CSR. Cette anomalie chromosomique est retrouvée dans 2% des lymphomes B non-Hodgkinien (Poppe et al., 2005) et plus précisément dans des lymphomes lymphoplasmocytaires (LPL). Cette translocation fut décrite dans la lignée KIS-1 établie à partir d'un patient atteint de lymphome diffus à grandes cellules (Ohno et al., 1990). L'étude de cette lignée a permis de démontrer que la partie codante de *PAX5* était mise sous le contrôle de l'enhancer fort du locus de la chaîne lourde des immunoglobulines. La protéine de fusion issue de cette translocation, conduit à une sur-expression de *PAX5* lors de la différenciation terminale empêchant les cellules B matures de se différencier en plasmocytes.

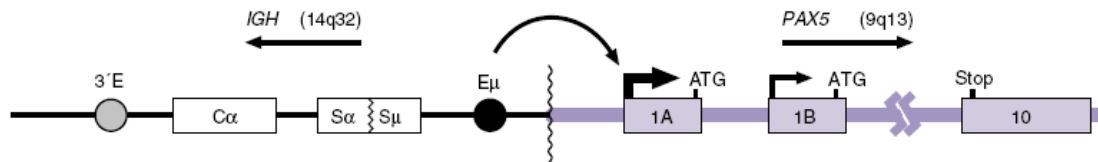


Figure 19 : Translocation PAX5-IGH modélisée (pour revue, Cobaleda et al., 2007b).

Afin d'engendrer un modèle animal de cette pathologie, une souris knock in (KI) a été construite en insérant le minigène *Pax5* dans le locus d'IgH (Souabni et al., 2007). Ces animaux développaient des lymphomes T lymphoblastiques agressifs. L'expression de *Pax5* dans les thymocytes active des gènes spécifiques de la lignée B et réprime des gènes lymphoïdes T, suggérant une contribution de Pax5 dans la lymphomagenèse en dérégulant le programme de l'expression des gènes des cellules T.

3.2.2. PAX5 dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de type B

Les LAL-B sont le premier cancer de l'enfant, elles représentent 80% des leucémies pédiatriques. Une étude du contenu génomique de 192 LAL-B et 50 LAL-T de l'enfant à l'aide de « puces à ADN » à très haute densité et par séquençage a montré que 39% des LAL-B de l'enfant ont une mutation du gène *PAX5* (Mullighan et al., 2007). Les mutations de *PAX5* sont variées et peuvent être classées en deux grandes catégories :

- des mutations dites hypomorphes caractérisées par un déficit de fonction de la protéine PAX5 mutante résultant de sa fusion avec différents partenaires, de mutations ponctuelles, de délétions ou d'amplifications partielles (39/192, 20 %) ;
- des délétions complètes du gène, aboutissant théoriquement à une diminution de l'expression des protéines PAX5 normales (21/192, 11 %).

3.2.2.1. Les translocations impliquant PAX5

Les translocations associées aux pathologies hématologiques impliquant *PAX5* mettent en évidence son double rôle. D'une part, la translocation t(9;14)(p13;q32) retrouvée dans des lymphomes non-hodgkiniens, juxtapose l'enhanceur du gène *IGH* au promoteur de *PAX5* conduisant à la surexpression de la protéine PAX5 normale. Cette translocation illustre

l'importance d'éteindre *PAX5* pour la différenciation terminale B. Dans les LAL-B, les cellules B sont bloquées à un stade précoce de la différenciation. Des gènes de fusion impliquant *PAX5* (translocation de la bande p13 du chromosome 9, 9p13) ont été identifiés comme HIPK1 (bande 1p13) (Nebral et al., 2009), LOC392027 (7p12.1) (An et al., 2008), AUTS2 (7q11.1) (Coyaud et al., 2010), POM121 (7q11) (Nebral et al., 2009), ELN (7q11) (Bousquet et al., 2007), JAK2 (9p24) (Nebral et al., 2009), SLCO1B3 (12p12) (An et al., 2008), DACH1 (13q21) (Nebral et al., 2009), PML (15q24) (Nebral et al., 2007), ZNF521 (18q11.2) (Mullighan et al., 2007), FOXP1 (3p14.1) (Mullighan et al., 2007), ASXL1 (20q11.1) (An et al., 2008), C20orf112 (20q11.1) (An et al., 2008), KIF3B (20q11.21) (An et al., 2008) et BRD1 (22q13) (Nebral et al., 2009). Les protéines chimériques testées agissent comme des répresseurs constitutifs de l'allèle restant de *PAX5*, expliquant ainsi le blocage de la différenciation B.

Il a été rapporté que le gène *PAX5* était la cible la plus fréquente de mutations somatiques dans les LAL-B de l'enfant, étant altéré dans 38,9% des cas. Ces mutations peuvent être des délétions hémizygotiques partielles ou complètes, des délétions homozygotiques, des amplifications partielles ou complètes, des mutations ponctuelles ou des translocations. Certains de ces mutants ont un rôle dominant négatif sur *PAX5* sauvage (Bousquet et al., 2007).

En 2007, Notre groupe a isolé une nouvelle translocation t(7;9)(q11;p13) dans deux cas de LAL-B adultes fusionnant *PAX5* au gène de l'élastine (*ELN*) (Bousquet et al., 2007). Cette translocation, isolée, équilibrée et récurrente, conduit à la juxtaposition du domaine PBD de *PAX5* avec la quasi-totalité de *ELN*. *ELN* localisé en 7q11.2 code une protéine insoluble de la matrice extracellulaire de 72kDa qui constitue le composant principal des fibres élastiques nécessaires à l'élasticité de la peau, des vaisseaux sanguins, du cœur, des poumons, des intestins, des tendons et des ligaments. *PAX5* perd dans cette fusion les domaines de transactivation et de répression transcriptionnels. *PAX5-ELN* a un rôle de transdominant négatif sur la fonction de *PAX5* sauvage et en particulier interfère dans la transcription de gènes nécessaires à la différenciation et au contrôle de la prolifération des lymphocytes B précoces. Cette chimère est retrouvée dans le noyau des cellules. Des expériences de CHIP ont montré que *PAX5-ELN* pouvait se lier aux cibles de *PAX5*, Cd19 et Blnk.

Le chromosome dicentrique dic(9;12)(p13;p13) (translocation chromosomique caractérisée par la présence de deux centromères sur le chromosome pathologique) retrouvé dans des LAL-B fusionne *PAX5* à TEL (*ETV6*) conduisant à l'expression d'une protéine de fusion (Cazzaniga et al., 2001; Strehl et al., 2003). TEL est un membre de la famille de

facteurs de transcription ETS contenant un domaine HLH (hélice boucle hélice) de dimérisation et un domaine ETS de liaison à l'ADN. TEL possède une expression ubiquitaire et joue un rôle important dans l'angiogenèse vitelline et l'hématopoïèse médullaire. La protéine de fusion contient à la fois le domaine PBD de liaison à l'ADN de PAX5 et les domaines HLH et ETS de TEL. Cette chimère a une localisation nucléaire du fait de la conservation de la séquence de localisation nucléaire de TEL. Il semblerait que PAX5-TEL agirait comme un répresseur fonctionnel en se liant sur les cibles de PAX5. Une étude fonctionnelle de la chimère a montré un effet dominant négatif sur PAX5 sauvage. Cette chimère interférerait dans les processus de différenciation B en sous exprimant le CD45R, conduisant à une perte de l'identité B, permettant la migration grâce à la cytokine CXCL12 et entraînant une résistance à l'apoptose en résistant au TGFβ1, cytokine antiproliférative et proapoptotique (Fazio et al., 2008).

3.2.2.2. Les autres mutations affectant PAX5

3.2.2.2.1. Mutations ponctuelles de PAX5

Des mutations ponctuelles de PAX5 ont été retrouvées dans l'étude de Downing chez 14 patients (7 %) et sont localisées soit dans le domaine de liaison à l'ADN, soit dans l'homéodomaine, soit dans le domaine de transactivation (Mullighan et al., 2007).

3.2.2.2.2. Délétions et amplifications partielles de PAX5

La haute résolution de l'analyse génomique de Downing et al. démontre que la cible principale des délétions est PAX5 (Mullighan et al., 2007). En effet, des délétions partielles de PAX5 sont retrouvées dans 32 cas, aboutissant soit à l'expression d'une protéine incomplète dans 23 cas (hypomorphes), soit à une absence d'expression du fait de la délétion des promoteurs ou de la région polyA dans 9 cas. Dans ces derniers cas, ces délétions peuvent être dues à une translocation déséquilibrée (4 cas). Un cas d'amplification partielle est retrouvé.

3.2.2.2.3. Délétions totales de PAX5

Dans l'étude de Mullighan, l'altération du nombre de copies de PAX5 est retrouvée dans 52 LAL-B de l'enfant sur 192 (27 %) (Mullighan et al., 2007). Les délétions complètes d'un allèle de PAX5 sans mutation de l'autre allèle sont retrouvées dans 21 cas (11 %). Ces altérations ont pour conséquence une haploinsuffisance de PAX5, dont la conséquence

pathologique est difficile à déterminer du fait que les souris hétérozygotes pour la délétion de PAX5 sont apparemment normales (Urbanek et al., 1994). L'effet de cette délétion pourrait être lié dans ces cas à la délétion combinée d'autres gènes, en particulier CDKN2A et CDKN2B (Kamb et al., 1994a; Kamb et al., 1994b; Nobori et al., 1994).

Chapitre II :

Résultats expérimentaux

Objectif du travail

PAX5 gardien de l'identité B, est essentiel pour le maintien des cellules dans la lignée B. D'où le maintien des cellules dans la lignée B par ce gène en fait une cible privilégiée dans la leucémogénèse. Une étude du groupe de J. Downing parue en 2007 dans *Nature*, a évalué le contenu génomique de 192 LAL-B et 50 LAL-T de l'enfant à l'aide de puces à ADN à très haute densité. Cette étude montre que PAX5 est mutée dans 31 % des cas de LAL-B pédiatriques. Outre les translocations, de nouvelles mutations de *PAX5* ont été identifiées dans les LAL-B de l'enfant, consistant soit en des délétions plus ou moins complètes de gènes, soit en des mutations ponctuelles (St. Jude Children's Research Hospital) (Mullighan et al., 2007).

Partant de l'hypothèse que les LAL-B de l'enfant et de l'adulte sont des pathologies différentes, elles peuvent avoir des causes et des pronostiques différents. En effet, la répartition des anomalies moléculaires ne sont pas les mêmes et des variations existent dans les réponses aux traitements. Il est alors intéressant de vérifier si les mutations de *PAX5* sont également retrouvées de façon fréquente dans les LAL-B de l'adulte chez des patients du protocole clinique GRAALL03 (Group of Reseach on Addult Acute Lymphoblastic Leukemia).

Les mécanismes transformant associés aux mutations de *PAX5* dans les LAL-B ne sont pas clairement identifiés. Il semble, comme nous l'avons montré pour PAX5-ELN, que les formes mutantes peuvent jouer un rôle transdominant négatif sur PAX5 sauvage, bloquant ainsi la différenciation B. Le rôle des différents mutants de *PAX5* va être étudié et va évaluer leur impact précis dans la mise en place de la pathologie. Le modèle *ex vivo* mis en place au laboratoire va permettre une expertise de l'impact des différents mutants sur la différenciation B.

**1. PAX5 est fréquemment muté dans
les LAL-B de l'adulte (étude du
GRAALL03)**

Article 1: PAX5 mutations occur frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and PAX5 haploinsufficiency is associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 fusion genes: a GRAALL study.

J Familiades, M Bousquet, M Lafage-Pochitaloff, M-C Béné, K Beldjord, J De Vos, N Dastugue, E Coyaud, S Struski, C Quelen, N Prade-Houdellier, S Dobbelstein, J-M Cayuela, J Soulier, N Grardel, C Preudhomme, H Cavé, O Blanchet, V Lhéritier, A Delannoy, Y Chalandon, N Ifrah, A Pigneux, P Brousset, EA Macintyre, F Huguet, H Dombret, C Broccardo and E Delabesse

L'étude a été réalisée à partir du matériel génomique de 117 patients adultes qui ont développé une leucémie aiguë lymphoblastique de type B (LAL-B). Ces patients sont inclus dans deux protocoles cliniques : GRAALL03 pour Group of Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (LAL-B, BCR-ABL1-négatif) et GRAAPH03 (LAL-B, BCR-ABL1-positif). Une étude analogue réalisée chez des enfants atteints de LAL-B, a caractérisé des mutations somatiques du gène *PAX5* dans 38,9% des cas. L'équipe de Downing a identifié différents types de mutations de *PAX5* que ce soient des mutations ponctuelles, des translocations ou des délétions dites hémizygotiques (Mullighan et al., 2007). L'ADN génomique des patients du protocole clinique GRAALL03 m'a permis de quantifier le nombre de copies de *PAX5* sur chacun de ses 10 exons et ainsi déterminer sur une cohorte adulte assez large, le taux d'anomalies numériques affectant ce gène. L'utilisation de contrôles internes a permis une normalisation de ces résultats. La conservation des 2 allèles a été normalisée à 100%, la perte d'un seul allèle à 50% et la présence de multi copies de ce gène supérieur à 100%. J'ai recherché aussi la présence de mutations ponctuelles par séquençage. J'ai montré que *PAX5* était la cible préférentielle de mutations dans 34% des cas de LAL-B de l'adulte

Les mutations de *PAX5* ont permis de classer les patients en 4 groupes d'étude : le groupe de patients *PAX5* normal avec 2 copies du gène, le groupe des patients ayant perdu l'un des deux allèles de *PAX5*, le groupe des patients ayant des modifications de *PAX5* sur au moins un allèle (mutations ponctuelles, délétions, translocations) et le groupe des patients présentant une amplification de *PAX5*. A partir de ces premiers résultats, j'ai pu m'intéresser à la caractérisation plus précise des différentes mutations de *PAX5*.

Le groupe des modifications de *PAX5* est le plus hétérogène. En effet, il regroupe les mutations ponctuelles, les délétions partielles et les translocations.

J'ai effectué le séquençage de chaque exon de *PAX5* des 117 patients inclus dans l'étude. Huit mutations ponctuelles ont été identifiées dont une récurrente, P80R qui est également retrouvée chez l'enfant. La vérification des mutations partielles a été quant à elle réalisée par PCR sur les ADN complémentaires disponibles. Une seule translocation a été identifiée, *PAX5-ELN*, précédemment décrite par notre équipe (Bousquet et al., 2007).

L'analyse des données cliniques a permis de mettre en évidence le caractère secondaire de la perte d'un allèle de *PAX5* dans la mise en place de la pathologie. Afin de tester cette hypothèse, à l'aide d'une analyse de caryotype par FISH, la translocation E2A-PBX1 présente chez un patient, était retrouvée dans 100% des cellules alors que la délétion d'une copie de *PAX5* n'était présente que dans 60% des cellules. Le caractère unique de cette étude est l'association qu'il existe entre la délétion totale d'un allèle de *PAX5* et *BCR-ABL1*, et le fait que les mutations ponctuelles ne soient jamais associées avec des translocations récurrentes.

ORIGINAL ARTICLE

PAX5 mutations occur frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and PAX5 haploinsufficiency is associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 fusion genes: a GRAALL study

J Familiades^{1,2,18}, M Bousquet^{1,2,18}, M Lafage-Pochitaloff³, M-C Béné⁴, K Beldjord⁵, J De Vos^{6,7}, N Dastugue^{1,8}, E Coyaud^{1,2}, S Struski⁸, C Quelen^{1,2}, N Prade-Houdellier^{1,2}, S Dobbstein⁸, J-M Cayuela⁹, J Soulier⁹, N Grardel¹⁰, C Preudhomme¹⁰, H Cavé¹¹, O Blanchet¹², V Lhéritier¹³, A Delannoy¹⁴, Y Chalandon¹⁵, N Ifrah¹², A Pigneux¹⁶, P Brousset^{1,2,17}, EA Macintyre⁵, F Huguet⁸, H Dombret⁹, C Broccardo^{1,2,18} and É Delabesse^{1,2,8,18}

¹INSERM U563, Toulouse, France; ²Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France; ³Department of Genetics, CHU Timone, Marseilles, France; ⁴Department of Immunology, CHU Nancy, Nancy, France; ⁵Department of Hematology, CHU Necker, Paris, France; ⁶INSERM U847, Montpellier, France; ⁷Biothérapie des cellules souches normales et cancéreuses, Université Montpellier I, Montpellier, France; ⁸Department of Hematology, CHU Toulouse, Toulouse, France; ⁹Department of Hematology, CHU Saint-Louis, Paris, France; ¹⁰Department of Hematology, CHU Lille, Lille, France; ¹¹Department of Genetics, CHU Robert-Debré, Paris, France; ¹²Department of Hematology, CHU Angers, Angers, France; ¹³GRAALL, CHU Lyon, Lyons, France; ¹⁴Department of Hematology, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium; ¹⁵Division of Hematology, Hôpital Universitaire, Geneva, Switzerland; ¹⁶Department of Hematology, CHU Bordeaux, Bordeaux, France and ¹⁷Department of Pathology, CHU Toulouse, Toulouse, France

Adult and child B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) differ in terms of incidence and prognosis. These disparities are mainly due to the molecular abnormalities associated with these two clinical entities. A genome-wide analysis using oligo SNP arrays recently demonstrated that PAX5 (paired-box domain 5) is the main target of somatic mutations in childhood BCP-ALL being altered in 38.9% of the cases. We report here the most extensive analysis of alterations of PAX5 coding sequence in 117 adult BCP-ALL patients in the unique clinical protocol GRAALL-2003/GRAAPH-2003. Our study demonstrates that PAX5 is mutated in 34% of adult BCP-ALL, mutations being partial or complete deletion, partial or complete amplification, point mutation or fusion gene. PAX5 alterations are heterogeneous consisting in complete loss in 17%, focal deletions in 10%, point mutations in 7% and translocations in 1% of the cases. PAX5 complete loss and PAX5 point mutations differ. PAX5 complete loss seems to be a secondary event and is significantly associated with BCR-ABL1 or TCF3-PBX1 fusion genes and a lower white blood cell count. *Leukemia* (2009) 23, 1989–1998; doi:10.1038/leu.2009.135; published online 9 July 2009

Keywords: BCP-ALL; oncogenesis; BCR-ABL1; PAX5; TCF3-PBX1

Introduction

PAX5 (paired-box domain 5) is the guardian of the B-cell identity as stated in a recent review.¹ This transcription factor belongs to the family of paired-box domain transcription factors.² Its expression is initiated during early stages of B-cell differentiation beginning at the pro-B stage,³ and is turned off to

allow terminal B-cell differentiation.⁴ The *Pax5* homozygous deletion in murine models leads to the trans- or de-differentiation of B-cells into several other hematopoietic cell lineages.^{5–7} *PAX5* is thus involved both in the maintenance of B-cell identity and in the control of terminal B-cell differentiation.

Deregulations and mutations of key differentiation factors are frequently found in lymphomas and leukemias. Translocations associated with hematologic malignancies involving *PAX5* exemplify *PAX5* dual function. On one hand, the t(9;14)(p13;q32) translocation brings the potent enhancer of the *IGH* gene close to the *PAX5* promoter leading to an aberrant expression of a normal *PAX5* protein.^{8,9} This translocation is recurrent in small plasmacytoid B-cell lymphocytic lymphomas and diffuse large B-cell lymphomas.¹⁰ It emphasizes the importance of *PAX5* downregulation during terminal B-cell differentiation.⁹ On the other hand, *PAX5* translocations have also been associated with a block of early B-cell differentiation because the *PAX5*-ETV6 chimeric protein, product of the dic(9;12)(p13;p13), is associated with B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL).¹¹ Additional *PAX5* fusion partner genes have been identified as *HIPK1* (chromosomal band 1p13),^{12–14} *LOC392027* (7p12.1),¹⁵ *AUTS2* (7q11.1),¹³ *POM121* (7q11),¹⁴ *ELN* (7q11),¹⁶ *JAK2* (9p24),¹⁴ *SLCO1B3* (12p12),¹⁵ *DACH1* (13q21),¹⁴ *PML* (15q24),¹⁷ *ZNF521* (18q11.2),¹² *ASXL1* (20q11.1),¹⁵ *C20orf112* (20q11.1),^{13–15} *KIF3B* (20q11.21)¹⁵ and *BRD1* (22q13).¹⁴ *PAX5*-*ELN*,¹⁶ *PAX5*-*FOXPI1*¹² and *PAX5*-*ETV6*¹² act as constitutive repressors of the remaining *PAX5* allele product, explaining the block of B-cell differentiation.

To further emphasize the function of *PAX5* in B-cell differentiation and oncogenesis, it has recently been reported that the *PAX5* gene is the most frequent target of somatic mutations in childhood BCP-ALL, being altered in 38.9% of the cases.¹² These mutations consist of partial or complete hemizygous deletions, homozygous deletions, partial or complete amplifications, point mutations or fusion genes.¹² Some of these mutants have a dominant negative role on wild-type *PAX5*.¹²

Adult and childhood BCP-ALL can be considered as two distinct pathological entities in terms of pathogenesis and prognosis.¹⁸ Although 80% of the children with ALL can be

Correspondence: Professor É Delabesse, Laboratoire d'Hématologie and INSERM U563, Pavillon Lefebvre, Hôpital Purpan, Place du Docteur Baylac, TSA 40031, Toulouse Cedex 9, 31059, France.
E-mail: delabesse.e@chu-toulouse.fr

¹⁸J Familiades and M Bousquet contributed equally to this work as first authors; C Broccardo and É Delabesse contributed equally to this work as senior authors.

Received 4 September 2008; revised 17 March 2009; accepted 5 May 2009; published online 9 July 2009

cured, only 30% of the adults achieve long-term disease-free survival (DFS).¹⁸ Chromosomal abnormalities associated with these pathologies are different in term of occurrence. For example, *BCR-ABL1* fusion gene is associated with a poor long-term response to chemotherapy and is the most common rearrangement associated with adult BCP-ALL accounting for 25% of the cases whereas it is very rarely found in pediatric BCP-ALL. Conversely, *ETV6-RUNX1* fusion gene and high hyperdiploidy are associated with a good prognosis and account for half of the child BCP-ALL but rarely occur in adult BCP-ALL.¹⁸ Apart from these three biological entities, other categories such as *TCF3-PBX1* fusion gene (also called *E2A-PBX1*) or *MLL* rearrangements or normal karyotypes occur with similar frequencies.¹⁸

Despite these discrepancies between childhood and adult BCP-ALL, we report here the high frequency of *PAX5* mutations in a unique cohort of adult BCP-ALL treated according to the protocols of the GRAALL Intergroup (Group of Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia), GRAALL-2003 (*BCR-ABL1*-negative BCP-ALL¹⁹) and GRAAPH-2003 (*BCR-ABL1*-positive BCP-ALL²⁰). The deletion of one copy of *PAX5* was found to be significantly associated with *BCR-ABL1* or *TCF3-PBX1* fusion genes and a lower white blood cell (WBC) count.

Material and methods

GRAALL-2003 and GRAAPH-2003 clinical protocols

The GRAALL includes the former LALA (Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte), the GOELAL (Groupe Ouest et des Leucémies Aigües Lymphoblastiques), and the Swiss Group for Clinical Cancer Research. The GRAALL-2003/GRAAPH-2003 study was a risk-adapted prospective phase 2 trial, conducted in 70 centers in France, Belgium and Switzerland (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00222027). Patients aged 15- to 60-year old with a newly diagnosed ALL were eligible. Between November 2003 and November 2005, 300 patients entered the study. Written informed consent was obtained from all patients or from the parents of those aged less than 18-year old before enrollment. The study was approved in March 2003 by the institutional review board of Purpan hospital, Toulouse, France, and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki Principles. All patients first received a common steroid prephase. Corticoreistance was defined as a peripheral blood blast cell count higher than 1.0×10^9 per liter at the end of this 7-day prephase. Chemoresistance was defined as a percentage of blasts higher than 5% at day 8 of the induction course. Patients were eligible for the GRAAPH-2003 study if they were diagnosed with a *BCR-ABL1*-positive ALL defined as ALL carrying the t(9;22) translocation on standard karyotype and/or fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis and/or positivity for *BCR-ABL1* fusion transcript detected by PCR analysis. The GRAAPH-2003 study evaluated the efficacy of imatinib mesylate combined to chemotherapy.²⁰

PAX5 exon copy number

Quantification of *PAX5* copy number was performed by quantitative PCR on genomic DNA from cells of 117 BCP-ALL included in the GRAALL-2003/GRAAPH-2003 trial and for which DNA material was available. Quantitative PCR was performed for each of the 10 exons in triplicate using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), specific *PAX5* exon primers (Supplementary Table S1) and normal tonsil DNA as calibrator, each point of the dilution

series being tested six times. The same measurements were performed with two reference genes located on chromosomes 15 (*B2M* gene) and 16 (*CNGB1* gene), because these two chromosomes are rarely modified in number in ALL,²¹ using Ref15F and Ref15R primers for *B2M* and Ref16F and Ref16R primers for *CNGB1* (Supplementary Table S1). The percentage of each *PAX5* exon to the mean of Ref15 and Ref16 copy number was calculated. A value of 100% means that the number of *PAX5* copies is identical to that of the references, and corresponds to two copies.

PAX5 point mutations

PAX5 DNA mutation screening was performed by sequence analysis on both strands (*PAX5* exons 2, 3, 7, 8 and 9) and high-resolution melting PCR (HRM-PCR) for the remaining exons (Supplementary Table S1). Sequencing was performed using BigDye dideoxynucleotides and the products were separated on a 3130 XL sequencing apparatus (Applied Biosystems). Electrophoregrams were analyzed using the Sequencher software (version 4.1.2; Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) with a secondary peak threshold of 20% followed by manual verification. The presence of polymorphisms was evaluated using dbSNP and remission genomic DNA when available. HRM-PCR was performed using $1 \times$ LightCycler 480 HRM Master Mix (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) with 10 ng of genomic DNA, primers $0.1 \mu\text{M}$ and 25 mM MgCl_2 . HRM-PCR cycling conditions were initial denaturation at 95 °C during 10 min followed by 50 cycles at 95 °C for 10 s, at 63 °C for 15 s and at 72 °C for 25 s. Melting curve was measured from 70 to 95 °C with 25 acquisitions per °C.

PAX5 partial deletions

Full-length cDNA amplification of partial deletion mutants was performed by PCR on a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) with the Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech, Mountain View, CA, USA). The amplification program was 5 cycles at 72 °C, 5 cycles at 70 °C and 25 cycles at 68 °C. Primers used were PAXQ and PCR5 (Supplementary Table S1). Reverse transcriptase (RT)-PCR products were analyzed by electrophoresis on an agarose gel, cut out and sequenced.

PAX5 FISH analysis

Fluorescent *in situ* hybridization analyses were performed on cases presenting either a chromosomal 9p13 breakpoint or deletion using a *PAX5* commercial probe (*PAX5* FISH DNA Probe, Split Signal, Y5413; Dako, Carpinteria, CA, USA) and/or a combination of two fluorescent-labeled bacterial artificial chromosome clones RP11-243F8 hybridizing *PAX5* from exon 1 to 9 and RP11-344B23 hybridizing from exon 7 to 10 and to an extended telomeric region. The TCF3 split signal FISH probe (TCF3 FISH DNA Probe, Split Signal, Y5402; Dako) was also used.

IGH/TCR rearrangements analysis

IGH and *TCR* rearrangements were evaluated by the four centers performing the minimal residual disease follow-up of the clinical trial (Paris-Necker, Paris-Saint-Louis, Paris-Robert-Debré and Lille) according to the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936-2 protocol.²² Immunoglobulin heavy chain specific amplification of the proximal $V_{H}6-1$ segment rearrangement with J_H was performed according to the BIOMED-2

protocol,²² using the V_H6 FR2 primer along with the J_H consensus primer (Supplementary Table S1).

Statistical analysis

Binary variables were compared with the two-sided Fisher's exact test. The Mann–Whitney test was used for median comparisons. The median follow-up of surviving patients for the entire protocol was 37 months. Event-free survival (EFS) was calculated from the date of prephase initiation. Events accounting for EFS were failure of remission induction, relapse and death in first complete remission (CR). Failure time data were estimated by the Kaplan–Meier method,²³ then compared by the log-rank test.²⁴ Cumulative incidence estimations took into account competing risks and were compared by the Gray test.²⁵ A *P*-value less than 0.05 was considered to indicate statistical significance. All calculations were performed using the STATA/SE software, version 9.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA) and the R software, version 1.5.1 (The R Development Core Team, A Language and Environment Copyright, 2002).

Results

Representativeness of the samples tested

We screened the occurrence of *PAX5* mutations in a series of 117 BCP-ALL prospectively treated in the GRAALL-2003/

GRAAPH-2003 study, with a median follow-up of 22 months (Table 1). The GRAALL-2003/GRAAPH-2003 included 300 adults with ALL. The 117 BCP-ALL cases analyzed for the occurrence of *PAX5* mutations were similar to the 107 other BCP-ALL cases of the trial for whom no material remained available for analysis. We confirmed the absence of difference regarding main patient characteristics, including age and WBC count, as well as corticosenitivity, chemosensitivity, first CR rate, overall survival and *BCR-ABL1* status (data not shown). Therefore, the population of 117 BCP-ALL analyzed for the presence of *PAX5* mutations is representative of the whole GRAALL-2003/GRAAPH-2003 protocol.

Genomic *PAX5* copy number

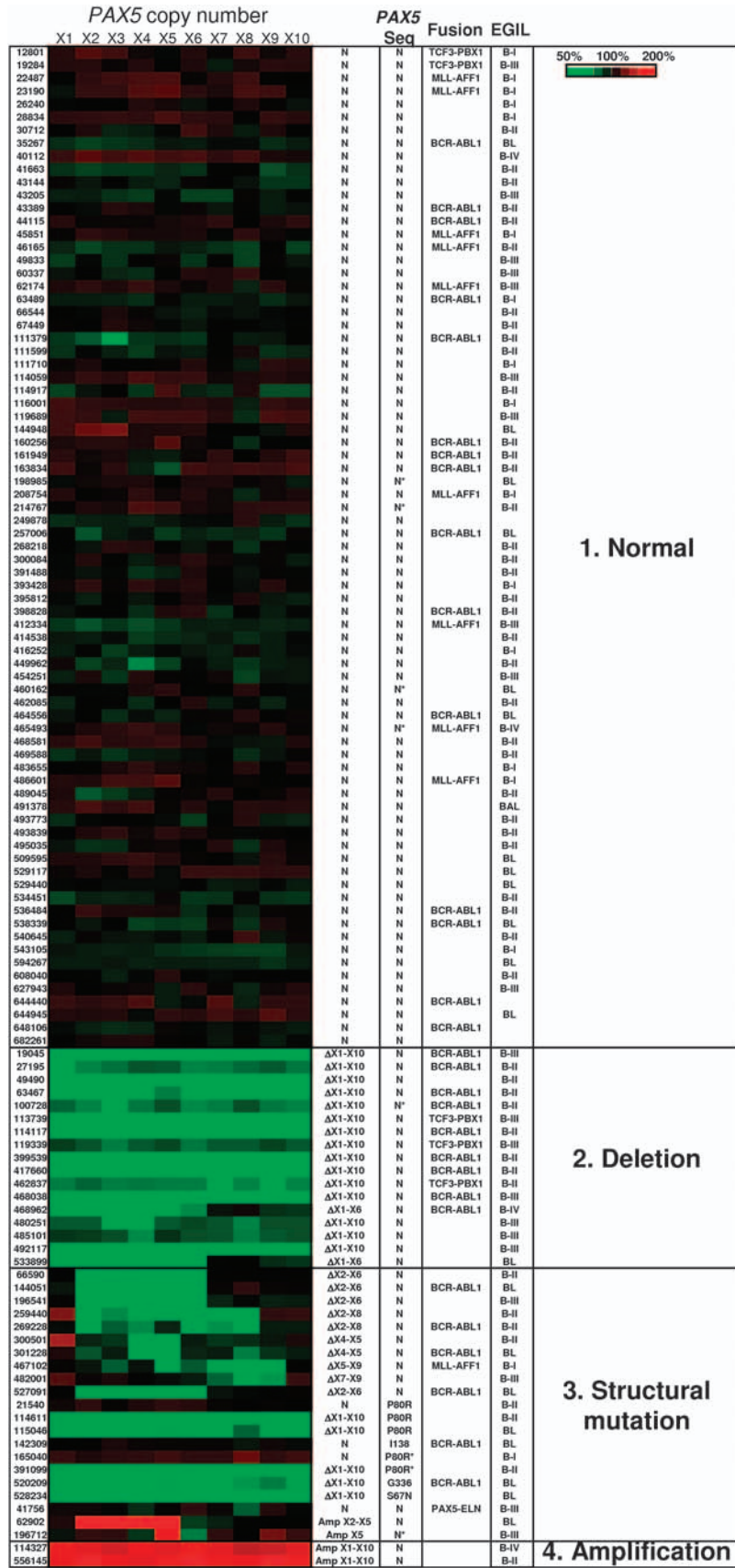
Normal *PAX5* content was found in 81 patients (69%), 20 had a complete hemizygous deletion (17%), 12 a partial hemizygous deletion (10%), 2 a partial amplification (2%) and 2 a complete amplification (2%) (Figure 1; Supplementary Table S2). *PAX5* copy number results were validated by FISH analysis (Supplementary Table S3), karyotype (Supplementary Table S4) and by sequencing the partially deleted cDNA (Figure 2). These results indicate that alteration of *PAX5* exon copy number is a frequent event in adult BCP-ALL occurring in 31% of the cases.

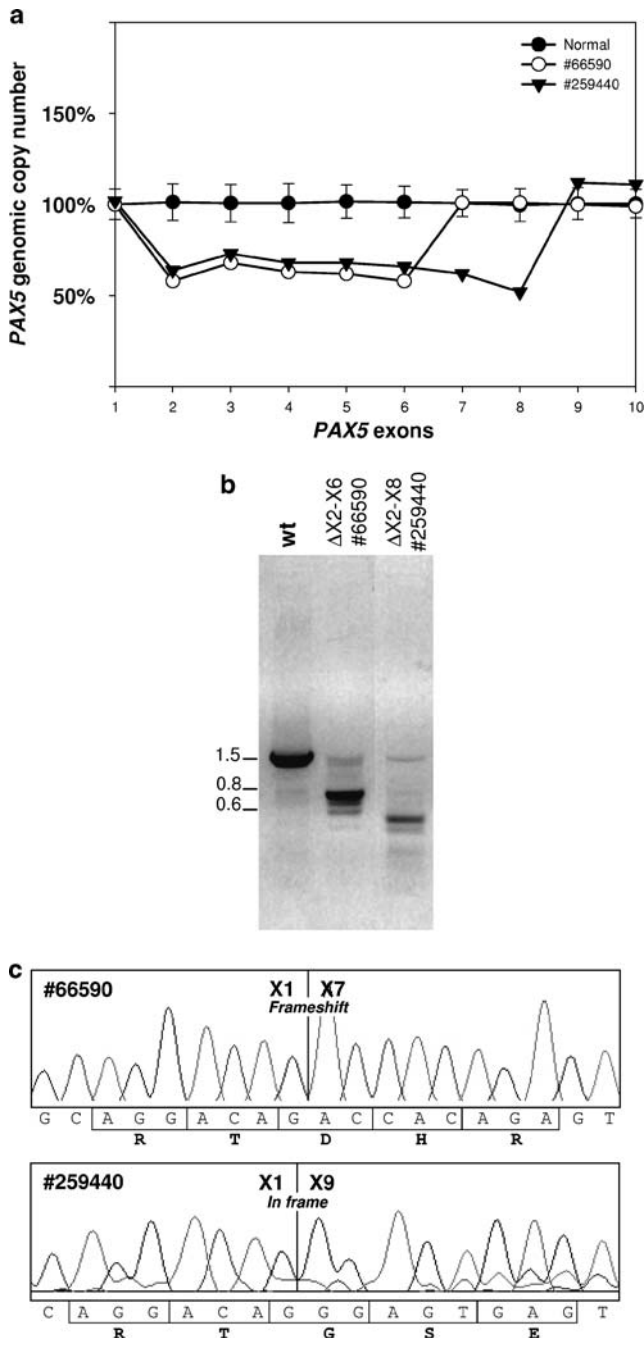
Table 1 Statistical analysis of clinical and biological data

	Normal		Deletion		Mutation		Pearson's χ^2 -test
Patients (n)	77		17		21		
Median age (years)	35 (17–60)		39 (16–55)		36.5 (16–60)		NS
Median WBC (10 ⁹ per liter)	13.8 (0.9–348)		3.35 (1.2–78)		11.4 (1.2–343)		0.01
CR	68/76	89%	16/17	94%	18/20	90%	0.03
Relapse	19/75	25%	4/17	24%	8/20	40%	NS
Corticosenitivity	56/74	76%	14/17	82%	16/20	80%	NS
Chemosensitivity	32/69	46%	9/17	53%	9/20	45%	NS
<i>CD19, CD10 and CD20 antigens</i>							
CD19 positive	71/73	97%	17/17	100%	20/21	95%	NS
CD10 positive	50/71	70%	17/17	100%	19/21	90%	0.018
CD20 positive	24/70	34%	8/16	50%	10/20	50%	NS
<i>EGIL classification</i>							
B-I	15/73	21%	0/17	0%	2/21	10%	
B-II	33/73	45%	8/17	47%	7/21	33%	
B-III	10/73	14%	7/17	41%	4/21	19%	0.002
B-IV	2/73	3%	1/17	6%	0/21	0%	
BL	13/73	18%	1/17	6%	8/21	38%	
<i>Cytogenetics/Fusion genes</i>							
BCR-ABL1	15/77	19%	9/17	53%	6/21	29%	
TCF3-PBX1	2/77	3%	3/17	18%	0/21	0%	0.009
MLL rearrangement	10/77	13%	0/17	0%	1/21	5%	
del9p	2/62	3%	4/14	29%	3/20	15%	0.021
<i>IGH/TCR rearrangements</i>							
IGH VDJ positive	42/55	76%	10/11	91%	9/13	69%	NS
TCRG positive	28/54	52%	6/10	60%	10/13	77%	NS
TCRD positive	18/51	35%	4/10	40%	6/13	46%	NS

Abbreviations: BL, B-cell lineage; CR, first complete remission; EGIL, European Group for the Immunological Characterization of Leukemias; NS, not significant; WBC, white blood cell.

Clinical data were analyzed in the three groups (normal, deletion and structural mutant). Two patients with *PAX5* amplification are not included in the analysis. Main clinical features were analyzed including age, WBC, CR at the first attempt (CR), relapse after CR1, corticosenitivity and chemosensitivity. Differentiation block stages were analyzed using B-specific cell markers (CD19, CD10 and CD20) and EGIL classification (B-I, B-II, B-III, B-IV, BAL). *BCR-ABL1* and *TCF3-PBX1* fusion genes were significantly associated with the *PAX5* deletion group. No difference was found between the normal and structural mutant *PAX5* groups. Finally, *IGH* VDJ rearrangements and illegitimate *TCR* rearrangements were equally frequent between the three groups. Statistical *P*-value is indicated in the last column.





PAX5 genomic deletion as a secondary event

In two cases (patients 462837 and 119339), blasts carrying the *TCF3-PBX1* fusion gene and deletion of one *PAX5* allele were further analyzed using the relevant FISH probes together on the same slide. *TCF3* rearrangement was detected in 90% (patient 462837) and 80% (patient 119339) of the nuclei. Of these *TCF3*-rearranged nuclei, only 60% (patient 462837) and 20% (patient 119339) of the nuclei, respectively, had a *PAX5* deletion suggesting that, at least in these cases, *PAX5* deletion is a secondary event (Supplementary Figure S1).

PAX5 point mutations

PAX5 point mutations were investigated by sequence and HRM-PCR analyses in the same 117 BCP-ALL samples (except for 8 patients for whom no material remained for HRM-PCR analysis). Eight mutations were identified among the 117 cases thus representing 7% of the cases (Supplementary Figures S2 and S3). Among them, the P80R was the most frequent point mutation, occurring in five out of eight cases (patients 21540, 114611, 115046, 165040 and 391099). The three other mutations were one point mutation S67N (patient 528234) and two frameshift mutations (insertion of one G at the base 2 of exon 4 (codon I138, patient 142309) and insertion of two G at the base 97 of exon 8 (codon G336, patient 520209)). Five point mutations were associated with a complete deletion of the second *PAX5* allele (patients 114611, 115046, 391099, 520209 and 528234) (Figure 1).

Figure 2 Validation of *PAX5* (paired-box domain 5) exon copy number quantification. (a) *PAX5* copy number quantification using quantitative PCR, 100% as two copies of a *PAX5* exon. Standard deviations calculated on the normal *PAX5* group are shown. Partial deletion of patients 66590 and 259440 are indicated. (b) *PAX5* mRNA expression of patients 66590 and 259440 showing a partial deletion of *PAX5*. cDNA were amplified by reverse transcriptase (RT)-PCR between *PAX5* exons 1 and 10. PCR products were analyzed on agarose gel. Lane 1 shows amplification of a 1505 bp normal RT-PCR product corresponding to the normal *PAX5* mRNA, lane 2 shows a smaller 770 bp product corresponding to a *PAX5* product with deletion from exon 2 to 6 and lane 3 a smaller 538 bp product corresponding to a *PAX5* product with deletion from exon 2 to 8. (c) Sequence chromatographs of the amplified PCR products. The upper panel shows the direct fusion between exons 1 and 7 and the lower panel shows direct fusion between exons 1 and 9 confirming the deletion.

Figure 1 *PAX5* (paired-box domain 5) mutations in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). Genomic DNA content for each of the 10 exons (X1–X10) was determined by quantitative PCR for each patient (GRAALL-2003/GRAAPH-2003 identification number given in the first column). Results (detailed in Supplementary Table S2) are expressed using color code (first frame): less than 100% of the control in green (deletion), 100% (= 2*n* copies) in black (normal) and more than 100% in red (amplification). Patients were classified into four groups according to the *PAX5* status: normal *PAX5*, patients with two *PAX5* copies for each of the 10 exons; deleted *PAX5*, complete loss of one of the two *PAX5* alleles or deletion from *PAX5* exon 1; structural mutant *PAX5*, patients with partial deletion, partial amplification, point mutation or fusion gene, associated in some cases with deletion of the second allele; amplified *PAX5*, patients with a global amplification of *PAX5*. The second frame detailed the copy-number alterations. The third frame shows point mutations, N as normal. A star indicates when *PAX5* exons 1, 4, 5, 6 and 10 were not investigated by high-resolution melting (HRM) analysis due to absence of remaining material. The fourth frame indicates fusion genes identified. The fifth frame provides the European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) status for each patient (BAL, bi-lineage acute leukemia; BL, B-cell lineage).

PAX5 chromosomal rearrangement

Fluorescent *in situ* hybridization analysis was performed when a chromosomal abnormality involving the 9p chromosomal band was identified by standard karyotype. Eleven patients showed a rearrangement of the 9p13 chromosomal band (patients 49490, 49833; 41756; 62902; 66590; 114117, 144051, 144948, 196712, 301228 and 391099) and in a single case (patient 41756: 46,XY,t(7;9)(q21;p21)[17]) a translocation which fused *PAX5* and *ELN* without loss of the remaining normal allele, was detected.¹⁶ Thus *PAX5* translocations occur in adult BCP-ALL but are a rare event (<1%).

PAX5 alterations in BCP-ALL

Globally, *PAX5* alterations were identified in 40 cases out of 117 adult BCP-ALL (34%). These alterations are heterogeneous consisting in complete loss in 17%, focal deletions in 10%, point mutations in 7% and translocations in 1% of the cases. To further analyze these mutations, we apportioned the patients according to the probable consequences of mutations (Figure 1). The *PAX5* mutated BCP-ALL were subdivided in three groups. A first group called deleted *PAX5*, pooling 17 cases (15%), characterized by a probable lower expression of the normal *PAX5* protein due to a complete deletion of one *PAX5* allele or a partial deletion removing *PAX5* exon 1 with no mutation of the second allele. A second group called structural mutant *PAX5* bringing together 21 cases (18%) characterized by the expression of a *PAX5* mutant allele, that is, having an altered activity regarding its transcriptional function consisting either of *PAX5* partial deletion conserving *PAX5* exon 1 (10 cases), partial amplification (2 cases), point mutations (8 cases) and fusion gene (1 *PAX5-ELN* case). A third group called amplified *PAX5* consisting of two cases (2%) that could lead to a higher expression of the normal *PAX5* protein as a consequence of a whole *PAX5* genomic amplification. Owing to the small number of cases, this group was not further analyzed.

Characteristics of adult *PAX5* mutants BCP-ALL

We compared the two main groups of *PAX5* mutations (deleted *PAX5* and structural mutant *PAX5*) to the largest category

composed of patients without evidence of *PAX5* mutation (77 cases, 66%, labeled as normal *PAX5*).

Immunophenotype

We analyzed the membrane expression of major B-cell differentiation markers. We first analyzed CD19 as it is a direct target of *PAX5*.²⁶ However, no difference according to the *PAX5* status was observed (Table 1). CD20-positive cells were not significantly different in deleted *PAX5* (8 of 16, 50%), structural mutant *PAX5* (10 of 20, 50%) and normal *PAX5* groups (24 of 70, 34%) (Table 1). In contrast, no CD10-negative cases were detected in the deleted *PAX5* group (0 of 17) compared to 21 of the 71 (30%) normal *PAX5* cases ($P=0.018$) (Table 1). This difference is probably related to the fact that CD10-negative BCP-ALL are associated with *MLL* translocations²⁷ and *PAX5* alterations are not associated with *MLL* translocations (to the unique exception of patient 467102). The structural mutant *PAX5* group showed an intermediate result because 2 of 21 BCP-ALL (10%) lacked CD10 surface expression.

European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) classification allows a subdivision of BCP-ALL according to the stage of maturation block of the leukemic cells.²⁸ B-I represents the earliest stage and B-IV the latest stage of differentiation of BCP-ALL. Because the EGIL classification used the detection of CD10, B-I being CD10-negative BCP-ALL and B-II to B-IV being CD10 positive, we found an imbalanced repartition in EGIL subset between deleted and normal *PAX5* groups ($P=0.002$; Table 1).

Cytogenetics and fusion genes

Fusion gene rearrangements are frequent in BCP-ALL, especially *BCR-ABL1* in adult BCP-ALL. We evaluated the association of these fusion genes or other karyotypic features regarding *PAX5* status (Tables 1 and 2). We found a significant association between the presence of *BCR-ABL1* (53%) or *TCF3-PBX1* (18%) and the deleted *PAX5* group compared to the normal group (19% *BCR-ABL1* and 3% *TCF3-PBX1*) or the structural mutant *PAX5* group (29% *BCR-ABL1* and 0% *TCF3-PBX1*) ($P=0.009$; Table 1). No *MLL* rearrangement and no normal karyotype were detected in the deleted *PAX5* group as compared to 10 (13%) and 20 cases (26%), respectively, in the normal *PAX5* group.

Table 2 Cytogenetic data

Groups	Normal <i>PAX5</i> (%)		Deletion <i>PAX5</i> (%)		Mutant <i>PAX5</i> (%)		Amplification <i>PAX5</i> (%)		Total (%)	
BCR-ABL1	15	19	9	53	6	29	0	0	30	26
MLL	10	13	0	0	1	5	0	0	11	9
TCF3-PBX1	3	4	3	18	0	0	0	0	6	5
47-50	8	10	0	0	0	0	0	0	8	7
51-65	2	3	1	6	1	5	0	0	4	3
Hypo/Triploid	0	0	0	0	0	0	1	50	1	1
41-45	0	0	1	6	0	0	0	0	1	1
Complex	5	6	1	6	2	10	1	50	9	8
Other	8	10	1	6	6	29	0	0	15	13
Normal	20	26	0	0	4	19	0	0	24	21
Failure	5	6	1	6	1	5	0	0	7	6
NA	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
	77		17		21		2		117	

Cytogenetic data: Cytogenetic features of GRAALL-2003/GRAAPH-2003 patients included in this analysis. BCR-ABL1: t(9;22) and/or BCR-ABL1-positive; MLL: *MLL* rearrangement; TCF3-PBX1: t(1;19) and/or TCF3-PBX1-positive; 47-50: low hyperdiploidy 47-50 chromosomes; 51-65: high hyperdiploidy 51-65 chromosomes; Hypo/Triploid: hypodiploidy 30-40 chromosomes and/or paratriploidy 60-80 chromosomes; 41-45: hypodiploidy 41-45 chromosomes; Complex: 5 or more chromosomal abnormalities; Other: chromosomal abnormality not otherwise classified; Normal: no cytogenetic/molecular abnormality detected; Failure: karyotype failure and no molecular abnormality; NA: not available.

IGH V_HD_HJ_H and TCR rearrangement

Because in mice *Pax5* homozygous deletion impairs B-cell transition from D_HJ_H to V_HD_HJ_H IGH rearrangement,⁵ we investigated the rearrangement status of IGH in the context of PAX5 mutational status. Complete V_HD_HJ_H IGH rearrangements were detected in 76% (42 of 55), 91% (10 of 11) and 69% (9 of 13) of normal, deleted and mutant PAX5 subgroups respectively. These differences were not statistically significant (Table 1). Although V_HD_HJ_H rearrangement occurs, V_H segment proximal vs distal accessibility could be impaired in a similar way to the *IL7R* homozygous deletion model.²⁹ V_HD_HJ_H rearrangements were sequenced in a unique center (Paris-Necker) in 19 BCP-ALL (12 normal PAX5, 3 deleted PAX5 and 4 structural mutant PAX5). Intriguingly, the two PAX5 P80R mutants analyzed showed a rearrangement involving the proximal V_H6-1 segment, the closest V_H segment to J_H segments (only 1 of 12 in normal PAX5 BCP-ALL). This V_H segment is usually rarely used in physiological situations and this bias suggests a possible impairment of accessibility to the IGH locus with this PAX5 P80R mutant. We therefore analyzed the use of the V_H6-1 segment and found that P80R (two of three analyzed) and S67N mutants used this V_H6-1 (data not shown). We also investigated the occurrence of illegitimate rearrangements of the *TCRG* and *TCRD* loci but no differences were detected according to PAX5 mutational status.

Prognostic significance

There was no difference in median age between the normal, deleted and mutant PAX5 subgroups (Supplementary Tables 1 and S5). Of note, median WBC was significantly lower in the deleted PAX5 subgroups as compared to the two other subgroups (3.4 vs 13.8 (normal) and 11.4 G/L (structural mutations); *P*=0.01; Table 1).

Two patients eventually were not treated according to the protocol and the two patients showing an amplification of PAX5 were not included in this analysis. In the 113 remaining patients, CR rate was 68 of 76 (89%), 16 of 17 (94%) and 18 of 20 (90%) in the normal, deleted and structural mutant PAX5 subgroups respectively (*P*=0.03; Table 1). The percentage of corticoreistant leukemia was 24, 18 and 20%, respectively, in these three subgroups (not significant; Table 1). A total of 42 patients were allografted in first CR (28 from the normal PAX5, 5 from the deleted PAX5 and 9 from the structural mutant PAX5 subgroup, respectively). Cumulative incidence of relapse and DFS are shown in Figure 3, according to the PAX5 status. As indicated, there were no significant differences in outcome among the three subsets (Figure 3a). However, it is worth noting that a trend toward a higher incidence of relapse in the structural mutant PAX5 subgroup was observed (Figure 3b). Results were similar when patients allografted in first CR were censored at transplant time (not shown). Of note, patients with *BCR-ABL1*-positive ALL (treated here with imatinib combined to conventional chemotherapy) displayed a similar outcome to those with *BCR-ABL1*-negative ALL in this series (not shown).

Discussion

We report here that PAX5 is frequently mutated in adult BCP-ALL. PAX5 mutations have been extensively reported in pediatric BCP-ALL.¹² In adult BCP-ALL so far, only PAX5 deletion has been reported in small series of 26 adult and adolescent BCP-ALL³⁰ and 22 *BCR-ABL1* positive adult BCP-ALL.³¹ We investigated in this study, PAX5 deletions but also

PAX5 structural mutations in a large series of 117 adult BCP-ALL in a unique clinical protocol. Out of the patients analyzed from the GRAALL-2003/GRAAPH-2003 clinical trial, 40 carried a mutation of the PAX5 gene (34%). PAX5 mutations occur in different ways, as complete or partial deletions, complete or partial amplifications, point mutations or fusion genes.¹² We analyzed PAX5 mutants according to their probable functional consequences according to the study by Mullighan *et al.*¹² Isolated complete deletion of one PAX5 allele is found in 15% of adult BCP-ALL (deleted PAX5 group) and 11% of child BCP-ALL.¹² Mutant alleles are found in 18% of adult BCP-ALL (mutant PAX5 group) and 22% of children BCP-ALL.¹² PAX5 point mutations are detected in 7% of adult BCP-ALL and 7% of child BCP-ALL.¹² PAX5 P80R mutation is a frequent event in BCP-ALL detected in 5 of 117 cases in adult BCP-ALL and 4 of 192 cases in child¹² occurring therefore in 3% of BCP-ALL. We identified three new mutations such as PAX5 S67N, one G insertion in codon 138 (exon 4) and one insertion of two G in codon 336 (exon 8) leading both to a frameshift of PAX5 last exons encoding the transactivation and inhibitory domains. Therefore, PAX5 mutations appear to be similar, in nature and frequency, between child and adult BCP-ALL.

PAX5 maintains the identity of B cells.⁷ Its homozygous deletion in mice blocks B-cell differentiation at an early stage.^{5,6} In our series, out of the 17 cases of hemizygous deletion (deleted PAX5 group), no early stage CD10-negative BCP-ALL were identified in contrast to the 15 of 74 cases (20%) found in the normal PAX5 group. The proportion of these BCP-ALLs in the PAX5 structural mutant group was intermediate between normal PAX5 and deleted PAX5 (2 of 21 cases, 10%). This result suggests that the hemizygous deletion, that is, a lower dose of normal PAX5, is either a later event or blocks the leukemic cells at a later stage during B-cell differentiation. An alternative explanation is linked to the absence of PAX5 deletions in *MLL*-rearranged cases, and consequently the absence of CD10-negative BCP-ALL, the hallmark of *MLL* rearrangements,²⁷ is merely a consequence of this exclusion.

Fusion genes *BCR-ABL1*, *TCF3-PBX1* or involving *MLL* are frequently detected in adult BCP-ALL. We identified these fusion genes in 26, 4 and 9% of our cases respectively. PAX5 deletions are highly skewed toward *BCR-ABL1* and *TCF3-PBX1* fusion genes, occurring in 71% of patients in deleted PAX5 compared to 22% in normal PAX5 and 29% in mutant PAX5, suggesting a very important role of PAX5 dosage during the transformation process of these two oncogenes. It is of note that the frequency of PAX5 deletions is similar in child and adult BCP-ALL, even if associated events such as *BCR-ABL1* are not similarly distributed. In addition, PAX5 deletion seemed to be a secondary event as suggested by our FISH analysis performed on blasts carrying both *TCF3-PBX1* fusion gene and PAX5 deletion.

Structural mutations are heterogeneous, consisting of partial deletions, partial amplifications, point mutations and fusion genes. The complete deletion of one PAX5 allele is frequently associated with deletion of *CDKN2A* located telomeric of PAX5 in the short arm of chromosome. Transduction using a *BCR-ABL1* retrovirus in bone marrow cells of mice with only one copy of PAX5 shorten drastically the survival (median from 60 to 36 days).³² Moreover the concomitant haploinsufficiencies of PAX5 and *CDKN2A* reduce again significantly the survival to a median of 21 days.³² This demonstrates that loss of one copy of *CDKN2A* and PAX5 is synergistic during the *BCR-ABL1* transformation. PAX5 point mutations, such as P80R, and PAX5 fusion genes are isolated events, not associated with *BCR-ABL1*. Partial deletion mutants target either the DNA-

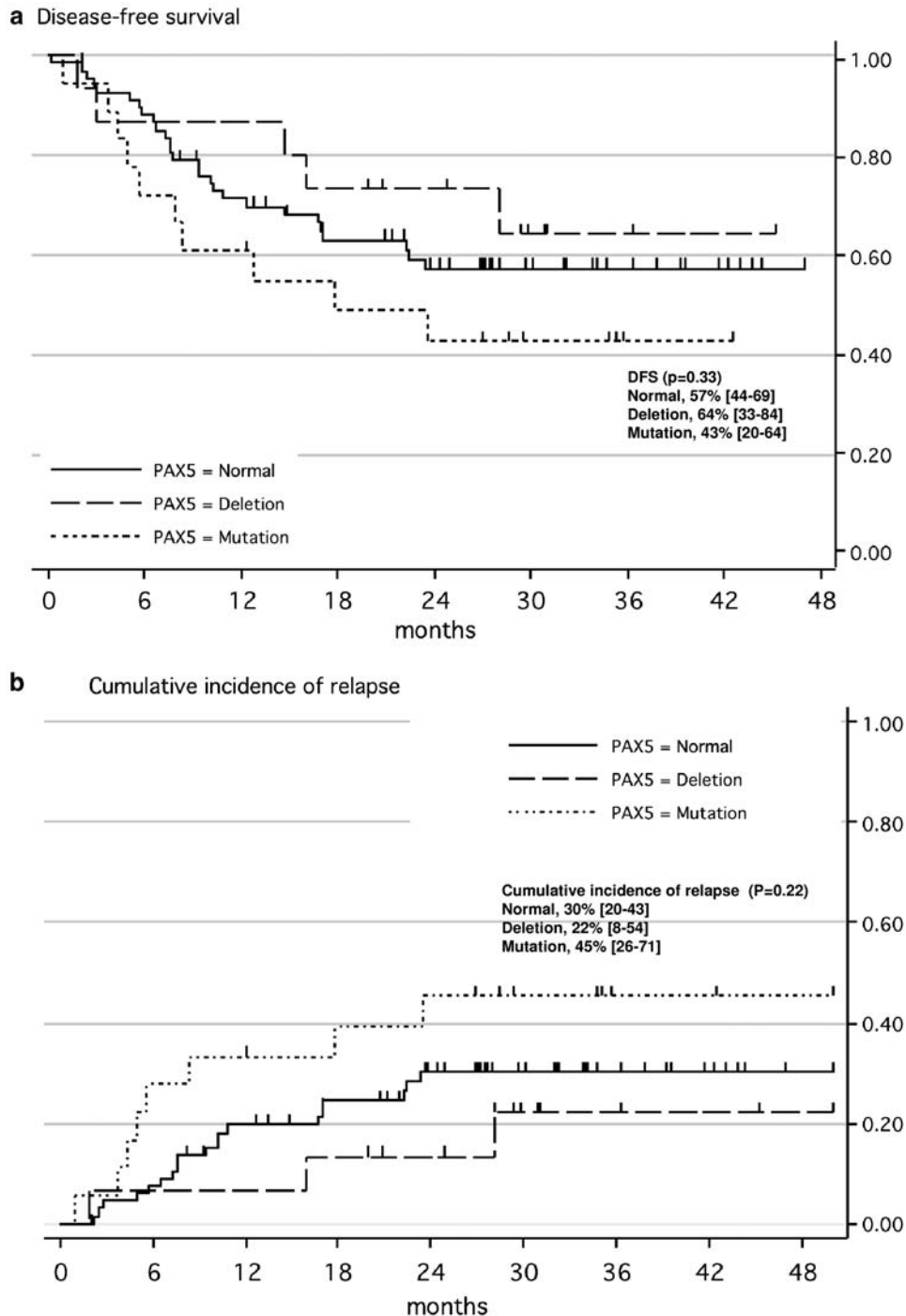


Figure 3 Disease-free survival (DFS) and cumulative incidence of relapse according to *PAX5* (paired-box domain 5) status (a) DFS. At 3 years, estimated DFS was 57% (95%; CI 44–69%), 64% (95%; CI 38–84%) and 43% (95%; CI 20–64%), in the normal, deleted and structural mutant *PAX5* group, respectively ($P=0.33$, by the log-rank test). (b) Cumulative incidence of relapse. At 3 years, estimated cumulative incidence of relapse was 29, 22 and 48%, in the normal, deleted and structural mutant *Pax5* subgroup, respectively ($P=0.22$, by the Gray test).

binding domain or the transactivation domain. Deletion of the DNA-binding domain only is associated with BCR-ABL1 (two of the four cases). Frameshift structural mutants (I138 and G336) are also associated with BCR-ABL1 (for the two cases).

PAX5 point mutations are frequently associated with the deletion of the remaining allele (10 of 13 pediatric cases;¹² 5 of 8 cases in our series) suggesting that the mechanism of action of these point mutations during the oncogenic process may not be

associated to a dominant-negative effect. By contrast, a dominant-negative action was established for *PAX5-ELN*,¹⁶ *PAX5-ETV6*^{11,12} and *PAX5-FOXP1*¹² fusions.

It has been reported that the most proximal V_H segment, V_H6-1 , is overused in adult B-ALL patients.³³ Furthermore, *Pax5* homozygous deletion in mice showed that *Pax5* is crucial for the transition from D_HJH to V_HD_HJH *IGH* rearrangement, and especially for distal rearrangement.³⁴ Although we were unable to detect a significant frequency difference regarding *IGH*

V_HD_HJ_H rearrangement between each group of BCP-ALL, we have therefore looked at the rearrangement at V_H6-1. Our results confirm that in average 11.4% (12 of 105) of the adult BCP-ALL tested overuse the V_H6-1 segment, suggesting a modification of the accessibility of the other V_H segments in this pathology, with a bias toward PAX5 DNA-binding mutants such as S67N or P80R.

In conclusion, PAX5 mutations are frequent in adult BCP-ALL in accordance with the pediatric BCP-ALL cases.¹² Our data clearly show a difference regarding the type of PAX5 mutations (deleted PAX5 or structural mutant PAX5) in term of association to fusion genes, EGIL classification and WBC counts. The loss of an entire allele of PAX5 seems to be a rather late event and might be considered as a secondary event.

Acknowledgements

We thank the financial support of the association Laurette-Fugain. JF was supported by an ARC fellowship. CB and NPH were supported by a grant of Institut National du Cancer. ED, CB and PB were supported by the CITTIL (Cooperacion de investigacion transpirenaica en la terapia innovadora de la leucemia).

This work would not have been possible without the help of all the people who take care of the patients involved in the GRAALL studies, especially the centers that contributed directly to this study. Amiens: Damaj, Royer, Dubus, Capiod, Marolleau; Angers: Francois, Hunault, Ifrah, Marie, Genevieve, Baranger, Chassevent, Blanchet; Avignon: Boulat, Derre; Bayonne: Banos, Bauduer, Burtin; Bobigny: Gardin, Fenaux, Beve, Boulalam, Eclache, Fenaux; Bordeaux: Boiron, Leguay, Pigneux, Bilhou-Nabera, Perry, Lacombe, Tabrizi, Lippert, Marit; Brest: Guillaume, Berthou, Lecalvez, De Braekeleer, Ugo; Caen: Reman, Lepesant, Salaun, Plessis, Naguib, Leporrier; Clamart: De Revel, Samson, Desangles; Clermont-Ferrand: Chaletex, Villemagne, Latiere, Berger, Giollant, Tchirkov, Tournilhac; Dijon: Caillot, Casanovas, Grandjean, Menadier, Favre-Audry, Mugneret, Teyssier; Lens: Stalniewicz, Poulain; Lille: Darre, De Botton, Lepelle, Lai, Soenen, Preudhomme, Grardel, Bauters; Limoges: Turlure, Bordessoule, Chaury, Trimoreau, Gachard; Lyon: Le, Nicolini, Tavernier, Thiebaut, Thomas, Lheritier, Girard, Wattel, Tigaud, Hayette, Michallet; Marseille: Vey, Charbonnier, Stoppa, Mouton, Sainty, Moziconacci, Arnoulet, Lafage-Pochitaloff, Blaise; Meaux: Frayfer, Mossafa; Mulhouse: Arkam, Ojeda Uribe, Iglarz, Drenou, Jeandidier, Isaac; Nancy: Witz, Bene, Witz, Gregoire, Monhoven; Necker: Buzyn, Couderc, Asnafi, Valensi, Radford-Weiss, Delabesse, Macintyre, Varet; Paris Pitié-Salpêtrière: Dhedin, Aliammar, Merle-Beral, Nguyen-Khac, Davi, Leblond, Vernant; Paris Saint-Louis: Raffoux, Treilhou, Maarek, Daniel, Soulier, Cayuela, Miclea, de Labarthe, Dombret; Reims: Himberlin, Baurly, Daliphard, Luquet, Cornillet-Lefebvre, Delmer; Rennes: Escoffre-Barbe, Lamy, Picouleau, Roussel, Henry, Ly Sunnaram, Fest; Rouen: Lepretre, Contentin, Jardin, Lenain, Tilly, Tallon, Lenormand, Stamatoullas-Bastard, Penther, Bastard; Saint-Etienne: Cornillon, Jaubert, Guyotat, Marchand, Campos, Nadal, Flandrin; Toulon: De Jaureguiberry; Toulouse: Huguet, Recher, Daniel, Kuhlein, Dastugue, Demas, Attal; Tours: Delain, Delepine, Degene, Barin, Colombat; Valenciennes: Fernandes, Poulain, Daudignon; Versailles: Choquet, Rousselot, Taksin, Pousset, Terre, Castaigne; Villejuif: Arnaud, Bayle, Bourhis, Auger, Bernheim.

Among these participants, we specially acknowledge the following cytogeneticists that provided cytogenetic pellets and data to perform PAX5 and TCF3 FISH analyses, Eric Lippert (Bordeaux), Odile Maarek (Paris Saint-Louis), Christian Bastard

and Dominique Penther (Rouen), Isabelle Tigaud (Lyon), Florence Nguyen-Khac (Paris Pitié-Salpêtrière), Christine Terré (Versailles) and Ghislaine Plessis (Caen). We thank the extended FISH analysis of Francesca Correia (Toulouse).

The design and analysis of the experiments were performed by ED and CB. JF performed the PAX5 quantitative PCR. MB cloned and analyzed the PAX5-ELN case. They cloned the PAX5 mutants helped by ND, SS, EC, CQ, NPH and SD. ED, CB and PB overviewed the results. The cytogenetic results were collected and analyzed by MLP and ND. FISH analyses were performed by MLP and CB. The immunophenotype results were collected by MCB. The molecular data were collected by EAM and ED. KB performed V_HD_HJ_H sequence analysis. JDV performed the microarray analysis. JMC, NG, CP, HC, OB, KB and EAM provided DNA samples. VL collected clinical data, reviewed by YC, NI, AD, AP, FH and HD. Paper was written by ED, CB, JF and HD.

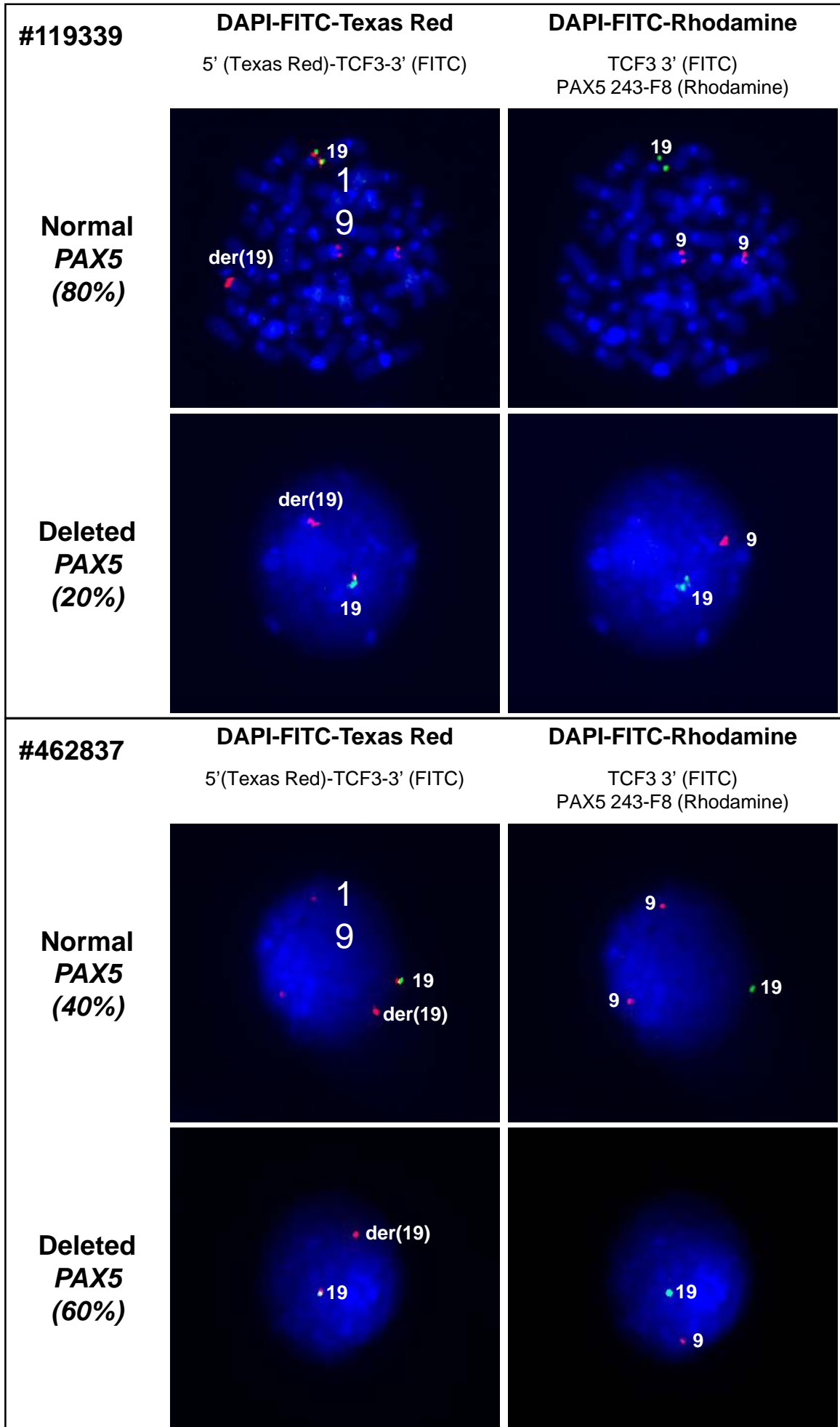
References

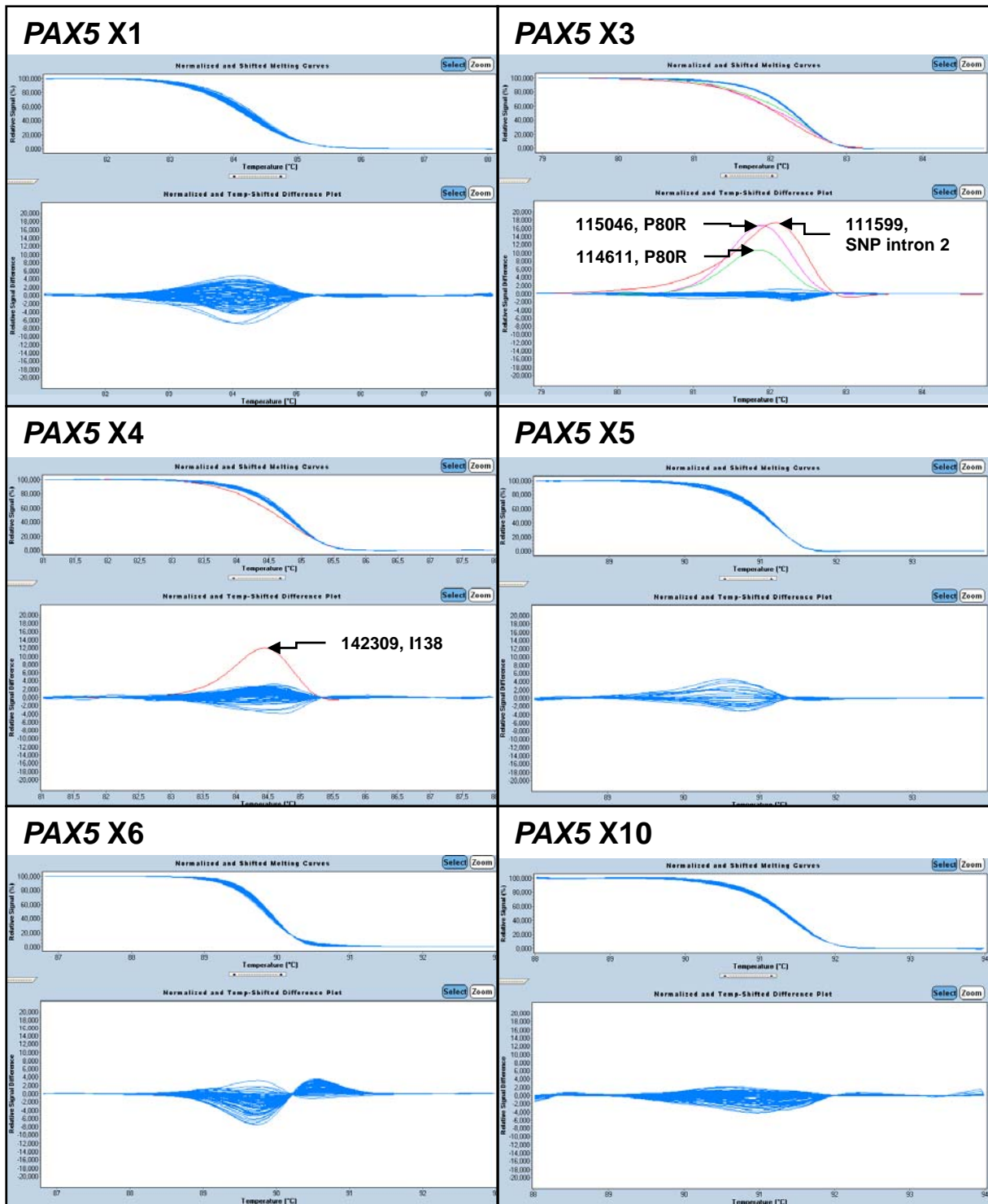
- Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 2007; **8**: 463–470.
- Robson EJ, He SJ, Eccles MR. A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 52–62.
- Adams B, Dorfler P, Aguzzi A, Kozmik Z, Urbanek P, Maurer-Fogy I et al. Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev* 1992; **6**: 1589–1607.
- Fuxa M, Busslinger M. Reporter gene insertions reveal a strictly B lymphoid-specific expression pattern of pax5 in support of its B cell identity function. *J Immunol* 2007; **178**: 3031–3037.
- Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 1999; **401**: 556–562.
- Rolink AG, Nutt SL, Melchers F, Busslinger M. Long-term *in vivo* reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature* 1999; **401**: 603–606.
- Cobaleda C, Jochum W, Busslinger M. Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* 2007; **449**: 473–477.
- Iida S, Rao PH, Nallasivam P, Hibshoosh H, Butler M, Louie DC et al. The t(9;14)(p13;q32) chromosomal translocation associated with lymphoplasmacytoid lymphoma involves the PAX-5 gene. *Blood* 1996; **88**: 4110–4117.
- Busslinger M, Klix N, Pfeffer P, Graninger PG, Kozmik Z. Deregulation of PAX-5 by translocation of the Emu enhancer of the IgH locus adjacent to two alternative PAX-5 promoters in a diffuse large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 6129–6134.
- Poppe B, De Paepe P, Michaux L, Dastugue N, Bastard C, Herens C et al. PAX5/IGH rearrangement is a recurrent finding in a subset of aggressive B-NHL with complex chromosomal rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; **44**: 218–223.
- Cazzaniga G, Daniotti M, Tosi S, Giudici G, Aloisi A, Pogliani E et al. The paired box domain gene PAX5 is fused to ETV6/TEL in an acute lymphoblastic leukemia case. *Cancer Res* 2001; **61**: 4666–4670.
- Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007; **446**: 758–764.
- Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Niebuhr B, Stocking C, Sanada M et al. Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 11921–11926.
- Nebral K, Denk D, Attarbaschi A, Konig M, Mann G, Haas OA et al. Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2009; **23**: 134–143.
- An Q, Wright SL, Konn ZJ, Matheson E, Minto L, Moorman AV et al. Variable breakpoints target PAX5 in patients with dicentric chromosomes: a model for the basis of unbalanced translocations in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 17050–17054.

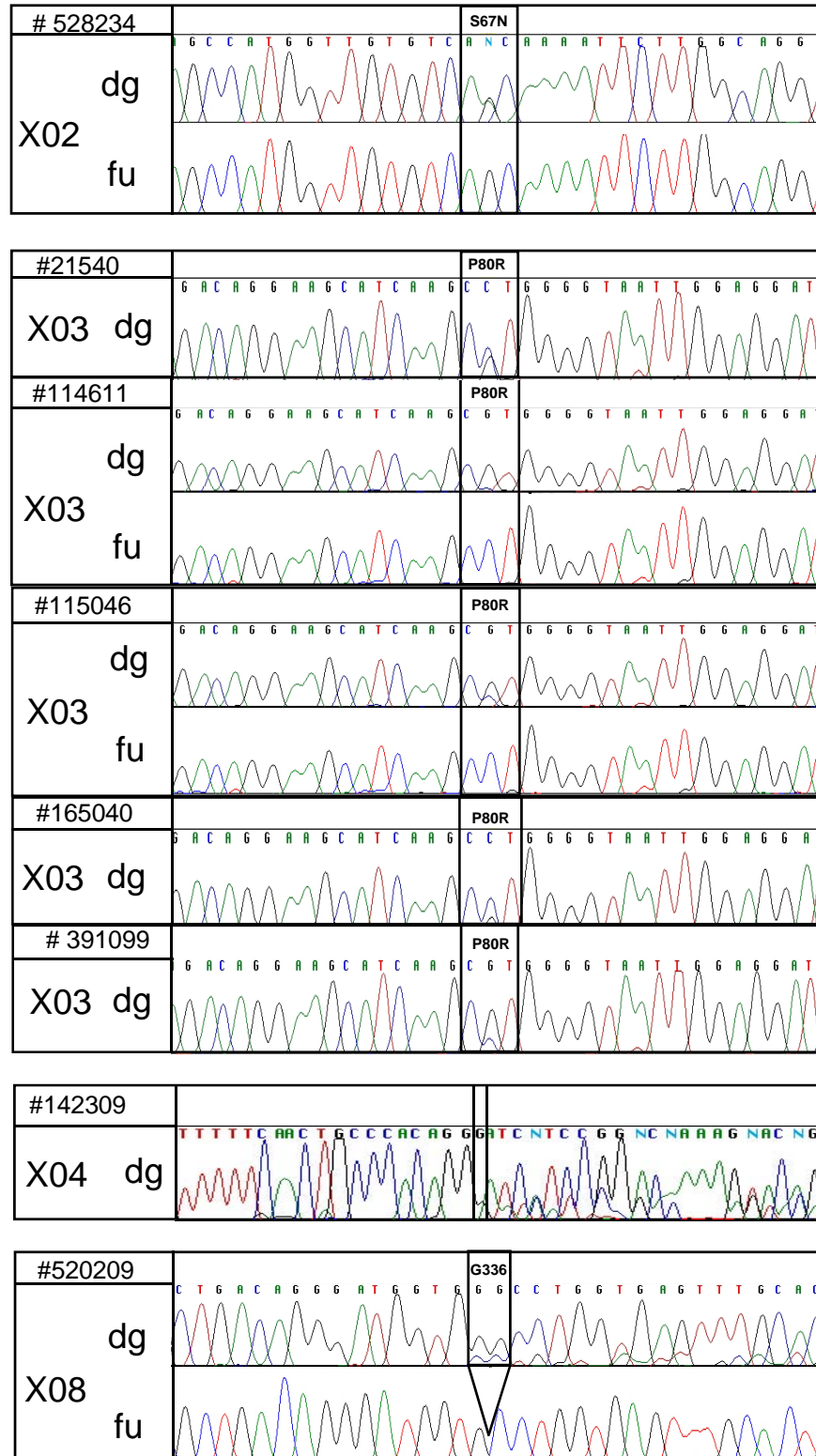
- 16 Bousquet M, Broccardo C, Quelen C, Meggetto F, Kuhlein E, Delsol G *et al.* A novel PAX5-ELN fusion protein identified in B-cell acute lymphoblastic leukemia acts as a dominant negative on wild-type PAX5. *Blood* 2007; **109**: 3417–3423.
- 17 Nebral K, Konig M, Harder L, Siebert R, Haas OA, Strehl S. Identification of PML as novel PAX5 fusion partner in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2007; **139**: 269–274.
- 18 Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 6306–6315.
- 19 Huguet F, Leguay T, Raffoux E, Thomas X, Beldjord K, Delabesse E *et al.* Pediatric-inspired therapy in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: the GRAALL-2003 Study. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 911–918.
- 20 de Labarthe A, Rousselot P, Huguet-Rigal F, Delabesse E, Witz F, Maury S *et al.* Imatinib combined with induction or consolidation chemotherapy in patients with *de novo* Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: results of the GRAAPH-2003 study. *Blood* 2007; **109**: 1408–1413.
- 21 Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, Biegel J, Camitta BM, Cooley LD *et al.* Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; **46**: 684–693.
- 22 van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; **17**: 2257–2317.
- 23 Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; **53**: 457–481.
- 24 Peto R, Peto J. Asymptotically efficient rank invariant test procedures. *J R Stat Soc* 1972; **135**: 185–206.
- 25 Gray R. A class of *k*-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat* 1998; **16**: 1141–1154.
- 26 Kozmik Z, Wang S, Dorfner P, Adams B, Busslinger M. The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 2662–2672.
- 27 Pui CH, Behm FG, Downing JR, Hancock ML, Shurtleff SA, Ribeiro RC *et al.* 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 909–915.
- 28 Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995; **9**: 1783–1786.
- 29 Bertolino E, Reddy K, Medina KL, Parganas E, Ihle J, Singh H. Regulation of interleukin 7-dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5. *Nat Immunol* 2005; **6**: 836–843.
- 30 Paulsson K, Cazier JB, Macdougall F, Stevens J, Stasevich I, Vrcelj N *et al.* Microdeletions are a general feature of adult and adolescent acute lymphoblastic leukemia: unexpected similarities with pediatric disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 6708–6713.
- 31 Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J *et al.* BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008; **453**: 110–114.
- 32 Miller CS, Mullighan CG, Su X, Ma J, Wang M, Zhang J *et al.* Pax5 haploinsufficiency cooperates with BCR-ABL1 to induce acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2008; **112**: 114.
- 33 Mortuza FY, Moreira IM, Papaioannou M, Gameiro P, Coyle LA, Gricks CS *et al.* Immunoglobulin heavy-chain gene rearrangement in adult acute lymphoblastic leukemia reveals preferential usage of J(H)-proximal variable gene segments. *Blood* 2001; **97**: 2716–2726.
- 34 Nutt SL, Urbanek P, Rolink A, Busslinger M. Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev* 1997; **11**: 476–491.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (<http://www.nature.com/leu>)

- **Supplementary files**
- *PAX5* mutations occur frequently in adult B-Cell Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia (BCP-ALL) and are associated with *BCR-ABL1* and *TCF3-PBX1* fusion genes. A GRAALL study
- **Figure S1**
- FISH analysis of two patients (#119339 and #462837) with a der(19)t(1;19) translocation (*TCF3-PBX1* fusion) showing a secondary deletion of *PAX5* RP11-243F8 probe. *TCF3* split signal probes labeled with Texas red (*TCF3* 5') and FITC (*TCF3* 3') visible with the FITC-Texas red-DAPI filter and *PAX5* RP11-243F8 probe labeled with Rhodamine visible both with FITC-Texas red-DAPI filter and FITC-Rhodamine-DAPI filter.
- Patient #119339. Top panel: metaphase with normal *PAX5* signals; bottom panel: nucleus with *PAX5* deletion (only one RP11-243F8 probe signal). Left: FITC-Texas red-DAPI filter allows to detect Texas red *TCF3* 5' signals on chromosomes 19 and der(19); *TCF3* 3' FITC signal on normal chromosome 19. The der(19) has lost the 3' signal as the consequence of the *TCF3-PBX1* fusion. The *PAX5* Rhodamine signals are also detected with this filter. Right panel. FITC-Rhodamine-DAPI filter allows to visualize specifically two (Top) or one (Bottom) *PAX5* Rhodamine signals and *TCF3* 3' FITC signals on the normal chromosome 19. This patient has 80% of the nucleus with a *TCF3-PBX1* fusion and 20% of these nucleus show a secondary deletion of *PAX5*.
- Patient #462837. Top panel: nucleus with normal *PAX5* signals; bottom panel: nucleus with *PAX5* deletion (only one RP11-243F8 probe signal). Left: FITC-Texas red-DAPI filter allows to detect Texas red *TCF3* 5' signals on chromosomes 19 and der(19); *TCF3* 3' FITC signal on normal chromosome 19. The der(19) has lost the 3' signal as the consequence of the *TCF3-PBX1* fusion. The *PAX5* Rhodamine signals are also detected with this filter. Right panel. FITC-Rhodamine-DAPI filter allows to visualize specifically two (Top) or one (Bottom) *PAX5* Rhodamine signals and *TCF3* 3' FITC signals on the normal chromosome 19. This patient has 90% of the nucleus with a *TCF3-PBX1* fusion and 60% of these nucleus show a secondary deletion of *PAX5*.
- **Figure S2**
- HRM analysis for *PAX5* exons 1, 4, 5, 6 and 10. *PAX5* exon 3 analysis was used as validation of the HRM screening.
- **Figure S3**
- Analysis of *PAX5* point mutations
- Sequence chromatographs of *PAX5* mutants performed on genomic DNA at diagnosis (dg) and follow up (fu) when available. Nucleotide sequence is shown on the top of each panel. Patient number are given on top of each frame..
- **Table S1**
- Primer sequences
- **Table S2**
- Genomic *PAX5* quantification and classification of the GRAALL-2003/GRAAPH-2003 patients in 4 groups regarding the *PAX5* mutations.
- This table shows the study identification number of patients and raw data of quantification of each *PAX5* exons. Four groups were defined as Normal, Deletion, Mutation and Amplification.
- **Table S3**
- *PAX5* FISH validation of normal cases (normal *PAX5*), deletion-only cases (deleted *PAX5*) and mutant cases (mutant *PAX5*) using the *PAX5* DAKO probe.
- **Table S4**
- Deletion 9p regarding *PAX5* status. 0: no deletion; 1: deletion.
- **Table S5**
- Clinical and biological data
- Clinical features of GRAALL-2003/GRAAPH-2003 patients included in this analysis. The first column shows the study identification number of patients. The second column shows their *PAX5* status. The third column indicates their age in years. The fourth column indicates their gender (F: female, M: male). The fifth column reports the corticosenstivity (S) or corticoresistance (R) during the 7-day prephase of steroid therapy (NA when information is not available). The sixth column reports the chemosensitivity (S) or resistance (R) during the induction course. The seventh column provides the graft status (Yes when engrafted). The eighth column indicates the achievement (Yes) or not (No) of complete remission (CR1) by the patient. The ninth column indicates whether relapse occurred after the first complete remission as relapse (Yes) or absence (No). The tenth column provides the patient status as dead (Yes) or alive (No). The last column shows cytogenetic/molecular subgroups. Normal : no cytogenetic/molecular abnormality; BCR-ABL1 : Ph chromosome/BCR-ABL1; MLL : MLL rearrangement; TCF3-PBX1; hypo-triploid : hypodiploidy 30-40 chromosomes and/or near-triploidy 60-80 chromosomes; 51-65 : high hyperdiploidy 51-65 chromosomes; 47-50 : low hyperdiploidy 47-50 chromosomes; 41-45: hypodiploidy 41-45 chromosomes; complex : 5 or more chromosomal abnormalities; other : chromosomal abnormality not otherwise classified.







Primers for quantitative PCR analysis

HsPAX5 X1F	5'-TTC CCT GTC CAT TCC ATC AAG-3'
HsPAX5 X1R	5'-GCA CAT CTG GAG CCC GTA TC-3'
HsPAX5 X2aF	5'-CTT CTC CTA TGT GAC TGG TTC TAA CTA CC-3'
HsPAX5 X2aR	5'-AGA TGT CGC AGG GCC TGA-3'
HsPAX5 X2bF	5'-GGA TGT AGT CCG CCA GAG GAT-3'
HsPAX5 X2bR	5'-AAG ATC AAG GGA AGC CTC GAG-3'
HsPAX5 X3aF	5'-TTA CTG GTT CCT CAT GGC TAA GCT-3'
HsPAX5 X3aR	5'-AAA CAT GGT GGG ATT TTG GC-3'
HsPAX5 X3bF	5'-AGG TCG CCA CAC CCA AAG T-3'
HsPAX5 X3bR	5'-CCT GCC ATC CCT CCA AAT C-3'
HsPAX5 X4F	5'-TCC TTC CTG ATG GTA AAT AGC AAT T-3'
HsPAX5 X4R	5'-TCT TTA GAA TAT TTG GAG CCC ATT AGA-3'
HsPAX5 X5F	5'-CCT GAC CGC CCG TCT TT-3'
HsPAX5 X5R	5'-ACC CCG TGG AGC GCA T-3'
HsPAX5 X6aF	5'-CGT GTA TAA CCT CCA CTC ACC CT-3'
HsPAX5 X6aR	5'-GCC TCT CAA ACA CGC GGT-3'
HsPAX5 X6bF	5'-CGG AAG CAG ATG CGG G-3'
HsPAX5 X6bR	5'-TGG TGG GCG TGC ATC AC-3'
HsPAX5 X7F	5'-GGC ATT TGA CTA AGG TAC TGT GGA-3'
HsPAX5 X7R	5'-ATG CCC CAG GTG CCC T-3'
HsPAX5 X8F	5'-CGA AGA TGC TCA CCC TGT GAT-3'
HsPAX5 X8R	5'-AGA CGC CGA CAG TGC AAA C-3'
HsPAX5 X9F	5'-GGA TTT GAC GTT TGG TTC CTG-3'
HsPAX5 X9R	5'-GGG TAG CTG ATG GCC CAA G-3'
HsPAX5 X10F	5'-CGG ATC TGA CCT CGG TGC T-3'
HsPAX5 X10R	5'-CAC CCT CAA TAG GTG CCA TCA-3'
Ref15F	5'-CCT GAA GCT GAC AGC ATT CG-3'
Ref15R	5'-TCA CGC TGG ATA GCC TCC A-3'
Ref16F	5'-AGC AGC ACC TCC CAA CTC C-3'
Ref16R	5'-CAT GGT GCT CCA AAC CTG G-3'

Primers for point mutation analysis

PAX5X01_F2	5'-TTT TCC CTG TCC ATT CCA TCA-3'
PAX5X01_R2	5'-GCA CAT CTG GAG CCC GTA TC-3'
PAX5X02_22U19	5'-GGT CCT CAC AGC GGT GCT T-3'
PAX5X02_320L20	5'-TTG GAC AGC TGC TGG GTC AT-3'
PAX5X03_28U22	5'-AGC CCG TTA TTT TGT TGC CAA T-3'
PAX5X03_361L21	5'-CTT CAG GAA AGG CAC ATG CAG-3'
PAX5X04_F2	5'-AAT TTT GTT TTT CAA CTG CCC AC-3'
PAX5X04_R2	5'-TTT TAA AAG TTC CTC TTA CCT ATG CTG TG-3'
PAX5X05_F2	5'-GAC CGC CCG TCT TTC TCC-3'
PAX5X05_R2	5'-GCG CGG GCC TCT CTT AC-3'
PAX5X06_F2	5'-CAC CCT TCC TCT CTC CTG CTC-3'
PAX5X06_R2	5'-CGT GCA TCA CGA GGC GTA C-3'
PAX5X07_32U21	5'-CGT GGA GTT GGC ATT TGA CTA-3'
PAX5X07_278L22	5'-TCT TCC CAC CAC ACA CTC CTA T-3'
PAX5X08_9U21	5'-TGA CAA ATG TGC AGA AGC GTC-3'
PAX5X08_271L19	5'-GGT CAC CCA GGC TGT TTG G-3'
PAX5X09_29U18	5'-TGG GAC CCA GGG CCT TTT-3'
PAX5X09_229L19	5'-GAG GCC TGG ATG GGG TAG C-3'
PAX5X10_F2	5'-GCT CTC TCC CGT CTC TTC CA-3'
PAX5X10_R2	5'-GTG TTT GGT GCC CGC CT-3'

Primers for cDNA analysis

PAXQ (X01)	5'-CCC TGT CCA TTC CAT CAA GTC CTG-3'
PCR5 (X10)	5'-GGC TGG GCT GGG GCT GCG GTT ATT T-3'

Primers for VH6-1 analysis

VH6 FR2 primer	5'-TGG ATC AGG CAG TCC CCA TCG AGA G-3'
JH consensus primer	5'-CTT ACC TGA GGA GAC GGT GAC C-3'

Familiades *et al.*
Table S2

GRAALLid	X01	X02	X03	X04	X05	X06	X07	X08	X09	X10	PAX5 Conclusion	PAX5 group
12801	1.10	1.20	1.16	1.05	0.98	1.09	1.03	1.15	1.05	1.11	Normal	Normal
19045	0.57	0.55	0.52	0.61	0.62	0.57	0.61	0.50	0.60	0.62	Total hemizyosity	Deletion
19284	1.09	1.10	1.04	1.09	1.01	1.08	0.93	1.06	1.11	1.10	Normal	Normal
21540	1.05	1.12	1.03	1.08	1.12	1.10	1.03	1.00	1.02	1.00	Normal + P80R	Mutation
22487	0.99	1.12	1.15	1.17	1.18	1.03	1.09	1.15	1.01	1.00	Normal	Normal
23190	0.95	1.13	1.13	1.19	1.21	1.11	1.07	1.17	1.15	0.99	Normal	Normal
26240	0.98	1.00	1.00	1.09	1.06	0.95	1.00	1.08	1.02	0.95	Normal	Normal
27195	0.67	0.74	0.77	0.82	0.81	0.74	0.75	0.78	0.81	0.76	Total hemizyosity	Deletion
28834	1.11	1.12	1.13	1.12	1.17	1.12	1.11	0.99	1.13	1.10	Normal	Normal
30712	1.00	1.08	0.91	0.93	0.98	1.16	1.08	0.93	1.08	1.00	Normal	Normal
35267	0.89	0.85	0.87	0.89	0.94	0.93	0.97	0.97	0.89	0.93	Normal	Normal
40112	1.14	1.21	1.16	1.19	1.16	1.17	1.12	1.16	1.07	1.06	Normal	Normal
41663	0.88	0.85	0.87	0.87	0.91	0.88	0.99	1.01	0.83	0.88	Normal	Normal
41756	1.05	1.05	0.98	0.89	1.02	1.12	1.04	0.80	1.09	0.98	Normal + PAX5-ELN	Mutation
43144	1.03	0.94	1.00	0.93	0.91	1.03	1.00	0.95	0.87	0.87	Normal	Normal
43205	0.92	0.93	0.88	0.86	0.98	0.85	0.85	1.02	0.93	1.01	Normal	Normal
43389	1.00	0.97	1.10	1.07	0.98	1.04	0.94	1.01	0.93	0.95	Normal	Normal
44115	1.10	1.03	1.04	1.04	1.06	1.08	1.12	1.00	1.07	1.12	Normal	Normal
45851	1.02	1.12	1.09	1.06	1.06	1.07	0.98	1.12	1.05	0.98	Normal	Normal
46165	0.91	0.84	0.88	0.88	0.94	0.92	0.88	0.85	1.01	0.85	Normal	Normal
49490	0.46	0.41	0.31	0.36	0.56	0.41	0.43	0.43	0.58	0.43	Total hemizyosity	Deletion
49833	0.86	0.98	0.88	1.00	1.04	0.87	0.99	0.85	1.02	0.94	Normal	Normal
60337	0.95	1.00	0.91	0.89	0.99	1.09	1.08	1.13	1.00	0.98	Normal	Normal
62174	1.08	1.12	1.08	1.14	1.07	1.04	1.08	0.91	1.11	1.03	Normal	Normal
62902	1.08	4.36	4.25	4.11	4.40	0.86	0.92	0.99	1.00	1.01	Amplification X2-X5	Mutation
63467	0.56	0.56	0.62	0.58	0.75	0.47	0.44	0.62	0.46	0.62	Total hemizyosity	Deletion
63489	0.93	0.93	0.92	0.89	1.02	0.93	0.93	0.95	0.89	0.94	Normal	Normal
66544	1.00	0.98	1.07	1.03	0.95	0.92	0.97	0.95	0.98	1.00	Normal	Normal
66590	1.00	0.58	0.68	0.63	0.62	0.58	1.01	1.01	1.00	0.99	Hemizyosity X2-X6	Mutation
67449	1.02	1.00	1.09	1.05	0.98	0.94	1.00	0.99	0.97	0.99	Normal	Normal
100728	0.79	0.74	0.66	0.76	0.83	0.73	0.75	0.83	0.76	0.74	Total hemizyosity	Deletion
111379	0.87	0.81	0.68	0.87	0.89	0.87	0.99	0.93	0.94	1.00	Normal	Normal
111599	0.88	0.98	0.92	0.86	0.95	0.93	0.99	1.06	0.88	0.91	Normal	Normal
111710	1.04	1.07	1.00	1.01	1.03	1.09	1.02	0.93	1.11	1.09	Normal	Normal
113739	0.55	0.54	0.52	0.49	0.43	0.50	0.55	0.58	0.56	0.56	Total hemizyosity	Deletion
114059	1.07	1.13	1.10	1.17	1.13	1.14	1.05	1.07	1.09	1.07	Normal	Normal
114117	0.49	0.46	0.43	0.41	0.45	0.46	0.46	0.43	0.43	0.47	Total hemizyosity	Deletion
114327	1.67	1.58	1.52	1.65	1.57	1.70	1.58	1.47	1.50	1.57	Total amplification (x1.5)	Amplification
114611	0.46	0.47	0.40	0.43	0.59	0.49	0.56	0.66	0.50	0.55	Total hemizyosity + P80R	Mutation
114917	0.85	0.95	1.01	0.87	1.17	0.92	0.89	1.08	0.83	0.83	Normal	Normal
115046	0.62	0.68	0.63	0.67	0.69	0.62	0.62	0.79	0.63	0.63	Total hemizyosity + P80R	Mutation
116001	1.16	1.12	1.11	1.09	1.09	1.11	1.08	0.92	1.13	1.11	Normal	Normal
119339	0.86	0.82	0.75	0.81	0.84	0.76	0.81	0.81	0.85	0.81	Total hemizyosity	Deletion
119689	1.15	1.13	0.93	1.16	1.15	1.15	1.10	0.89	1.17	1.16	Normal	Normal
142309	1.00	1.01	1.07	1.04	1.03	1.03	1.03	0.94	1.05	0.97	Normal + FS I138	Mutation
144051	0.94	0.52	0.51	0.43	0.45	0.58	1.03	1.12	1.03	1.02	Hemizyosity X2-X6	Mutation
144948	1.15	1.25	1.28	1.07	1.08	1.09	1.00	1.00	0.95	1.09	Normal	Normal
160256	1.07	1.10	1.10	1.07	1.20	1.05	1.00	0.89	1.00	0.99	Normal	Normal
161949	1.11	1.05	1.07	0.94	0.93	1.04	1.12	1.00	1.09	1.15	Normal	Normal
163834	1.15	1.04	1.11	0.92	0.82	1.16	1.13	1.15	1.14	1.17	Normal	Normal
165040	1.13	1.08	1.11	1.12	1.15	1.12	1.12	1.24	1.12	1.15	Normal + P80R	Mutation
196541	1.02	0.46	0.46	0.37	0.40	0.51	0.91	0.98	0.92	0.93	Hemizyosity X2-X6	Mutation
196712	0.95	1.13	1.12	0.87	1.64	0.75	1.12	1.00	1.26	1.14	Amplification X5	Mutation
198985	0.97	1.05	1.07	1.08	1.00	1.07	1.08	1.03	1.05	0.93	Normal	Normal
208754	1.09	1.01	1.04	1.12	1.05	1.09	1.05	0.90	1.05	1.07	Normal	Normal
214767	1.02	1.08	1.06	1.18	1.15	1.07	1.05	1.11	1.12	1.12	Normal	Normal
249878	0.89	0.92	0.93	0.91	0.94	0.97	0.98	1.11	0.93	0.88	Normal	Normal
257006	0.99	0.82	0.93	0.96	0.86	0.92	0.89	0.91	0.87	1.03	Normal	Normal
259440	1.29	0.64	0.73	0.68	0.68	0.66	0.62	0.52	1.12	1.13	Hemizyosity X2-X8	Mutation
268218	1.00	0.95	1.11	1.09	0.99	0.94	1.03	0.88	1.03	0.99	Normal	Normal
269228	0.97	0.69	0.80	0.73	0.91	0.50	0.72	0.62	0.93	0.93	Hemizyosity X2-X8	Mutation
300084	0.98	1.09	1.01	0.93	1.06	1.11	1.05	0.97	1.03	0.93	Normal	Normal
300501	1.40	0.91	0.87	0.37	0.23	0.93	0.87	0.89	0.94	1.07	Hemizyosity X4-X5	Mutation
301228	1.08	0.82	0.93	0.68	0.51	0.91	0.93	0.75	0.88	0.93	Hemizyosity X4-X5	Mutation
391099	0.62	0.51	0.56	0.49	0.63	0.51	0.52	0.50	0.55	0.56	Total hemizyosity + P80R	Mutation
391488	0.98	0.95	0.98	0.88	0.92	1.08	1.01	0.95	1.02	0.98	Normal	Normal
393428	1.05	1.12	1.03	1.12	1.07	1.10	1.00	0.96	1.10	1.02	Normal	Normal
395812	0.98	0.92	1.00	0.94	1.01	1.07	0.98	1.08	0.94	0.92	Normal	Normal
398828	0.95	1.01	1.00	0.89	1.08	1.11	0.88	1.00	0.93	0.98	Normal	Normal
399539	0.49	0.46	0.58	0.46	0.56	0.44	0.48	0.43	0.62	0.56	Total hemizyosity	Deletion
412334	0.87	0.82	0.87	0.83	0.87	0.93	0.92	0.93	0.91	0.92	Normal	Normal
414538	0.94	0.93	0.97	0.86	0.89	0.91	0.94	0.89	0.93	0.98	Normal	Normal
416252	0.93	1.01	0.86	0.93	0.98	0.94	0.92	1.05	0.93	0.97	Normal	Normal
417660	0.54	0.50	0.50	0.46	0.61	0.50	0.56	0.56	0.56	0.55	Total hemizyosity	Deletion
449962	1.05	0.85	0.91	0.73	0.85	0.98	0.93	0.87	0.93	0.94	Normal	Normal
454251	0.92	1.07	0.87	1.09	1.02	0.99	1.05	0.85	0.95	0.94	Normal	Normal
460162	1.02	0.98	0.98	1.07	1.11	1.00	1.00	1.10	1.00	0.98	Normal	Normal
462085	0.91	1.00	0.99	0.89	1.00	1.09	0.93	0.98	0.91	0.98	Normal	Normal
462837	0.75	0.79	0.75	0.76	0.75	0.75	0.62	0.74	0.62	0.74	Total hemizyosity	Deletion
464556	0.95	1.00	0.89	0.96	0.91	1.02	1.03	1.09	1.01	1.04	Normal	Normal
465493	1.03	1.08	1.11	1.14	1.10	0.98	1.05	1.04	1.09	1.03	Normal	Normal
467102	1.02	0.94	0.80	0.95	0.64	0.81	0.69	0.68	0.66	1.01	Hemizyosity X5-X9	Mutation
468038	0.64	0.66	0.68	0.62	0.65	0.63	0.62	0.56	0.62	0.60	Total hemizyosity	Deletion
468581	1.10	1.16	1.10	1.12	1.14	1.08	0.97	0.95	0.94	1.08	Normal	Normal
468962	0.67	0.61	0.66	0.52	0.56	0.73	0.95	1.05	0.88	0.87	Hemizyosity X1-X6	Deletion
469588	0.88	0.94	0.87	0.93	0.94	0.97	1.00	0.89	0.95	1.02	Normal	Normal
480251	0.81	0.81	0.63	0.68	0.81	0.84	0.82	0.74	0.83	0.83	Total hemizyosity	Deletion
482001	1.19	1.04	1.07	1.01	0.96	0.93	0.79	0.64	0.71	1.14	Hemizyosity X7-X9	Mutation
483655	1.00	1.01	1.07	1.12	1.06	1.05	1.01	1.10	1.01	1.08	Normal	Normal
485101	0.87	0.86	0.83	0.73	0.88	0.83	0.82	0.75	0.81	0.83	Total hemizyosity	Deletion
486601	1.09	1.08	1.16	1.15	1.2	1.02	1.00	1.04	0.99	1.00	Normal	Normal
489045	1.08	0.81	0.86	0.93	1.02	1.04	1.09	1.00	1.04	1.08	Normal	Normal
491378	1.10	1.17	1.12	1.16	1.03	1.09	0.98	1.10	1.09	1.10	Normal	Normal
492117	0.61	0.64	0.61	0.62	0.67	0.58	0.57	0.50	0.62	0.60	Total hemizyosity	Deletion
493773	0.89	0.98	1.00	0.99	0.97	0.86	1.01	1.10	0.93	0.91	Normal	Normal
493839	1.00	1.08	1.12	1.05	1.11	1.07	1.03	0.98	1.02	1.00	Normal	Normal
495035	0.95	0.88	0.89	1.04	1.05	0.99	1.09	0.88	1.08	1.02	Normal	Normal
509595	1.08	1.08	1.12	1.14	1.09	1.03	1.00	0.95	1.10	1.04	Normal	Normal
520209	0.64	0.57	0.58	0.64	0.69	0.63	0.68	0.71	0.75	0.69	Total hemizyosity + FS G336	Mutation
527091	1.00	0.46	0.44	0.37	0.42	0.46	0.95	0.98	1.00	1.02	Hemizyosity X2-X6	Mutation
528234	0.58	0.62	0.60	0.61	0.62	0.67	0.62	0.61	0.63	0.60	Total hemizyosity + S67N	Mutation
529117	1.04	1.07	1.02	1.09	0.97	1.14	1.14					

GRAALLid	PAX5 Status	PAX5 FISH validation
144948	Normal	+/+
464556	Normal	+/+
49490	Deletion	+/-
100728	Deletion	+/-
114117	Deletion	+/-
119339	Deletion	+/-
462837	Deletion	+/-
62902	Mutant	+/+
66590	Mutant	+/+
144051	Mutant	+/+
196712	Mutant	+/+
301228	Mutant	+/+
391099	Mutant	+/-

Familiades *et al.*
Table S4

GRAALLid	PAX5_Status	CG_del9p
19045	Deletion	0
27195	Deletion	1
49490	Deletion	0
63467	Deletion	0
100728	Deletion	1
113739	Deletion	0
114117	Deletion	1
119339	Deletion	0
399539	Deletion	0
417660	Deletion	0
462837	Deletion	Failure
468038	Deletion	1
468962	Deletion	0
480251	Deletion	0
485101	Deletion	0
492117	Deletion	No information
533899	Deletion	Failure
21540	Mutation	0
41756	Mutation	0
62902	Mutation	1
66590	Mutation	0
114611	Mutation	1
115046	Mutation	0
142309	Mutation	0
144051	Mutation	0
165040	Mutation	0
196541	Mutation	0
196712	Mutation	0
259440	Mutation	0
269228	Mutation	0
300501	Mutation	0
301228	Mutation	0
391099	Mutation	1
467102	Mutation	0
482001	Mutation	0
520209	Mutation	0
527091	Mutation	0
528234	Mutation	No information

Familiades *et al.*
Table S5

GRAALLid	PAX5	Age	Sex	Corticoids	Chemotherapy	Graft	CR1	Relapse1	Death	Cytogenetic
12801	Normal	40	F	S	R		Yes	No	No	TCF3-PBX1
19284	Normal	44	M	R	S		Yes	Yes	Yes	TCF3-PBX1
22487	Normal	43	F	S	S		No	NA (no CR)	Yes	MLL
23190	Normal	21	F	R	S	Yes	Yes	Yes	Yes	MLL
26240	Normal	46	F	S	S		No	NA (no CR)	Yes	Normal
28834	Normal	22	F	S	S		Yes	No	No	Normal
30712	Normal	21	M	R	S	Yes	Yes	No	No	51-65
35267	Normal	28	M	S	S		Yes	No	No	BCR-ABL1
40112	Normal	46	M	S	S		Yes	No	No	47-50
41663	Normal	31	F	S	R		Yes	Yes	Yes	Normal
43144	Normal	24	M	R	R	Yes	Yes	No	No	Normal
43205	Normal	48	M	R	S		No	NA (no CR)	Yes	Other
43389	Normal	57	F	S	R	Yes	Yes	No	No	BCR-ABL1
44115	Normal	41	M	S	R		Yes	NA	NA	BCR-ABL1
45851	Normal	50	M	S	S		Yes	No	No	MLL
46165	Normal	48	F	S	NA		No	NA (no CR)	Yes	MLL
49833	Normal	36	M	S	S		Yes	Yes	No	TCF3-PBX1
60337	Normal	19	M	R	R		No	NA (no CR)	Yes	47-50
62174	Normal	32	M	S	R	Yes	Yes	No	No	MLL
63489	Normal	45	M	S	S	Yes	Yes	No	No	BCR-ABL1
66544	Normal	21	M	S	R	Yes	Yes	No	No	Normal
67449	Normal	19	F	S	R		Yes	Yes	No	Other
111379	Normal	45	M	S	S	Yes	Yes	No	Yes	BCR-ABL1
111599	Normal	37	F	S	R	Yes	Yes	No	No	Normal
111710	Normal	26	M	S	S	Yes	Yes	No	No	Normal
114059	Normal	37	M	NA	NA		NA	NA	Yes	Complex
114917	Normal	22	M	S	S	Yes	Yes	No	No	Normal
116001	Normal	27	F	S	S	Yes	Yes	No	No	Other
119689	Normal	29	M	S	R	Yes	No	NA (no CR)	No	Normal
144948	Normal	50	M	R	R	Yes	Yes	No	No	Complex
160256	Normal	27	F	R	R	Yes	Yes	Yes	No	BCR-ABL1
161949	Normal	55	F	R	R	Yes	NA	No	No	BCR-ABL1
163834	Normal	21	M	S	S	Yes	Yes	No	No	BCR-ABL1
198985	Normal	24	F	S	R		Yes	No	No	Failure
208754	Normal	32	F	S	S		Yes	No	No	MLL
214767	Normal	57	M	S	S		Yes	NA (no CR)	Yes	Complex
249878	Normal	23	M	S	S	Yes	Yes	No	No	Other
257006	Normal	38	M	S	NA		NA	NA	NA	BCR-ABL1
268218	Normal	51	M	S	S		Yes	No	No	Normal
300084	Normal	43	M	S	S		Yes	No	No	Failure
391488	Normal	51	M	S	R		Yes	No	Yes	47-50
393428	Normal	51	F	S	R	Yes	Yes	No	Yes	Normal
395812	Normal	30	M	S	R		Yes	Yes	Yes	Other
398828	Normal	45	F	R	R	Yes	Yes	No	No	BCR-ABL1
412334	Normal	44	M	S	S	Yes	Yes	No	Yes	MLL
414538	Normal	32	M	R	R	Yes	Yes	Yes	Yes	Normal
416252	Normal	49	F	S	R		Yes	No	No	Normal
449862	Normal	50	M	R	R	Yes	Yes	Yes	Yes	47-50
454251	Normal	33	F	S	S		No	NA (no CR)	Yes	Complex
460162	Normal	20	M	S	S		Yes	No	No	Failure
462085	Normal	58	M	R	R		Yes	Yes	No	Normal
464556	Normal	24	M	R	R	Yes	Yes	Yes	Yes	BCR-ABL1
465493	Normal	19	F	S	R	Yes	Yes	Yes	Yes	MLL
468581	Normal	34	F	R	R	Yes	Yes	No	Yes	Normal
469588	Normal	56	F	R	R		Yes	Yes	Yes	47-50
483655	Normal	44	F	S	NA		Yes	No	No	MLL
486601	Normal	48	F	S	NA		Yes	No	Yes	MLL
489045	Normal	17	F	S	R		Yes	No	No	Normal
491378	Normal	21	F	S	R		Yes	No	No	Other
493773	Normal	53	F	S	R		Yes	Yes	Yes	Complex
493839	Normal	22	M	S	R		Yes	No	No	47-50
495035	Normal	23	M	S	S		Yes	No	No	NA
509595	Normal	18	F	S	S		Yes	No	Yes	51-65
529117	Normal	55	M	S	S		Yes	No	No	Failure
529440	Normal	23	M	S	S		No	NA (no CR)	Yes	Other
534451	Normal	17	M	S	S		Yes	No	No	Normal
536484	Normal	56	M	S	R	Yes	Yes	No	No	BCR-ABL1
538339	Normal	37	F	S	S	Yes	Yes	No	No	BCR-ABL1
540645	Normal	33	M	S	R		Yes	Yes	Yes	Normal
543105	Normal	30	M	S	S		Yes	Yes	Yes	Normal
594267	Normal	25	F	S	NA		Yes	No	No	47-50
608040	Normal	32	M	S	R		Yes	No	Yes	Other
627943	Normal	48	M	S	R	Yes	Yes	No	No	Normal
644440	Normal	53	F	NA	NA		Yes	Yes	No	BCR-ABL1
644945	Normal	60	M	R	R	Yes	Yes	Yes	Yes	Failure
648106	Normal	58	M	NA	NA		Yes	NA	Yes	BCR-ABL1
682261	Normal	43	F	R	R	Yes	Yes	No	No	47-50
19045	Deletion	49	M	S	R		Yes	No	Yes	BCR-ABL1
27195	Deletion	39	F	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes	BCR-ABL1
49490	Deletion	22	M	S	S		Yes	No	No	Complex
63467	Deletion	55	F	S	R		Yes	Yes	Yes	BCR-ABL1
100728	Deletion	47	M	S	S		Yes	No	No	BCR-ABL1
113739	Deletion	24	F	R	S		Yes	No	No	TCF3-PBX1
114117	Deletion	44	F	S	R		Yes	No	No	BCR-ABL1
119339	Deletion	21	M	S	S	Yes	Yes	Yes	Yes	TCF3-PBX1
399539	Deletion	51	M	R	R	Yes	Yes	No	No	BCR-ABL1
417660	Deletion	49	M	S	S	Yes	Yes	No	No	BCR-ABL1
462837	Deletion	25	M	S	S	Yes	Yes	No	No	TCF3-PBX1
468038	Deletion	16	M	S	R	Yes	Yes	No	No	BCR-ABL1
468962	Deletion	59	F	R	R		Yes	No	Yes	BCR-ABL1
480251	Deletion	24	M	S	R		Yes	No	No	51-65
485101	Deletion	34	M	S	S		Yes	Yes	No	41-45
492117	Deletion	55	M	S	R		No	NA (no CR)	Yes	Other
533899	Deletion	20	F	S	S		Yes	No	No	Failure
21540	Mutation	44	M	S	S		Yes	No	No	Other
41756	Mutation	37	M	R	R	Yes	Yes	Yes	Yes	Other
62902	Mutation	20	M	S	S		No	NA (no CR)	Yes	Complex
66590	Mutation	37	M	S	R	Yes	Yes	Yes	Yes	Other
114611	Mutation	60	F	S	S		Yes	No	No	Other
115046	Mutation	25	F	S	S		Yes	Yes	Yes	Normal
142309	Mutation	55	F	S	S	Yes	Yes	No	Yes	BCR-ABL1
144051	Mutation	41	M	S	R	Yes	Yes	Yes	Yes	BCR-ABL1
165040	Mutation	16	M	S	S		Yes	No	No	Normal
196541	Mutation	21	M	S	R	Yes	Yes	No	Yes	Normal
196712	Mutation	52	M	S	S		Yes	No	No	Complex
259440	Mutation	18	M	S	R	Yes	Yes	Yes	Yes	Other
269228	Mutation	38	M	R	R	Yes	Yes	No	No	BCR-ABL1
300501	Mutation	48	F	S	R	Yes	Yes	No	No	51-65
301228	Mutation	56	M	NA	NA		NA	NA	Yes	BCR-ABL1
391099	Mutation	25	M	S	S		Yes	No	No	Other
467102	Mutation	36	M	R	R	Yes	Yes	No	No	MLL
482001	Mutation	18	F	S	R		Yes	Yes	No	Normal
520209	Mutation	23	M	S	R		Yes	Yes	Yes	BCR-ABL1
527091	Mutation	56	M	R	R		No	NA (no CR)	Yes	BCR-ABL1
528234	Mutation	21	M	S	S		Yes	Yes	Yes	Failure
114327	Amplification	55	F	S	S		NA	NA	NA	Complex
556145	Amplification	58	M	S	S		No	NA (no CR)	Yes	Hypo/Triploid

2. De nouvelles translocations de PAX5 retrouvées dans les LAL-B (étude du GFCH)

Article 2: Wide diversity of PAX5 alterations in B-ALL: a Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique study

Coyaud E, Struski S, Prade N, **Familiades J**, Eichner R, Quelen C, Bousquet M, Mugneret F, Talmant P, Pages MP, Lefebvre C, Penther D, Lippert E, Nadal N, Taviaux S, Poppe B, Luquet I, Baranger L, Eclache V, Radford I, Barin C, Mozziconacci MJ, Lafage-Pochitaloff M, Antoine-Poirel H, Charrin C, Perot C, Terre C, Brousset P, Dastugue N, Broccardo C.

Des translocations impliquant PAX5 ont été mises en évidence. Les protéines de fusions impliquant PAX5 contribueraient à la pathogenèse des LAL-B en agissant comme des répresseurs constitutifs qui antagoniseraient l'activité de PAX5 sauvage. Ces chimères de PAX5 conservent leur domaine de liaison à l'ADN et leur signal de localisation au noyau, de ce fait elles ont la possibilité de se fixer sur les cibles de PAX5 et en fonction de leur dose peuvent gêner voire remplacer PAX5 sur ses cibles.

Les mutations somatiques de *PAX5* sont fréquentes dans les LAL-B de l'enfant et de l'adulte. Toutefois, les anomalies chromosomiques comme les translocations demeurent assez rare dans ce panel de mutations. L'étude des altérations de *PAX5* dans les LAL-B a été réalisée sur une cohorte du Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH) de 153 patients, enfants et adultes mélangés, possédant un réarrangement acquis du 9p. En utilisant des techniques classiques de cytogénétiques et une nouvelle technique développée au sein de notre laboratoire, cette étude s'est intéressée à rechercher les anomalies du 9p, en se concentrant plus particulièrement sur le statut de *PAX5*.

Le criblage de tous les patients a été réalisé par FISH. Cette première analyse a permis une classification des patients en 3 groupes : *PAX5* n'était pas altéré dans 29 cas (point de cassure télomérique), un point de cassure centromérique a été observé chez 92 patients et 32 cas possédaient un point de cassure interne à *PAX5*.

Parmi ces points de cassure interne à *PAX5*, on note une certaine hétérogénéité dans leur distribution. La plupart se situe entre l'exon 4, correspondant à la fin du domaine de liaison à l'ADN de *PAX5* et l'exon 6 codant l'homéodomaine. Il est retrouvé plus fréquemment chez les enfants que chez les adultes.

Les enfants et les adultes présentent la même fréquence de réarrangements dicentriques dont la majorité conduit à une délétion monoallélique de *PAX5*. Parmi ces patients, seulement 5 ne possèdent pas de délétion de *PAX5* et 12 présentent un point de cassure interne associé à une

délétion partielle ou sans délétion du gène. Ainsi, nous avons montré que l'implication de réarrangements dicentriques du 9p était associée à des délétions de *PAX5* ou à des réarrangements internes dans approximativement 90 % de cas.

L'analyse moléculaire de ces points de cassure interne a été réalisée par une nouvelle technique développée au laboratoire, la RCA-RACE. Cette technique consiste en la circularisation de l'ADN complémentaire de patient, puis par l'utilisation d'une enzyme processive permettant la polymérisation de brins concaténés très long. Il a été identifié des translocations récurrentes précédemment décrites, fusionnant le gène *PAX5* aux gènes *ETV6*, *JAK2*, *ELN*, *FOXPI* et *POM121*. De plus, cette analyse moléculaire a permis la description de 3 nouveaux réarrangements de *PAX5* : la t(X;9)(q21;p13), juxtaposait l'exon 5 du gène *PAX5* avec l'exon 3 du gène *Dachshund 2 (DACH2)*, la translocation t(9;17)(p13;p11) a conduit à la création d'un transcrite chimérique fusionnant l'exon 5 de *PAX5* à l'exon 43 de *Nuclear receptor Co-Repressor 1 (NCoR1)* et le dernier transcrite détecté issu de la translocation t(9;15)(p13;q24), juxtaposait l'exon 6 de *PAX5* à l'exon 3 de *golgi autoantigen, golgin subfamily a 6 (GOLGA6)*. De plus, la translocation t(9;17)(p13;q11), *PAX5* est cassé à l'intérieur de l'intron 5/intron 6 fusionné à intron 19/intron 20 de *TAO kinase 1 (TAOK1)* dans le cadre inverse à son cadre de lecture.

5 cas ont conduit à la production d'un transcrite tronqué de *PAX5* constitué uniquement des 5 premiers exons. Un test d'activité luciférase sur ce mutant a montré qu'il agissait comme un inhibiteur compétitif de *PAX5* sauvage.

Les différents types d'anomalies semblent agir à divers niveau du processus leucémique. La majorité garde le domaine de liaison à l'ADN et le NLS de *PAX5*, suggérant fortement une modulation de l'activité la protéine sauvage de manière dominant négatif.

Ma contribution à cet article a été d'effectuer la détection des mutations ponctuelles potentielles de *PAX5* à l'aide d'une technique de criblage mis en place durant ma thèse. La HRM (High Resolution Melting) m'a permis de vérifier de manière plus stringente la présence de mutations ponctuelles sur les exons concernés. Cette technique de criblage permet l'analyse de mutations ponctuelles ou de polymorphisme par une étape de fusion de l'ADN après une qPCR utilisant un agent intercalant. Cet agent s'intercale dans le double brin. Pendant l'étape de fusion, les deux brins se désappariaient au fur et à mesure de l'augmentation de température. L'agent intercalant n'est ainsi plus piégé et la fluorescence diminue. Si un mésappariement entre les deux brins complémentaires d'ADN est présent (polymorphisme,

mutation ponctuelle...), la quantité de chaleur nécessaire à la dénaturation de l'ADN sera modifiée (température de fusion plus basse) et il sera possible détecter l'anomalie (Figure 20).

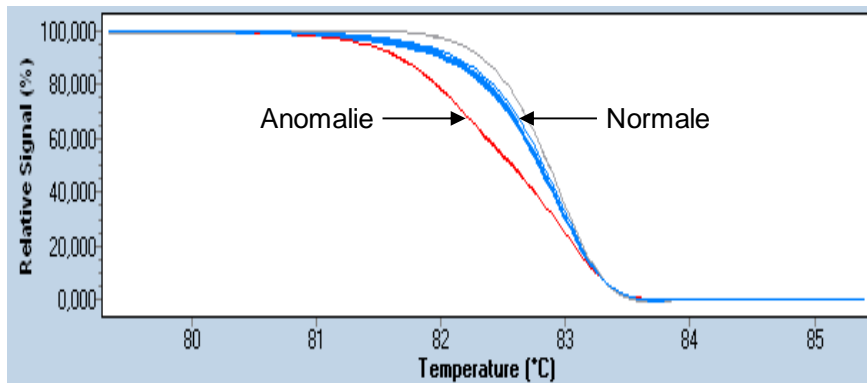


Figure 20: Courbe de dissociation en HRM, représentant une séquence sauvage et une anomalie sur la même séquence.

blood

2010 115: 3089-3097
Prepublished online Feb 16, 2010;
doi:10.1182/blood-2009-07-234229

Wide diversity of PAX5 alterations in B-ALL: a Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique study

Etienne Coyaud, Stephanie Struski, Nais Prade, Julien Familiades, Ruth Eichner, Cathy Quelen, Marina Bousquet, Francine Mugneret, Pascaline Talmant, Marie-Pierre Pages, Christine Lefebvre, Dominique Penther, Eric Lippert, Nathalie Nadal, Sylvie Taviaux, Bruce Poppe, Isabelle Luquet, Laurence Baranger, Virginie Eclache, Isabelle Radford, Carole Barin, Marie-Joëlle Mozziconacci, Marina Lafage-Pochitaloff, Hélène Antoine-Poirel, Christiane Charrin, Christine Perot, Christine Terre, Pierre Brousset, Nicole Dastugue and Cyril Broccardo

Updated information and services can be found at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/cgi/content/full/115/15/3089>

Articles on similar topics may be found in the following *Blood* collections:

[Lymphoid Neoplasia](#) (506 articles)

[Clinical Trials and Observations](#) (2957 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:

http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/misc/rights.dtl#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:

<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/subscriptions/index.dtl>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published semimonthly by the American Society of Hematology, 1900 M St, NW, Suite 200, Washington DC 20036.

Copyright 2007 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



Wide diversity of *PAX5* alterations in B-ALL: a Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique study

*Etienne Coyaud,^{1,2} *Stephanie Struski,³ Nais Prade,¹ Julien Familiades,^{1,2} Ruth Eichner,^{1,2} Cathy Quelen,^{1,2} Marina Bousquet,^{1,2} Francine Mugneret,⁴ Pascaline Talmant,⁵ Marie-Pierre Pages,⁶ Christine Lefebvre,⁷ Dominique Penther,⁸ Eric Lippert,⁹ Nathalie Nadal,¹⁰ Sylvie Taviaux,¹¹ Bruce Poppe,¹² Isabelle Luquet,¹³ Laurence Baranger,¹⁴ Virginie Eclache,¹⁵ Isabelle Radford,¹⁶ Carole Barin,¹⁷ Marie-Joëlle Mozziconacci,¹⁸ Marina Lafage-Pochitaloff,¹⁹ Hélène Antoine-Poirel,²⁰ Christiane Charrin,²¹ Christine Perot,²² Christine Terre,²³ Pierre Brousset,³ Nicole Dastugue,³ and Cyril Broccardo¹

¹Inserm, U563, Toulouse, France; ²Université Toulouse III Paul Sabatier, Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan, Toulouse, France; ³Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Toulouse, Department of Hematology, Toulouse, France; ⁴CHU Le Bocage, Dijon, France; ⁵CHU Nantes, Nantes, France; ⁶CHU Lyon Sud, Pierre benite, Lyon, France; ⁷CHU Grenoble, Grenoble, France; ⁸Centre de lutte contre le cancer Henri Becquerel-Rouen, France; ⁹CHU Bordeaux, Pessac, France; ¹⁰CHU Hôpital Nord, St Etienne, France; ¹¹CHU Montpellier, Montpellier, France; ¹²Ghent University Hospital, Ghent, Belgium; ¹³CHU Reims, Reims, France; ¹⁴CHU Angers, Angers, France; ¹⁵CHU-Hôpital Avicenne, Bobigny, France; ¹⁶CHU Necker, Paris, France; ¹⁷CHU Bretonneau, Tours, France; ¹⁸Institut Paoli Calmettes, Marseille, France; ¹⁹CHU Timone, Marseille, France; ²⁰Cliniques Universitaires St-Luc, Bruxelles, Belgium; ²¹CHU Lyon, Lyon, France; ²²Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; and ²³Centre hospitalier de Versailles, Le Chesnay, France

***PAX5* is the main target of somatic mutations in acute B lymphoblastic leukemia (B-ALL). We analyzed 153 adult and child B-ALL harboring karyotypic abnormalities at chromosome 9p, to determine the frequency and the nature of *PAX5* alterations. We found *PAX5* internal rearrangements in 21% of the cases. To isolate fusion partners, we used classic and innovative techniques (rolling circle amplification-rapid amplification of cDNA ends) and single nucleotide polymorphism-comparative genomic hybrid-**

ization arrays. Recurrent and novel fusion partners were identified, including *NCoR1*, *DACH2*, *GOLGA6*, and *TAOK1* genes showing the high variability of the partners. We noted that half the fusion genes can give rise to truncated *PAX5* proteins. Furthermore, malignant cells carrying *PAX5* fusion genes displayed a simple karyotype. These data strongly suggest that *PAX5* fusion genes are early players in leukemogenesis. In addition, *PAX5* deletion was observed in 60% of B-ALL with 9p alterations. Contrary

to cases with *PAX5* fusions, deletions were associated with complex karyotypes and common recurrent translocations. This supports the hypothesis of the secondary nature of the deletion. Our data shed more light on the high variability of *PAX5* alterations in B-ALL. Therefore, it is probable that gene fusions occur early, whereas deletions should be regarded as a late/secondary event. (*Blood*. 2010;115(15):3089-3097)

Introduction

Precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is characterized both by a blockage of B-cell differentiation and uncontrolled proliferation of blastic cells. Adult and childhood B-ALL differs in terms of prognosis.¹ Although 80% of children with ALL can be cured, only 30% of adults achieve long-term disease-free survival.¹ These discrepancies in prognosis correlate with different occurrences of chromosomal abnormalities. Besides frequent recurrent translocations, such as t(9;22)(q34;q11), t(12;21)(p13;q22), t(1;19)(q23;p13), or *MLL* translocation, new oncogenes have been identified recently. Among them, the paired box domain gene 5 (*PAX5*), located on 9p13, has been reported as being frequently mutated in both childhood² and adult B-ALL.³

PAX5 encodes a paired box domain (PBD) transcription factor considered as the guardian of B-cell identity. Its homozygous deletion in the mouse leads to total blockage of B-cell differentiation at the pro-B stage.⁴ Furthermore, *Pax5* inactivation at later stages of differentiation entails transdifferentiation or dedifferentiation of B cells.⁵ *Pax5*, which activates crucial genes for B-cell

lineage differentiation and represses genes important for commitment in other hematopoietic lineages, is expressed from early pro-B stage until final plasmacytic differentiation, where it is turned off.^{6,7}

Fusion genes involving *PAX5* have been associated with blockage of B-cell differentiation, the first reported example being *PAX5-ETV6*, the product of the dic(9;12)(p13;p13) rearrangement.⁸ A recent study has shown that *PAX5* is rearranged in 2.6% of pediatric B-ALL cases,⁹ being fused, to date, with 17 different partners, thus demonstrating the variability of the fusion partners. In contrast, very few studies have been performed on adult B-ALL, only reporting fusion between *PAX5* and *ETV6*¹⁰ and the elastin gene (*ELN*).¹¹ Cytogenetic abnormalities affecting the chromosome 9p arm and potentially involving *PAX5* occur in 10% of child B-ALL.¹² Using classic cytogenetic techniques and a newly developed molecular strategy (rolling circle amplification-rapid amplification of cDNA ends [RCA-RACE]), we investigated 9p abnormalities, focusing especially on the *PAX5* locus. For this

Submitted July 27, 2009; accepted January 22, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, February 16, 2010; DOI 10.1182/blood-2009-07-234229.

*E.C. and S.S. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

purpose, we collected 153 childhood and adult B-ALL with 9p rearrangements diagnosed and reviewed by members of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH). Our data revealed that *PAX5* deletions accounted for most of the 9p alterations and were often associated with complex karyotypes. On the contrary, *PAX5* internal rearrangements were less frequent and were most of the time the sole chromosomal abnormality detected. This collaborative study also allowed the description of novel *PAX5*-fusion partners.

Methods

Patients

The criterion for inclusion, in this retrospective study of the GFCH, was the detection by karyotype analysis of acquired structural 9p rearrangement in patients with B-ALL. We selected the structural abnormalities with the largest variety of 9p chromosome partners because the aim of the study was to find new fusion partners of *PAX5*.

This retrospective study included 153 B-ALL (92 males and 61 females) recruited from 1989 to 2008 from 20 French and 2 Belgian cytogenetic centers ("Morphologic and immunologic validation"). Among them, we examined 140 patients at diagnosis and 13 at relapse. This cohort was composed of 89 children (median age, 6 years; range, 1 month to 15 years, 52 males and 37 females) and 64 adults (median age, 43 years; range, 16-82 years, 40 males and 24 females). Patients distributed according to the EGIL classification¹³ of B-ALL subtypes were: B-I ALL (n = 6), B-II ALL (n = 92), B-III ALL (n = 48), and B-ALL unclassified (n = 7).

Morphologic and immunologic validation

Morphologic and immunophenotypic studies of patients were carried out in each center and validated by groups of morphologists and immunologists responsible for data collection in various working groups, particularly involved in therapeutic protocols for children (EORTC, FRALLE, and IGLALL) and adults (GOELAL, GRAALL, GRAAPH, LALA, and OMAN). Patient material was provided by participative centers (Centre Hospitalier Universitaire Toulouse, n = 42; Strasbourg, n = 16; Dijon, n = 11; Nantes, n = 11; Lyon, n = 9; Grenoble, n = 8; Rouen, n = 8; Bordeaux, n = 8; St Etienne, n = 7; Montpellier, n = 6; Ghent, Belgium, n = 4; Reims, n = 4; Angers, n = 3; Bobigny, n = 3; Paris, Necker, n = 3; Tours, n = 3; Marseille IPC, n = 2; Marseille, Timone, n = 1; Laboratoire Biomnis, Lyon, n = 1; Louvain, Belgium, n = 1; Paris, St Antoine, n = 1; Versailles, n = 1).

Cytogenetics

Cytogenetic analysis was conducted on bone marrow in 139 cases, on peripheral blood in 12 cases, on the central nervous system in 1 case, and on lymph nodes in another. In this multicenter study, different cellular culture techniques were used. Short synchronized cultures (\leq 24 hours) were most frequently carried out. RHG or GTG banding techniques (or both) were applied and karyotypes described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2005.¹⁴ All chromosomal data were reviewed by the members of GFCH during 2 successive workshops to sharpen karyotype interpretation.

FISH approach for the detection of *PAX5* rearrangements

A first screening of all 9p rearrangements was performed with a commercial dual-color *PAX5* probe (Dako Denmark). Direct involvement of *PAX5* was verified using 2 overlapping bacterial artificial chromosome (BAC) clones: RP11-243F8 and RP11-344B23 and exon-specific fosmid G248P85962F9 (exon1) and G248P82268A1 (exon10; CHORI). Positioning of probes relative to *PAX5* is depicted in Figure 1.

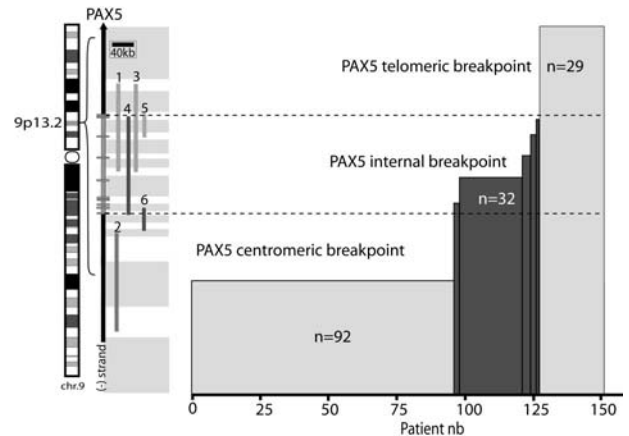


Figure 1. Repartition of breakpoints on chromosome 9p arm. Location of *PAX5* on chromosome 9 (left). A schematic of *PAX5* genomic structure (right); rectangles represent exons. (1-6) Probes used for FISH analyses: telomeric and centromeric Dako commercial probes (1,2), RP11-344B23 (3), and RP11-244F8 (4), BACs and G248P82268A1 (5), and G248P85962F9 (6) fosmids. These probes enable localization of the breakpoint regions (gray rectangles). Histogram represents the number of patients harboring these breakpoints.

PCR approach for the detection of *PAX5* fusion partners

Total RNA was extracted according to the TRIZOL method (Invitrogen) and 1 μ g reverse-transcribed into cDNA by SuperScript III (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, using an oligo-dT anchor primer (RACE kit, second generation; Roche Applied Science). The cDNA product was used as a template in a polymerase chain reaction (PCR) experiment performed with the Advantage 2 PCR kit (BD Biosciences), a PCR anchor primer (5'-GACCACGCGIATCGATGTCGAC-3'), and the *PAX5*-specific primer *PAX5-771F* (5'-CCATGTTGCTGGGAGATCAGG-3'). The temperature cycling program used with a GeneAmp PCR system 9600 (PerkinElmer) was as follows: (1) 1 minute at 94°C; (2) 15 seconds at 94°C, 6 minutes at 68°C 35 times; and (3) 10 minutes at 68°C. A seminested PCR using an internal *PAX5-846F* (5'-GTTCCATCAACAGGATCATCCGG-3') primer and the anchor primer was subsequently performed on 1 μ L of the PCR product under the same cycling conditions. The obtained products were sequenced using the *PAX5-846F* primer and BigDye dideoxynucleotides. Products were separated on a 3130 XL sequencing apparatus (Applied Biosystems); electrophoregrams were analyzed using the Sequencher software (Version 4.1.2; Gene Codes Corporation). The presence of chimeric transcripts has been further verified by PCR using specific primers (*PAX5-415F*: 5'-CCCTGTCCATTCCATCAAGTCTTG-3', *DACH2-928R*: 5'-TGTTAGCAGGTGGTCTGCTGC-3', *NCoR1-7605R*: 5'-GAGATCCTCTCCTGCACCCTG-3', *GOLGA6-2134R*: 5'-ACGCAGGGTTGCTGGGCAAGC-3', *ELN-2297R*: 5'-ATGAGGTCGTGAGTCAGGGGTC-3', *JAK2-4020R*: 5'-CACATCTTGTCTGGCTAGCATCATG-3', *FOXPI-2595R*: 5'-CAATCTTCATTCTCGGGGTTGG-3').

RCA-RACE

Gene-specific RCA was performed as previously described.¹⁵ Briefly, starting from 100 to 250 ng of total RNA, SuperScriptTM III reverse transcription was performed according to the manufacturer's instructions (Invitrogen) replacing the oligo-dT primer by a 5' phosphate oligo-dT anchor primer (5'-P-GACCACGCGIATCGATGTCGAC(T)₁₆V-3') at a final concentration of 2.5 μ M. Circularization of purified cDNA was obtained using CirLigase kit (Epicentre Biotechnologies), according to the manufacturer's instructions. RCA was carried out by mixing the purified circularized product with 5 μ L of dNTPs (10 mM each; Promega), 1 μ L of 10 mg/mL bovine serum albumin, 5 μ L of 10 times ϕ 29 DNA polymerase buffer, 10 U of ϕ 29 DNA polymerase (New England Biolabs), 2 μ L of 100 μ M *PAX5-Exo5* primer (5'-CTTGATGTTGGCGAGA**A**C-3') (*phosphorothiotates chemical bounds, Eurogentec) and water up to 50 μ L. This

mixture was incubated for 21 hours at 30°C and then for 10 minutes at 65°C.

Amplification of 50 ng of RCA product was performed with the Advantage 2 PCR kit (BD Biosciences), using *PAX5-771F* and *PAX5-570R* (5'-*ATCCTCTGGCGGACTACATCCG*-3') primers, according to the manufacturer's instructions. This mixture was incubated under the same cycling condition than for the RACE PCR experiment. If necessary, nested PCR was performed using 1 μ L of previous PCR product, replacing *PAX5-771F* by *PAX5-846F* and *PAX5-570R* by *PAX5-510R* (5'-*TTCCTCTCCATGTCCTGTCC*-3') primers. For negative control, the cDNA was replaced by water. For non-B control, cDNA of Karpas cell line, which does not express *PAX5*, was used.

Purification of BAC DNA

BACs (chosen on the website www.genome.ucsc.edu) were amplified in 3 mL LB medium (MP Biomedicals), containing 12.5 μ g/mL of chloramphenicol (Sigma-Aldrich) under constant shaking at 180 rpm for 12 hours at 37°C. Each purified BAC DNA was amplified by hyperbranched (H)-RCA: from 20 to 50 ng of BAC DNA was added to 1 μ L of exo-resistant random heptamers (Fermentas), 1 μ L of annealing buffer (200mM Tris-HCl, pH 8, 50mM MgCl₂), and water up to 5 μ L. This mixture was incubated for 4 minutes at 94°C on a 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) and cooled on ice for 2 minutes. Then was added 2 μ L of ϕ 29 10 times Buffer (New England Biolabs), 1 μ L of dNTPs 10mM each (Promega), 7 U of ϕ 29 DNA polymerase (New England Biolabs), 0.5 μ L of 10 mg/mL bovine serum albumin (New England Biolabs), and water up to 20 μ L. This mixture was incubated under the condition described above for gene specific RCA.

Labeling of BAC DNA

BAC DNA was labeled using the nick-translation kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions, with dUTP-fluorescein or dUTP-tetramethylrhodamine (Roche Applied Science). Overnight ethanol precipitation of the labeled DNA was performed in the presence of 0.1 mg of Human Cot-1 DNA (Invitrogen) and 0.2 mg of salmon testis DNA (Sigma-Aldrich). Labeled BAC DNA was then pelleted, dried, and resuspended in 100 μ L of a mixture of 50% formamide (Sigma-Aldrich), 2 times SSC (Eurobio), and 10% dextran sulfate (Sigma-Aldrich). BACs are detailed in supplemental Table 1 (available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

CGH array

Genomic DNA was extracted with DNeasy (QIAGEN) from blood or bone marrow samples. Samples were analyzed for copy number changes using Affymetrix Genome-Wide Human SNP 6.0 arrays (Affymetrix). Sample preparation and hybridizations were performed using Genome-wide Human SNP Nsp/Sty assay kit (Affymetrix) according to manufacturer's protocol. Analysis of copy number state was done using BRLMM-P-Plus algorithm with regional GC correction, embedded in Genotyping Console 2.0 software (Affymetrix).

PAX5 vectors

Complete coding sequences of *wtPAX5*, *trPAX5*, and *PAX5-NCOR1* were amplified from cDNA of patient #125, #108, and # 101, respectively, using PfuUltraII Hotstart PCR Master Mix (Stratagene) with primers *PAX5*-forward: *ATGGATTAGAGAAAAATTATCCG* and *PAX5*-reverse: *ATGGCTCTCTGGCTATCTCAGG* for *wtPAX5*; *PAX5*-forward and *trPAX5*-reverse: *AGTCTCACCTGCTGCCTGTCTG* for *trPAX5*; and *PAX5*-forward and *NCOR1*-reverse: *GAGATCCCTCTCCTGCACCCTG* for *PAX5-NCOR1*. PCR products were cloned into pcDNA3.1 (+) expression vector (Invitrogen)

Luciferase assay

Experiments had been performed as previously described¹¹ replacing *pRenilla-CMV* by *pSV- β -galactosidase* (Promega) as transfection effi-

ciency reporter plasmid. HeLa cells (in 6-well plates) were transfected with 1.5 μ g *luc-CD19*,¹⁶ 1.5 μ g *pSV- β -galactosidase*, 0.3 μ g *pcDNA3-PAX5*, and increasing amounts of *pcDNA3-truncated PAX5* or *pcDNA3-PAX5-NCOR1* (0.1-0.9 μ g). Luciferase and β -galactosidase activity were revealed on a Mithras LB940 (Berthold Technologies) using Luciferase Reporter assay system and β -galactosidase enzyme assay system, respectively (Promega). Luminescence and absorbance were read by a Mithras LB940 (Berthold Technologies).

Firefly luciferase activity was normalized to the measured β -galactosidase activities and are shown as average values relative to the basal activity observed with *pcDNA3* alone (mean \pm SD); statistical significance of normalized luciferase activity was assessed by Wilcoxon Mann-Whitney *U* test for each point compared with *wtPAX5* luciferase activity ($P < .01$, $n = 3$).

Results

Cytogenetic characteristics of the cohort

The criterion for inclusion in this retrospective study was the detection on karyotype of acquired structural 9p rearrangement in B-ALL patients. Karyotypes were mostly pseudodiploid (53% children and 52% adults). A total of 32% had a modal number of 45 chromosomes (31% children and 33% adults). Hypodiploid karyotypes with 44 chromosomes were rare, only found in 2 cases. In the hyperdiploid group, modal numbers ranged from 47 to 55. Only 2 cases (1%) with a high hyperdiploid karyotype (> 50 chromosomes) were detected. Details of karyotypes are given in supplemental Table 2.

Karyotype and fluorescence in situ hybridization (FISH) analyses revealed that 14.5% of the patients harbored a t(9;22)(q34;q11)/*BCR-ABL1* (4.5% in children, 28% in adults), 6.5% a t(1;19)(q23;p13)/*TCF3-PBX1* (9% in children, 3% in adults), 9 pediatric cases a t(12;21)(p13;q22)/*ETV6-RUNX1* (10%), 2 cases a 11q23/*MLL* translocation (2% children), and 3.5% a 14q32/*IGH* translocation (2% children and 5% adults).

To assess the distribution and the combination of the most frequent abnormalities associated with the 9p alteration, we reported all the chromosomal changes in Table 1, supplemental Table 3, and supplemental Figure 1. The most frequent abnormalities were in decreasing order: 20q deletion, 12p deletion, 9q translocation different from 9q34/*ABL1*, 13q abnormalities (deletion or translocation), 6q deletion, trisomy 8 or 8q gain, 7p deletion, 11q abnormalities different from 11q23/*MLL*, 7q translocation, 17p deletion, 5q translocation, and high hyperdiploidy.

Complex karyotypes (≥ 3 unrelated chromosomal abnormalities) were frequent, found in 48% (44% children and 54% adults, $P = .3$).

However, the chromosomal abnormalities that rendered these karyotypes complex differed in the 2 age groups. In children, complexity was mainly the result of the contribution of known recurrent changes in B-ALL (12p-, 20q-, 6q-, etc), whereas in adults, complexity mainly resulted from nonrecurrent changes indicating a higher heterogeneity of genome alterations (Table 1; supplemental Table 3; supplemental Figure 1).

The 9p abnormalities found in our cohort were translocations (resulting in 9p deletions when unbalanced), dicentrics, and isochromosome 9q leading to partial or total monosomy 9p, inversions, insertions, and simple deletions. Only a small number of cases of simple deletions were included.

Table 1. Cytogenetic distribution of chromosomal associated abnormalities in total cohort

Cytogenetic subgroup	t(9;22)	t(1;19)	t(12;21)	t(14q32)	t(11q23)	del(20q)	de(12p)	t(9q)	abn(13q)	del(6q)	+8/8q	del(7p)	abn(11q)	t(7q)	del(17p)	t(5q)	Breakpoint/ PAX5			High hyper		
																	Centro	Intra	Telo			
t(9;22)	22	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
t(1;19)	—	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
t(12;21)	—	—	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
t(14q32)	—	—	—	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
t(11q23)/MLL	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
del(20q)	1	—	—	—	—	27	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
de(12p)	—	—	5	1	—	—	21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
t(9q other than ABL1)	—	2	1	—	1	4	2	21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
abn(13q)	1	1	—	—	—	1	4	2	17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
del(6q)	—	2	3	—	—	1	6	3	5	13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
+8/8q	4	—	—	—	—	3	3	—	2	—	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
del(7p)	2	2	1	1	1	—	—	1	2	—	—	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
abn(11q) other than MLL	2	1	2	—	—	2	2	1	3	2	2	1	10	—	—	—	—	—	—	—	—	
t(7q)	—	—	—	1	—	1	—	1	2	—	—	1	2	9	—	—	—	—	—	—	—	
del(17p)	1	1	—	—	—	1	—	—	2	1	—	—	—	8	—	—	—	—	—	—	—	
t(5q)	1	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	1	—	1	8	—	—	—	—	—	—	
Breakpoint/PAX5																						
Centromeric	20	9	5	4	1	15	9	12	10	7	6	9	7	3	7	3	92	—	—	—	—	
Intragenic	—	—	—	1	1	9	6	2	1	1	3	1	1	4	1	2	2	32	—	—	—	
Telomeric	2	1	4	—	—	3	6	7	6	5	2	1	2	2	3	5	2	29	—	—	—	
Complex	NA	NA	NA	NA	NA	13	7	12	14	7	6	2	5	3	5	1	30	8	12	50	—	
High hyper	1	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	—	2	

Patients were classified according to the presence of the following chromosomal abnormalities: t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1, t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1, t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1, 11q23 translocations/MLL, 14q32 translocations/GH, and the chromosomal regions most often disrupted in this cohort (≥ 8 patients): 20q deletion, 12p deletion, 9q translocation different from 9q34/ABL1, 13q abnormalities (deletion or translocation), 6q deletion, trisomy 8 or 8q gain, 7p deletion, 11q abnormalities different from 11q23/MLL, 7q translocation, 17p deletion, 5q translocation, high hyperploidy, and complex karyotype, excluding those patients with t(9;22), t(1;19), t(12;21), 14q32/GH, and 11q23/MLL. For patients with such recurrent translocations, complexity calculation was NA. 9p breakpoint localization was mapped by cytogenetic analysis and was indicated in the table according to PAX5 probe position (centromeric, telomeric, and intragenic). Therefore, the submicroscopic deletions of PAX5 exons, not detectable by cytogenetic methods, were not investigated.

— indicates no case; and NA, not applicable.

Various PAX5 alterations and their association with karyotypic features

All patients were screened with a commercial dual-color PAX5 probe (Figure 1). When the 2 colors were separated, indicating a possible PAX5 internal rearrangement, we performed further analyses to pinpoint the location of the breakpoint (Figure 1).

Because our study was based on cytogenetic methods, the submicroscopic intragenic alterations of PAX5 (limited to a few exons) were not investigated.

PAX5 was not altered (telomeric breakpoint) in 29 cases (19%; 21.5% children and 16% adults, $P = .4$, male/female ratio = 1.2). Complex karyotypes were frequent (54.5%), and the 2 cases of high hyperdiploid karyotypes belonged to this group (Table 1). Only 2 patients had a partial loss of the PAX5 probe signal. Of the 27 remaining patients, 18 harbored unbalanced 9p rearrangement on the karyotype without losing the PAX5 probe signal.

Centromeric breakpoints were observed in 92 patients (60%, 54% children and 69% adults, $P = .068$, male/female ratio = 1.5). This 9p rearrangement generated a loss of PAX5 in 86 patients (93%). The entire PAX5 locus was translocated onto another chromosome in all other cases. The majority of recurrent fusions found in our cohort belonged to this group: 91% of *BCR-ABL1* (20 of 22), 90% of *TCF3-PBX1* (9 of 10), 80% of *IGH* translocation (4 of 5), 56% of *ETV6-RUNX1* (5 of 9), and 50% of *MLL* translocation (1 of 2). In addition, this group composed 60% of the complex karyotypes ($n = 30$ of 50; Table 1; supplemental Table 3).

In addition, we detected a breakpoint localized inside the genomic region of PAX5 resulting in an internal rearrangement of PAX5 in 32 patients (25% children and 16% adults, $P = .23$, male/female ratio = 1.9). In contrast with the telomeric or centromeric breakpoint cases, a majority of these patients had a simple karyotype (73%, 22 of 30; $P = .024$). Only 2 patients had additional recurrent rearrangement: one case of $t(10;14)(p12;q32)$ implicating the *IGH* locus and another case with *MLL/MLLT3* fusion. Notably, no other recurrent fusion (*BCR-ABL1*, *TCF3-PBX1*, and *ETV6-RUNX1*) was detected in this group.

PAX5 internal rearrangements showed heterogeneous patterns of breakpoints (Figure 1; supplemental Table 2). The majority of the patients ($n = 24$) harbored PAX5 breakpoints located between exon 4, corresponding to the end of the DNA binding domain, and exon 6, coding the homeodomain. This breakpoint position was more frequent in children (19 of 89, 21%) than in adults (5 of 64 cases, 8%; $P = .025$). Furthermore, the PAX5 telomeric probe signal was deleted for 22 of 24 patients (92%). Among them, 21 of 24 (88%) appeared unbalanced on the karyotype (mainly dicentric and derivative chromosomes), the 3 others had a partial deletion. Three patients (2 adults and 1 male child) harbored breakpoints located in intron 7/intron 8. These patients showed a simple pseudodiploid karyotype and had a balanced rearrangement. Two patients (1 adult and 1 child) harbored a balanced translocation with PAX5 breakpoint located before the third exon, just before the DNA binding domain. The last 3 cases (2 adult females and 1 female child) showed an unbalanced translocation with breakpoints located in the last 2 exons of PAX5.

These results showed that PAX5 internal rearrangements were not associated with the most common B-ALL recurrent translocations, as these were, most of the time, the sole chromosomal

abnormality. On the other hand, PAX5 deletion was associated with complex karyotypes and classic recurrent translocations.

Frequent alterations of PAX5 in dicentric chromosomes involving the 9p arm

Childhood and adult cohort presented the same frequency of dicentric rearrangements in 26 of 89 (29%) and 14 of 64 (22%), respectively, $P = .18$. The majority (23 of 40, 58%) resulted in monoallelic deletion of PAX5 [10 dic.(9;20) 4 dic.(9;12) 5 dic.(7;9) 1 dic.(9;16) 1 dic.(9;17) the dic(8;9), and the dic(9;15)]. Only 5 patients did not delete PAX5 [3 dic.(9;20) the idic(9;9), and the dic(9;13)], and 12 patients had a PAX5 intragenic breakpoint associated with partial deletion [4 dic.(9;20) 3 dic.(9;12) 2 dic(9;16), and 2 dic(9;17)] or without deletion of the gene [1 dic(7;9)]. Interestingly, dicentric cases with internal PAX5 breakpoint were much more frequent in children than in adults (11 of 26 vs 1 of 14 case, $P = .024$). Identical cytogenetic abnormalities proved to result in different genomic breakpoints. Thus, we showed that dicentric rearrangements involving 9p are associated with PAX5 deletion or internal rearrangement in approximately 90% of cases.

Molecular consequences of PAX5 internal breakpoints

According to the material available, we could investigate the presence of PAX5 fusion transcripts in 23 of the 32 patients with internal rearrangement. We identified an in-frame fusion of exon 4 of PAX5 with exon 3 of *ETV6* by specific reverse-transcribed PCR and confirmed the rearrangement by FISH using *ETV6* probes in 3 cases of dic(9;12)(p13;p13) (#99, #100, and #105; data not shown). The $t(7;9)(q11;p13)$ translocation, which fused exon 7 of PAX5 to exon 2 of *ELN*, was previously described by our group¹¹ in 2 of the 3 patients of this cohort (#119, #120). The presence of PAX5-*ELN* was confirmed in the third patient by FISH with *ELN* specific BAC probes (#121; supplemental Figure 2). We also confirmed the presence of known chimeric transcripts in 2 cases of $t(3;9)(p14;p13)$ (#97, #98). This rearrangement yielded a chimeric transcript, which fused in-frame exon 6 of PAX5 to exon 7 of *FOXP1* in one case (no RNA was available for the second patient). This fusion transcript was detected by RCA-RACE and confirmed by FISH using *FOXP1* specific BAC probes for both (supplemental Figure 2). We detected PAX5-*JAK2* fusion transcript in a $del(9)(p13;p24)$ case (#118). This translocation led to in-frame chimeric transcript, which fused exon 5 of PAX5 to exon 19 of *JAK2*. The 2 genes being originally in opposite orientation on the 9p arm, we speculated that a deletion occurred before/or concomitant with *JAK2* inversion. In agreement with these data, FISH experiments revealed that the *JAK2* probe signal was slightly decreased whereas the PAX5 signal kept only the centromeric part of the probe (supplemental Figure 2). We identified the PAX5-*POM121* chimeric transcript in 1 patient with a $t(7;9)(q11;p13)$ (#93). This case expressed an in-frame fusion transcript, which composed the 5 first exons of PAX5, 77 noncontiguous nucleotides from PAX5 intron 5/intron 6, and *POM121* sequence from base 14 of exon 4 (located in the 5'-untranslated region) to the end. The corresponding predicted protein juxtaposed PAX5 N-terminal sequence, included nuclear localization signal (NLS), 72 amino acids, which do not form any predictive structural domain, and the complete *POM121* sequence (supplemental Table 4).

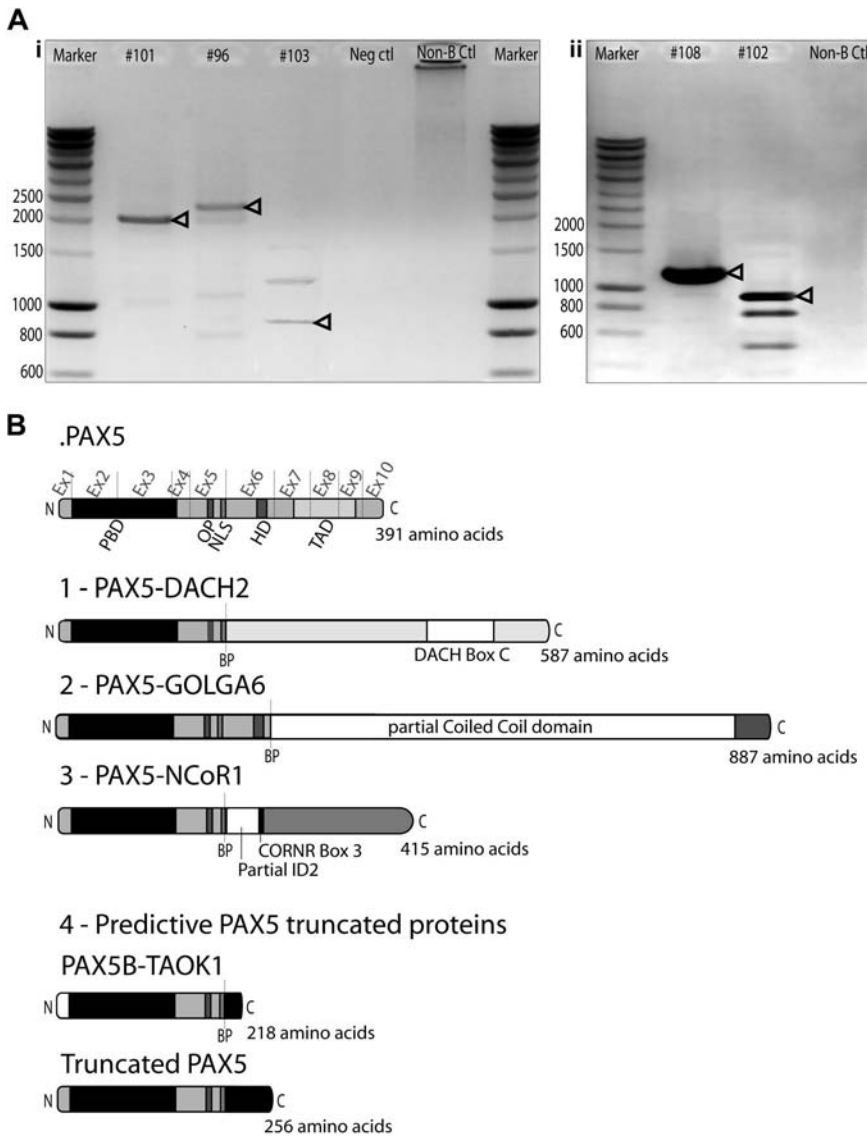


Figure 2. Cloning of novel PAX5 fusion partners by RCA-RACE. (A) RCA-RACE products were run on 1% agarose gel. Bands corresponding to amplified transcripts of fusion (i) or truncated genes (ii) are indicated by arrowheads. Additional bands correspond to amplification of fragments of wild-type PAX5 DNA. (i) Patient #101 amplified product corresponds to PAX5-NCOR1 fusion cDNA, #96 to PAX5-DACH2 fusion, #103 to PAX5-GOLGA6 fusion cDNA. (ii) Patient #108 product corresponds to truncated PAX5 cDNA, #102 to PAX5-TAOK1 fusion. (B) Schematic illustration of the fusion proteins predicted from cDNA sequencing, breakpoints (BP) are indicated by dashed lines. Ex1-10 indicates PAX5 exons. All fusion proteins retain the PAX5 DNA-binding domain (PBD, amino acids 16-142), the OP motif (amino acids 179-186), and NLS (amino acids 195-201). (1) PAX5-DACH2 contains the conserved coiled-coil domain of DACH2 (DACH-box C). (2) PAX5-GOLGA6 sequence contains a large part of a predicted coiled-coil domain of GOLGA6. (3) PAX5-NCOR1 retains part of the inhibitor of DNA-binding 2 (ID2) domain and the corepressor-nuclear receptor box 3 (CoRNR box 3). (4) PAX5-TAOK1 predictive protein contains an alternative amino acid sequence encoded by exon 1B of PAX5 and an additional 17-amino acid tail, which does not correspond to any predictive functional domain. Truncated PAX5 contains N-terminal part of PAX5 (amino acids 1-201) and a 55-amino acid tail coded by the contiguous intron 5/intron 6 nucleotide sequence, which does not correspond to any predictive functional domain.

In addition, 3 new PAX5 rearrangements have been molecularly characterized in this study using RCA-RACE technique (Figure 2). In the chimeric transcript resulting from the t(X;9)(q21;p13) (#96), the exon 5 of PAX5 was fused in-frame to exon 3 of *Dachshund 2* (DACH2). FISH analysis with DACH2 specific BAC probes was performed and confirmed its involvement in this case (supplemental Figure 2). The t(9;17)(p13;p11) led to generation of a chimeric transcript, which fused exon 5 of PAX5 in-frame with exon 43 of *Nuclear receptor Co-Repressor 1* (NCOR1; #101). We also detected an in-frame fusion between exon 6 of PAX5 and exon 3 of *golgi autoantigen, golgin subfamily a, 6* (GOLGA6) in a case of t(9;15)(p13;q24) translocation (#103).

Five cases led to the production of truncated PAX5 transcripts. In a t(9;17)(p13;q11) case (#102), PAX5 was disrupted inside the intron 5/intron 6 and fused to intron 19/intron 20 of *TAO kinase 1* (TAOK1) in reverse orientation to its open reading frame. Chimeric PAX5 transcript conserved exon 1B to exon 5 and an additional coding sequence of 54bp. The 3'-untranslated region of this transcript contained part of intron 19/intron 20 of TAOK1. This was further confirmed by FISH using TAOK1 specific BAC probes. On comparative genomic hybridization-single nucleotide polymorphism (CGH-SNP) chip, biallelic deletion of PAX5 exon 1A was

detected, confirming the absence of PAX5A truncated isoform (supplemental Figure 3). This translocation was associated with an unbalanced t(17;20)(q11;q11), and SNP-CGH array revealed that the locus modified by this latter rearrangement involved an intergenic region. In case #108 with a dic(9;16)(p13;q11), we isolated a truncated PAX5, conserving exon 1A to exon 5 and 162 bp of additional coding sequence corresponding to the contiguous intron 5/intron 6 sequence (supplemental Table 4). CGH-SNP array analyses were performed and revealed that partner region on 16q11 did not contain any gene, suggesting that the dic(9;16)(p13;q11) results only in forced expression of the truncated transcript (supplemental Figure 3). This truncated form was also detected in 2 cases (#107, #122, data not shown) for which we could not detect any PAX5 fusion transcript. CGH-SNP analyses on patient #112 with a dic(9;20)(p13;q11) revealed breakpoints in intron 6/intron 7 of PAX5 and in the last exon of *Pleiomorphic adenoma gene-like 2* (PLAGL2), leading to a putative truncated form of PAX5 (supplemental Figure 3).

Because PAX5 fusion proteins have been shown to act as competitive inhibitor of wtPAX5 transactivation activity,^{2,11,17} we assessed the functional consequence of one of the new fusion (PAX5-NCOR1) and of the truncated form (cloned from patient

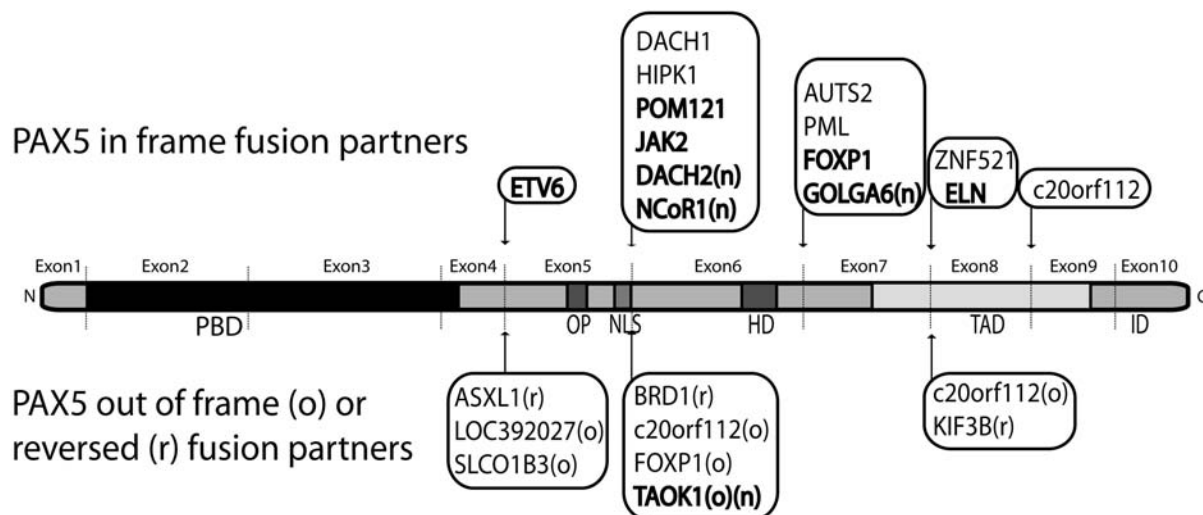


Figure 3. 3'-PAX5 fusion partners in B-ALL. Partners previously described (references in supplemental Table 5) and detected in our series are indicated in bold, new PAX5 fusion partners are highlighted with an "n." In-frame PAX5 fusions are indicated on the upper side. Fusion partners in reverse orientation (r) or out-of-frame fusion (o), leading to PAX5 predictive truncated protein are indicated on the lower side. PBD, OP, NLS, homeodomain (HD), transactivation domain (TAD), and inhibitory domain (ID) are shown.

#108) using a luciferase reporter assay.¹⁶ We showed that these 2 types of PAX5 alterations (fusion and truncated form) behaved as competitive inhibitors of wild-type PAX5 transactivating activity (supplemental Figure 4).

In summary, we detected 5 recurrent and 3 new partner genes, thus confirming the wide diversity of PAX5 fusion partners. We also showed that truncated PAX5 can be a recurrent consequence of different chromosomal translocations.

Discussion

We investigated PAX5 alterations in a large cohort of 153 adult and childhood B-ALL patients harboring a 9p abnormality, using classic and innovative molecular and cytogenetic techniques. We detected PAX5 alteration in 81% of the patients with structural abnormality of the short arm of chromosome 9. Internal rearrangements were found in 21% of the cases, this alteration being significantly associated with simple karyotypes. Furthermore, PAX5 internal rearrangements and most recurrent translocations commonly found in B-ALL appeared to be mutually exclusive. This implies that PAX5 internal rearrangement might be sufficient to initiate leukemogenesis, through blockage of B-cell differentiation. Mechanistically, this hypothesis is emphasized by the fact that at least PAX5-ELN,¹¹ PAX5-FOXP1,² and PAX5-ETV6¹⁷ have a trans-dominant negative effect on normal PAX5.

To identify PAX5 fusion partners, we implemented a new molecular biology method, until now only used in plant biology.¹⁵ The strategy is based on RCA to generate concatenated cDNA containing multiple copies of the target gene. This concatenated cDNA is subsequently used as a template for inverse PCR with 2 specific primers of the known part of the chimera (see principle in supplemental Figure 5). Thus, we isolated additional cases of rare translocations, as described previously (Figure 3). For example, PAX5-POM121 generated by the t(7;9)(q11;p13) translocation can now be classified as recurrent because we added a second case to a translocation.⁹ However, the fusion sequence we described is slightly different from that reported, even though the predictive protein structures are similar. It is noteworthy that the same fusion

partner can give rise to either in-frame or out-of-frame chimeric transcripts (eg, PAX5-FOXP1).^{2,18} The PAX5 internal breakpoint can also lead to the production of truncated proteins resulting from an out-of-frame fusion (PAX5-FOXP1), fusion with a gene in opposite orientation (PAX5-TAOK1), or fusion with noncoding sequences. In most instances, a premature stop codon is generated immediately after PAX5 exon 5. The predicted chimeric proteins conserved the PBD, octapeptide (OP), and NLS of PAX5 (breakpoint after exon 5), suggesting that the chimera is located in the nucleus and able to bind PAX5 targets. It is probable that these truncated PAX5-X proteins block B-cell differentiation in a dominant negative manner, similarly to that reported for other PAX5 fusion products.^{2,11,17}

In addition, the RCA-RACE approach enabled us to clone new fusion genes: PAX5-NCoR1, PAX5-DACH2, and PAX5-GOLGA6 increasing the total number of partners of PAX5 in B-ALL to 20 (Figure 3). NCoR1 is a component of histone deacetylase complexes and acts as transcriptional repressor by modulating chromatin, which impedes the accessibility of basal transcription factors to genomic regulation sites.¹⁹ Interestingly, NCoR1 partial inhibitor of DNA-binding 2 domain replaces the trans-activating domain of PAX5 and the putative protein may act as a constitutive repressor of PAX5 targets. DACH2 is a transcription factor implicated in organogenesis and is supposed to be involved in proliferation, notably by repressing cyclin-dependent kinase inhibitor expression.²⁰ As the patient harboring the t(X;9) translocation was a male, the DACH2-PAX5 fusion is associated with a total loss of wild-type DACH2. Moreover, DACH1, structurally close to DACH2, has been found fused to PAX5 in a t(9;13)(p13;q22).⁹ These results strongly suggest that DACH family genes could be involved in oncogenesis. The third in-frame fusion led to the expression of PAX5-GOLGA6 transcript. GOLGA6 is highly expressed in human testis, but its function is still unknown.²¹

Remarkably, even if the nature of the partners is very variable, 19 of 23 of the predicted chimeric proteins conserved the PBD, OP motif, and the nuclear localization signal of PAX5 (breakpoint after exon 5), strongly suggesting functional selection of the chimera.

Our data showed that 60% of the patients (adults and children) harbored a monoallelic deletion of PAX5. These patients mainly

displayed a complex karyotype and classic recurrent fusion genes (*BCR-ABL1*, *TCF3-PBX1*, *ETV6-RUNX1*, and *MLL* rearrangements). We assumed that the complexity of karyotypes in patients with *PAX5* deletion reflects the secondary nature of this event, contrary to internal *PAX5* translocations. Miller et al²² have recently shown the interplay between *BCR-ABL1* and the deletion of both *PAX5* and *INK4a/ARF* in the leukemia process. Thus, the deletion of *PAX5* might occur concomitantly with the loss of *INK4a/ARF* locus located in 9p21.

Dicentric cases represented 26% of the 9p abnormality, most often involving chromosomes 20, 12, and 7 and frequently leading to the deletion of *PAX5*. We observed that *PAX5* internal rearrangements in dicentric chromosomes were much more frequent in children than in adults. Concerning the dic(9;12) cases, Heerema et al have reported one group of patients harboring *PAX5-ETV6* fusion and another group of patients with both *ETV6-RUNX1* rearrangement and *PAX5* deletion, the 2 groups being mutually exclusive.²³ We characterized a new situation in which patients harbored a *PAX5* deletion without *ETV6-RUNX1* fusion (cases #19, #20, and #106). We assumed that simple karyotypes with dicentric chromosomes are cytogenetic entities with heterogeneous breakpoints. Contrary to *PAX5-ETV6* in the dic(9;12) rearrangement, Strefford et al have suggested that the dic(9;20) are not associated with an identical recurrent gene rearrangement.²⁴ Our additional cases are in line with this assumption. Interestingly, we noted that dicentric cases can be masked by a complex rearrangement. Two dicentric rearrangements in this series (#101 and #107) involved a third chromosome (17 and 16, respectively). This third partner chromosome was split between chromosome 9 and chromosome 20, without loss of material. The final result was a loss of 9p and 20q in these 2 patients who could be structurally comparable with a dic(9;20).

In conclusion, we showed that *PAX5* was altered in 81% of the cases with a 9p abnormality. These alterations were diverse in terms of nature and associated karyotypic features. The different types of alterations seemed to act at different levels of the leukemia process: *PAX5* internal breakpoints, leading to the expression of fusion proteins or *PAX5* truncated proteins, might occur early in the process, by way of contrast, deletions of *PAX5*, which were much more frequent, might appear later in the oncogenic process and could be a secondary event occurring in a cell already undergoing transformation. It is worth noting that *PAX5* chimeric transcripts shared common features regardless of the fusion

partners. The majority retained the DNA-binding domain and the NLS of *PAX5*, strongly suggesting that they may modulate wild-type protein activity in a dominant negative manner. Nonetheless, partner gene impact on leukemogenesis requires further investigation. It would be interesting to determine whether fusion partners are randomly or functionally selected because, to date, it has been impossible to identify features common to all fusion partners.

Acknowledgments

The authors thank Eric Delabesse, Estelle Espinos, and José Meija for fruitful discussions; Roland Heilig and Gabor Gyapay (CNS, Evry, France) for kindly providing the BACs; Prof Meinrad Busslinger for kindly providing the *luc-CD19* reporter plasmid; and the tumor bank of CHU Bordeaux, Bernardine Favre, Patrick Callier, Nathalie Marle (CRB Centre Hospitalier Universitaire Dijon), and Barbara De Moerloose (Department of Pediatric Hemato-Oncology, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium) for technical support.

This work was supported by the Institut National du Cancer, Laurette Fugain foundation, the Cooperación de investigación transpirenaica en la terapia innovadora de la leukemia, the Recherche et Innovation en Thérapeutique Cancéreuse, Fondation de France, and l'association pour la recherche sur le Cancer (no. 4841).

Authorship

Contribution: C. Broccardo, N.D., and P.B. designed the study, C. Broccardo, E.C., S.S., N.D., and P.B. wrote the paper; E.C., S.S., N.P., J.F., R.E., C.Q., and M.B. performed the research and analyzed the data; and N.D., F.M., P.T., M.-P.P., C.L., D.P., E.L., N.N., S.T., B.P., I.L., L.B., V.E., I.R., C. Barin, M.-J.M., M.L.-P., H.A.-P., C.C., C.P., and C.T. provided patient samples, performed the karyotype analyses, and gave critical suggestions.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Cyril Broccardo, Inserm U563, CHU Purpan, CPTP BatB, BP3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France; e-mail: cyril.broccardo@inserm.fr.

References

- Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(26):6306-6315.
- Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007;446(7137):758-764.
- Familiades J, Bousquet M, Lafage-Pochitaloff M, et al. *PAX5* mutations occur frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and *PAX5* haploinsufficiency is associated with *BCR-ABL1* and *TCF3-PBX1* fusion genes: a GRAALL study. *Leukemia*. 2009;23(11):1989-1998.
- Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*. 1999;401(6753):556-562.
- Cobaleda C, Jochum W, Busslinger M. Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature*. 2007;449(7161):473-477.
- Delogu A, Schebesta A, Sun Q, Aschenbrenner K, Perlot T, Busslinger M. Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity*. 2006;24(3):269-281.
- Schebesta A, McManus S, Salvaggio G, Delogu A, Busslinger GA, Busslinger M. Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity*. 2007;27(1):49-63.
- Cazzaniga G, Daniotti M, Tosi S, et al. The paired box domain gene *PAX5* is fused to *ETV6/TEL* in an acute lymphoblastic leukemia case. *Cancer Res*. 2001;61(12):4666-4670.
- Nebral K, Denk D, Attarbaschi A, et al. Incidence and diversity of *PAX5* fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2009;23(1):134-143.
- An Q, Wright SL, Konn ZJ, et al. Variable breakpoints target *PAX5* in patients with dicentric chromosomes: a model for the basis of unbalanced translocations in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(44):17050-17054.
- Bousquet M, Broccardo C, Quelen C, et al. A novel *PAX5-ELN* fusion protein identified in B-cell acute lymphoblastic leukemia acts as a dominant negative on wild-type *PAX5*. *Blood*. 2007;109(8):3417-3423.
- Heerema NA, Sather HN, Sensel MG, et al. Association of chromosome arm 9p abnormalities with adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood*. 1999;94(5):1537-1544.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;9(10):1783-1786.
- Shaffer L, Tommerup N. *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel, Switzerland: Karger; 2005;1-130.
- Polidoros AN, Pasentsis K, Tsafaris AS. Rolling

- circle amplification-RACE: a method for simultaneous isolation of 5' and 3' cDNA ends from amplified cDNA templates. *Biotechniques*. 2006; 41(1):35-36.
16. Dörfler P, Busslinger M. C-terminal activating and inhibitory domains determine the transactivation potential of BSAP (Pax-5), Pax-2 and Pax-8. *EMBO J*. 1996;15(8):1971-1982.
 17. Fazio G, Palmi C, Rolink A, Biondi A, Cazzaniga G. PAX5/TEL acts as a transcriptional repressor causing down-modulation of CD19, enhances migration to CXCL12, and confers survival advantage in pre-B1 cells. *Cancer Res*. 2008;68(1):181-189.
 18. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, et al. Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(33):11921-11926.
 19. Hörlein AJ, Naar AM, Heinzel T, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor corepressor. *Nature*. 1995;377(6548):397-404.
 20. Davis RJ, Shen W, Sandler YI, Heanue TA, Mardon G. Characterization of mouse Dach2, a homologue of *Drosophila* dachshund. *Mech Dev*. 2001;102(1):169-179.
 21. Gilles F, Goy A, Remache Y, Manova K, Zelenetz AD. Cloning and characterization of a Golgin-related gene from the large-scale polymorphism linked to the PML gene. *Genomics*. 2000;70(3):364-374.
 22. Miller CB, Mullighan CG, Su X, et al. Pax5 haploinsufficiency cooperates with BCR-ABL1 to induce acute lymphoblastic leukemia [Abstract]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2008; 112:Abstract 293.
 23. Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, et al. Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46(7):684-693.
 24. Strefford JC, Worley H, Barber K, et al. Genome complexity in acute lymphoblastic leukemia is revealed by array-based comparative genomic hybridization. *Oncogene*. 2007;26(29):4306-4318.

Supplemental data legends:

Table S1: Chromosomal location of BACs used in the study. BACs used for specific gene analyses are indicated specifying their labeling color and their chromosomal location.

Table S2: Data of the patients. Cytogenetic and clinical data are given. *PAX5* alterations and results of molecular biology analyses are given. Karyotypes were corrected after FISH results. *PAX5* probe total deletion (del), partial deletion (par del) or presence (pres) are indicated.

Table S3: Cytogenetic distribution of chromosomal associated abnormalities. (A) in childhood cases. (B) in adult cases. For legend see Table 1.

Figure S1: Repartition of chromosomal abnormalities. Loss of chromosomal material and breakpoints are located on the left of each chromosome; gains of chromosomal material are represented on its right. For each chromosome, children and adult cases are separated by dashed black line. Black circles represent breakpoints; grey circles represent recurrently involved genes; Continuous lines represent gains or losses of corresponding genomic regions; dashed lines represent undetermined area of chromosomal loss or gain; dashed lines with empty circles represent undetermined breakpoint regions.

Figure S2: validation of *PAX5* fusions using FISH on or RT-PCR. BACs probes used are detailed in Figure 1 and Table S1. Primers used for gene specific RT-PCR (or RCA-RACE PCR for #102) are detailed in methods: #96: *PAX5-771F/DACH2-1052R*; #97: *PAX5-846F/FOXP1-2595R*; #101: *PAX5-771F/NCoR1-7605R*; #102: *PAX5-570R/PAX5-771F RCA-RACE PCR*; #103: *PAX5-771F/GOLGA6-2134R*; #118: *PAX5-846F/JAK2-4020R*.

Table S4: Sequences of predictive fusions. RCA-RACE products were sequenced using *PAX5-846F* primer. Sequences of chimeric cDNA (left frame) and of predictive chimeric transcript (right frame) are given.

Figure S3: CGH-SNP array analyses. Genomic DNA copy number was evaluated. 2 indicates a normal copy number, 1 monoallelic deletion and 0 a biallelic deletion of the corresponding region.

Figure S4: Repression of CD19 *PAX5*-dependent transactivation by *PAX5* fusion protein or truncated *PAX5*

We cotransfected HeLa cells with the *luc-CD19* construct, *pcDNA3-PAX5*, and increasing amounts of *pcDNA3-trPAX5* (A) or *pcDNA3-PAX5-NCOR1* (B). Firefly luciferase activity was normalized to the measured β -Galactosidase activities and are shown as average values relative to the basal activity observed with *pcDNA3* alone (results are mean \pm SD; statistical significance of normalised luciferase activity was assessed by Wilcoxon Mann-Whitney *U* test for each point, in comparison with wtPAX5 luciferase activity; ***P* < .01, n=3).

PAX5 alone activated the transcription of the CD19-dependent luciferase reporter gene. Concomitant transfection with *pcDNA3-trPAX5* (A) or *pcDNA3-PAX5-NCOR1* (B) led to a dose-dependent down regulation of PAX5-driven *CD19* transcription. These results strongly suggested that PAX5 fusion protein or truncated forms of PAX5 behave as competitive inhibitor of wild type PAX5 transactivating activity. (C) For western blot analysis of PAX5 mutants, 300,000 HeLa cells/well were transiently transfected under the conditions used for luciferase assays (with *pcDNA3-wtPAX5*, *pcDNA3-trPAX5*, *pcDNA3-PAX5-NCOR1* and *pcDNA3* empty vector). Cells were scraped 40 hours after transfection in 200 μ l of 1x Laemli buffer, boiled and loaded onto 10% polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes. PAX5 mutant proteins were detected using an anti-PAX5 antibody (AB4227, Millipore, Billerica, MA).

Expression of wtPAX5 (42kDa), trPAX5 (27kDa) and PAX5-NCOR1 (44kDa) was checked by western blot analysis of transfected cell lysates. Lane corresponding to HeLa cells transfected with empty vector revealed a non-specific 40kDa product.

Figure S5: Schematic summary of RCA–RACE methods. The bold black arrow depicts the PAX5-specific exonuclease-resistant primer. Black arrows represent PAX5 specific primers PAX5-570R and PAX5-846F (detailed in methods). Light grey elements represent PAX5 sequence and black elements represent the unknown fusion partner sequence.

Table S5: Identified PAX5 fusion partners. Detection methods are listed and references of previous works are indicated. Fusions in bold type were found in this study.

Gene	BAC probes	Labeling	Chromosomal location
<i>DACH2</i>	RP11-775C10 CTD-2589D22	Green Red	Xq21
<i>NCoR1</i>	RP11-1077F15	Red	17p11
<i>GOLGA6</i>	RP11-344D19	Red	15q24
<i>TAOK1</i>	RP11-1110B15	Red	17q11
<i>JAK2</i>	CTD-2364L13 RP11-125K10	Red Green	9p24
<i>ELN</i>	RP11-100C23 CTD-2606I4	Red Green	7q11
<i>FOXP1</i>	RP11-90H15	Red	3p14
<i>ETV6</i>	RP11-407P10 RP11-434C1 RP11-94N22 RP11-418C2 RP11-36K5	Green Green Green Red Red	12p13

Patient ID	Age years	Gender	EGIL classification	Karyotype	molecular diagnostic	PAX5 FISH probe profile	PAX5 Molecular abnormality
				centromeric breakpoints (n=92)			
1	8	F	ALL B-II	46,XX,del(9)(p12)[15]/46,XX[4]		del	
2	12	M	ALL B-III	46,XY,del(9)(p13)[28]/46,XY[21]		del	
3	26	F	ALL B-III	46,XX,del(9)(p12)[17]/46,XX[6]		del	
4	57	F	ALL B-II	46,XX,del(9)(p12)[16]/46,XX[4]		del	
5	2	F	ALL B-III	46,XX,i(9)(q10)[2]/46,XX[43]		del	
6	17	M	ALL B-II	45,X,-Y[8]/45,del,i(9)(q10)[6]/46,XY[6]		del	
7	2	F	ALL B-II	45,XX,dic(9:20)(p11;q11)[11]/46,XX[15]		del	
8	43	F	ALL B-II	45,XX,dic(9:20)(p11;q11)[10]/46,XX[12]		del	
9	52	F	ALL B-II	45,XX,dic(9:20)(p11;q11)[20]		del	
10	2	M	ALL B-III	46,XY,dic(9:20)(p11;q11),+21[8]/46,XY[19]		del	
11	2	F	ALL B-II	46,XX,dic(9:20)(p11;q11),+21[5]/47,idem,+9[23]		del	
12	5	M	ALL B-III	47,XY,+7,dic(9:20)(p12;q11),+21[12]/46,XY[3]		del	
13	6	F	ALL B-II	47,XX,+X,+8,dic(9:20)(p11;q11)[19]/46,XX[2]		del	
14	56	M	ALL B-II	46,XY,+9,dic(9:20)(p11;q11)[16]/46,idem,del(9)(q11-12q32)[4]		del	
15	27	F	ALL B-II	45,XX,dic(9:20)(p11;q11)[6]/45,sl,del(1)(p32p34)[6]/47,sl,+18,+20[4]/46,XX[4]		del	
16	3	F	ALL B-II	45,XX,dic(7:9)(p11;p11)[11]/46,XX[6]		del	
17	53	M	ALL B-II	45,XY,dic(7:9)(p11;p11)[16]/46,XY[4]		del	
18	27	M	ALL B-III	45,XY,dic(7:9)(p11;p11),add(17)(p10)[10]/45,idem,inv(13)(q14q21)[4]		del	
19	19	F	ALL B-II	45,XX,dic(9:12)(p12;p12),t(10:13)(q25;q34)[2]/46,XX[20]		del	
20	15	M	ALL B-II	46,XY,+8,dic(9:12)(p13;p11)[24]/46,XY[3]		del	
21	17	M	ALL B-III	45,XY,dic(9:15)(p11;p11)[20]		del	
22	21	M	ALL B-III	45,XY,dic(9:17)(p11;p11)[14],idem,-4,r(16)[cp37]/46,XY[3]		del	
23	2	M	ALL B-II	46,XY,t(9:17)(p13;q22)[8]/46,XY[3]		del	
24	10	M	ALL B-II	46,XY,der(9)(9)(p11-12;q21)[17]		del	
25	58	M	ALL B-II	46,XY,add(9)(p12)[4]/46,XY[16]		del	
26	9	M	ALL B-III	46,XY,inv(9)(p12q12)[28]/46,XY[2]		del	
27	51	M	ALL B-II	46,XY,t(1:5)(q21;q31),del(9)(p12)[5]/46,XY[15]		del	
28	15	M	ALL B-II	46,XY,ins(5:5)(q12;q12q23),del(9)(p12)[25]		del	
29	8	M	ALL B-II	47,XY,del(9)(p12),add(10)(q24),del(20)(q13.1q13.3),+21c[26]		del	
30	12	M	ALL B-III	46,XY,del(9)(p12),del(12)(p11p13)[13]/46,XY[5]		del	
31	2	M	ALL B-II	45,XY,der(9:14)(p12;q11),add(22)(p11)[4]/46,XY[30]		del	
32	29	M	ALL B-I	45,XY,add(9)(p11),-20[18]/46,idem,+21[5]/46,XY[2]		del	
33	4	F	ALL B-II	46,XX,add(12)(p13),del(19)(q12)[14]/46,idem,add(9)(p12)[13]/46,XX[3]		del	
34	9	M	ALL B	45,XY,t(1:3)(q43;q23),add(9)(p12),del(12)(p13),add(15)(q26),-20[16]/46,XY[6]		del	
35	2	M	ALL B	45,XY,-7,inv(9)(p13q33),add(20)(q12)[24]/46,XY[1]		pres	
36	17	M	ALL B-II	47,XY,der(1)(1:5)(p11;q31q31),+der(5)(1:5)(p12;q22),i(9)(q10),del(13)(q13q31)[12]/46,XY[8]		del	
37	72	M	ALL B-III	47,XY,i(9)(q10),add(9)(p21),-13,+2mar[2]/46,XY[4]		del, pres	
38	48	M	ALL B-II relapse	45,X,-Y,t(3:12)(p23;q14),t(4:22)(q11;q11),del(9)(p12),ins(9)(q12:?) [20]		del	
39	8	M	ALL B-II relapse	45,XY,del(9)(p13),del(17)(p12),-18,del(20)(q12)[4]/46,idem,del(9)(q21q34),+mar[2]/46,XY[13]		del	
40	11	M	ALL B-II relapse	48,XY,der(1:9)(p10;q10),add(1)(p11)x2,t(3:9;21)(q24;q22),add(18)(q21),add(20)(q12),+21[5]/48,idem,del(6)(q22)[2]		del	
41	51	M	ALL B-III	46,XY,add(3)(q11),t(5:6)(q31-21;q16-15),i(9)(q10),ins(9)(p21;q?21),der(18)t(3:18)(q22;q23)25/46,XY[2]		del, pres	
42	4	F	ALL B-III	46,XX,del(13)(q13q21)[1]/47,sl,+21[cp7]/47,sdl1,t(6:9)(p2?:p13)[3]/46,XX[5]		pres	
43	2	F	ALL B-II	46,XX,add(7)(p12),der(9)inv(9)(p13q32)t(7:9)(p12;q32),der(20)t(9:20)(p13;p13)[11]/46,XX[3]		pres	
44	18	M	ALL B-II	45,XY,t(2:18)(p25;q21),dic(8:9)(p11;p12),t(9:16)(p22;q23)[5]/46,idem,+12[2]/46,XY[8]		del, pres	
45	44	M	ALL B-III	48,XY,-10,+3mar[cp3]/48,idem,t(9:9)(p13;q33)[cp4]/46,XY[3]		pres	
46	3	F	ALL B relapse	46,XX,der(8)(8:11)(p?:q?),t(9:10)(p12;q25)[22]/47,idem,+19[3]		del	
47	21	M	ALL B-III relapse	46,XY,der(9)(9:10)(p11;q11)[1]/46,sl,+X,-10[1]/46,sdl1,del(6)(q?) [4]/46,sdl1,t(1:4)(q2;q2),der(16)t(9:16)(p12;q23)[7]/46,XY[37]		del	
48	22	M	ALL B-II	46,XY,t(9:13)(p21;q13),i(9)(q10)[1]/46,XY,der(3)inv(3)(p1q21)(3:20)(q28;p11),der(9)t(9:13)nv(9)(p12q32),der(13)t(9:13),der(20)t(3:20)(p11;p11)[16]/46,XY[3]		del, pres	
49	13	M	ALL B-II	46,XY,t(9:13)(p12;q13-14)[7]/46,sl,del(6)(q12q16)[5]/46,sdl1,i(17)(q10)[2]/46,sdl1,del(9)(p11)2/46,sdl2,-21,+mar[2]		del	
50	3	F	ALL B-II	45,XX,der(1)(1:3)(p?:q?),der(3)t(3:9)(p2?:p13),del(6)(q15q21),der(7)del(7)(p?:q?)t(7:18)q25:?,der(9)(9:13)(p13;q?),der(9)(t(1:11)(p11;q21)(9:11)(p11;q21),der(11)del(11)(q1f2q3)t(6:11)(q?:q23),-13[17]/46,XX[1]		del, pres	
51	73	F	ALL B-II	45,XX,der(9)(9:17)(p13;q22),der(17)del(17)(p11)t(9:17)(p13;q22),-19[3]/46,XX[2]		pres	
52	2	F	ALL B-III	45,XX,del(6)(p22),der(9)t(7:6)(p11;p25)t(6:17)(p22;q22)(9:17)(p1:q25),del(13)(q13q21),der(17)t(7:17)(q22;q22),ins(18:7)(p11;p11q21),del(20)(q12),der(22)t(7:22)(q2q13q1pter)[11]/45,idem,del(11)(q22)[3]/46,XX[6]		del	
53	2	F	ALL B-II	46,XX,der(9)(9:22)(p12;q?),der(20)t(20:22)(?:q?),+21,-22[32]/46,XX[10]		del	
54	79	M	ALL B-II	46,XY,t(9:22)(q34;q11),del(9)(p12)[18]	BCR/ABL1	del	
55	49	M	ALL B	46,XY,t(9:22)(q34;q11)[27]/45,idem,dic(7:9)(p11;p11)[4]	BCR/ABL1	del	
56	50	M	ALL B-II	45,XY,der(8)(8:8)(p?:q?),t(9:22)(q34;q11),dic(9:20)(p13;q11)[20]	BCR/ABL1	del	
57	73	F	ALL B	45,XX,t(9:22)(q34;q11),der(9)t(1:9)(q11;p11),-13,der(16)t(13:16)(q11;p11)[11]/46,XX[1]	BCR/ABL1	del	
58	51	M	ALL B-II	46,XY,i(8)(q10),t(9:22)(q34;q11),der(9)t(8:9)(p12)[45]/46,XY[4]	BCR/ABL1	del	
59	33	F	ALL B-I	46,XX,t(9:22)(q34;q11),ins(12:9)(p13;p12p21)[9]/46,XX[6]	BCR/ABL1	del	
60	63	F	ALL B-III	46,XX,+X,add(2)(q37),-7,t(9:22)(q34;q11),der(9)t(9:22)(p11;q11)[5]/46,XX[1]	BCR/ABL1	del	
61	8	F	ALL B-II relapse	46,XX,der(9)del(9)(p12)t(9:22)(q34;q11),der(22)t(9:22)[17]/46,XX[3]	BCR/ABL1	del	
62	67	M	ALL B-II	45,XY,der(9)del(9)(p13)t(9:22)(q34;q11),?del(16)(q11),-20,der(22)t(9:22)[12]/46,XY[8]	BCR/ABL1	del	
63	20	F	ALL B-III relapse	46,XX,der(9)del(9)(p13)t(9:22)(q34;q11),del(11)(q14q25),der(22)t(9:22)[2]/46,sl,der(8)t(1:8)(q12;p21)[3]/46,sl,dup(1)(q12q32)[2]/46,XX[16]	BCR/ABL1	del	
64	47	F	ALL B-II	47,X,-X,del(4)(q11),i(8)(q10),der(9)add(9)(p11)t(9:22)(q34;q11),der(22)t(9:22),+2mar[1]/46,XX[5]	BCR/ABL1	del	
65	64	M	ALL B-II	45,XY,-7,der(9)add(9)(p12)t(9:22)(q34;q11),der(22)t(9:22)[3]/46,XY[17]	BCR/ABL1	del	
66	57	F	ALL B-II	46,XX,ins(2:9)(p23;p21p24),der(9)del(9)(p12)t(9:22)(q34;q11),der(22)t(9:22)[10]/46,XX[10]	BCR/ABL1	del	
67	60	F	ALL B-III	46,XX,der(2)t(2:9)(p23;p21),der(7)t(2:7)(p24;p15),der(9)t(7:9)(p22;p11)t(9:22)(q34;q11),der(22)t(9:22)[22]	BCR/ABL1	del	
68	8	M	ALL B-II	46,XY,der(9)del(9)(p12)t(9:22)(q34;q11),der(22)t(9:22)[14]/46,XY,der(9)(5:9)(q11;p12)t(9:22)q34;q11,der(22)t(9:22)[2]/46,XY[10]	BCR/ABL1	del	
69	55	M	ALL B-II	45,XY,-7,der(9)t(7:9)(p11;p13)t(9:22)(q34;q11),der(22)t(9:22)[2]/45,sl,add(11)(q23)[11]/46,sl,+der(22)t(9:22)[2]/46,XY[5]	BCR/ABL1	del	
70	79	F	ALL B-II	48,XX,der(9)(8:9)(q11;p12)t(9:22)(q34;q11),-20,der(22)t(9:22),+der(22)t(9:22),+2mar[cp11]/46,XX[11]	BCR/ABL1	del	
71	48	M	ALL B-II	46,XY,t(9:22)(q34;q11)[3]/46,sl,del(9)(p13)[7]/46,sdl1,der(8)t(8:9)(q12;p13),der(9)t(8:9)(q12;p13)t(9:22)(q34;q11),der(22)t(9:22)[17]	BCR/ABL1	del, pres	
72	3	M	ALL B-II	46,XY,der(9)22q11:-9q34:-22q11,der(22)t(9:22)[8]/45,idem,dic(8:17)(p11;p11)[11]/46,XY[1]	BCR/ABL1	del	
73	54	M	ALL B-III	46,XY,+7,der(9)t(9:22)(q34;q11),der(11:22)(?:q?),ider(22)t(9:22)[7]/44,sl,der(2)t(2:3)(q24;q25)del(3)(q?),-8,-9[4]/46,sl,der(7)t(7:9)(p11:?) [2]/44,sdl1,-9,-der(9)t(9:22),+der(9)(9:9)(p?:q34)t(9:15)(p?:q?)t(9:22)(q34;q11),-15[9]/46,XY[28]	BCR/ABL1	del	
74	10	M	ALL B-III	46,XY,del(9)(p21),del(9)(p12),der(19)t(1:19)(q23;p13)[12]/46,XY[5]	TCF3/PBX1	del, pres	
75	7	F	ALL B-III	46,XX,i(9)(q10),der(19)t(1:19)(q23;p13)[28]	TCF3/PBX1	del	
76	13	M	ALL B-III	46,XY,i(9)(q10),der(19)t(1:19)(q23;p13)[2]/45,idem,-6[5]/46,XY[10]	TCF3/PBX1	del	
77	4	M	ALL B-III	46,XY,del(6)(q23),i(9)(q10),del(13)(q13q31),der(19)t(1:19)(q23;p13)[8]/46,XY[9]	TCF3/PBX1	del	
78	6	M	ALL B-III	47,XY,+Yc,-6,del(7)(p13),der(19)t(1:19)(q23;p13),der(22)(1:22)(q11;p11),+mar[11]/47,sl,add(6)(?) ,der(9)t(6:9)(?:p11)[3]/47,sl,i(15)(q10)[2]/47,XY,+Yc[36]	TCF3/PBX1	del	
79	20	M	ALL B-III	46,XY,der(9)(9:9)(p12;q11),der(19)t(1:19)(q23;p13)[7]	TCF3/PBX1	del	
80	14	M	ALL B-III	46,XY,add(7)(p?),der(9)(9:9)(p12;q33),del(14)(q2?),der(19)t(1:19)(q23;p13)[cp12]/50,idem,+2,+3mar[cp5]/46,XY[3]	TCF3/PBX1	del	

81	3	F	ALL B-III	46.XX,t(1;19)(q23;p13)[3]/45.idem,i(9)(q10).-17 or der(9:17)(q?:q?)[15]	TCF3/PBX1	del	
82	15	M	ALL B-III	46.XY,der(9)t(9:20)(p13;p11),der(11)t(9:11)(p21;q23),der(19)t(1;19)(q23;p13),der(20)t(20;21)(q11;q11)[11]/46.idem,del(6)(q15;q24)[3]	TCF3/PBX1	del	
83	3	F	ALL B-III	48.XX,add(9)(p11).+2mar[4]/46.XX[16]	ETV6/RUNX1	del	
84	2	F	ALL B-II	49.XX,+X,add(9)(p12).-20,+21,+21[11]/50.idem,+X(13)/46.XX[10]	ETV6/RUNX1	del	
85	4	F	ALL B-II	46.XX,der(9)t(9:17)(p12;q12),del(12)(p12;p13),del(17)(q12)[cp3]/46.XX[17]	ETV6/RUNX1	del	
86	3	M	ALL B-II	45.XY,del(6)(q16;q23),dic(9:2)(p12;p12)[10]/46.XY[5]	ETV6/RUNX1	del	
87	6	F	ALL B-II	45.X,- X,der(6)t(X;6)(?:q?),t(9:9)(p12;q33),del(10)(?),der(11)t(10;11)(?:q21),del(12)(p13),der(15)t(10;15)(?:q26)[13]/44.idem,-del(10)[9]/46.XX[16]	ETV6/RUNX1	del	
88	28	F	ALL B-II	45.X,-X,add(1)(p11),add(4)(q12),del(6)(p23),i(9)(q10),add(11)(p13),add(14)(q32)[16]/46.XX[4]	IGH	del	
89	14	F	ALL B-II	45.XX,-6,t(6;14)(p22;q32).+del(7)(q22),add(9)(p12),+i(9)(q10).-10,add(12)(p13).-13,-14,+21[cp11]/46.XX[17]	IGH	del	
90	58	M	ALL B-II	44.X,-Y,t(6;14)(p22;q32),dic(7:9)(p11;p11)[7]/46.XY[5]	IGH	del	
91	9	M	ALL B-II	47.XY,+5,t(6;14)(p22;q32),t(7:11:9)(q35;p14-15;p22),i(9)(q10)[8]/46.XY[21]	IGH	del, pres	
92	1 month	M	ALL B-I	46.XY,inv(9)(p11;q13),t(11;19)(q23;p13.3)[2]/47.idem,+X[32]	MLL/ENL	pres	
Intragenic PAX5 rearrangement (n=32)							
93	1	M	ALL B-III	46.XY,t(7:9)(q11;p13)[21]/46.XY[3]		pres	out of frame PAX5 (exon 5) / POM121 (exon 3)
94	16	M	ALL B-III	46.Y,t(X;9)(p21;p13),del(12)(p12)[29]/46.XY[1]		pres	No material available
95	1	F	ALL B-III	45.XX,del(4)(p1;p15),dic(7:9)(p1;p13),i(11)(p22;q23).-13,add(18)(q?),+der(7)(?:9)(p13)[8]/46.XX[15]	MLL/MLLT3	pres	No material available
96	4	M	ALL B-III	46.Y,t(X;9)(q21;p13)[10]/46.XY[10]		par del	PAX5 (exon 5) / DACH2 (exon 3)
97	44	F	ALL B-II	46.XX,der(9)t(3:9)(p14;p13)[8]/46.XX[5]		par del	PAX5 (exon 6) / FOXP1 (exon 7)
98	56	F	ALL B-II	46.XX,inv(2)(p1;q13)[7q3]/46.idem,t(3:9)(p14;p13),t(10;14)(p12;q32)[15]	IGH	par del	PAX5 (exon 6) / FOXP1 (exon 7)
99	8	M	ALL B-II	45.XY,dic(9:12)(p13;p13)[19]/46.XY[5]		par del	PAX5 (exon 4) / ETV6 (exon 3)
100	26	M	ALL B-II	45.XY,dic(9:12)(p13;p13)[4]/46.XY[6]		par del	PAX5 (exon 4) / ETV6 (exon 3)
101	2	M	ALL B-II	45.XY,der(9)t(9:17)(p13;p11),dic(17:20)(p11;q11)[20]/46.XY[3]		par del	PAX5 (exon 5) / NCOR1 (exon 43) opposite orientation PAX5 (exon 5) / TAOK1 (intron 20-19)
102	3	F	ALL B-III	46.XX,+X,dic(9:17)(p13;q11),der(20)t(17;20)(q11;q11)[17]/46.XX[3]		par del	
103	21	M	ALL B-II	49.XY,+5,+der(9)t(9:15)(p13;q24).+21[11]/46.XY[5]		par del	PAX5 (exon 6) / GOLGA6 (exon 3)
104	82	M	ALL B-II	46.XY,t(3:9)(p11;p13)[3]/46.XY[12]		par del	No material available
105	15	F	ALL B-II	45.XX,der(2)(2pter->q32::3::9),der(3)(3:2)(?:?),dic(9:12)(p13;p13)[24]/46.XX[6]		par del	PAX5 (exon 4) - ETV6 (exon 3)
106	6	M	ALL B-II	48.XY,+8,+8,dic(9:12)(p12;p12).+der(12)(12q11->12p13::9p13),der(13)del(13)(q13q21)t(11;13)(?:?)18]/46.XY[2]		par del, del	No material available
107	1.5	M	ALL B-II	45.XY,dic(9:16)(p13;p11),der(20)t(16;20)(p11;q11)[17]/46.XY[1]		par del	truncated PAX5
108	15	M	ALL B-III	45.XY,dic(9:16)(p13;q11)[16]/44.idem.-21[3]		par del	truncated PAX5
109	2	M	ALL B-II	45.XY,der(4)(4;14)(p16;q11),dup(8)(q22;q24),dic(9:16)(p12;q11).-14,+der(7)(?:9)(p13)[9]/45.idem,del(11)(q11)[6]		par del, del	No fusion transcript detected
110	1	M	ALL B-III	46.XY,t(1;10)(p13;p12),t(9:17)(p13;p12)[4]/46.XY[13]		par del	No material available
111	2	M	ALL B-II	45.XY,dic(9:20)(p13;q11)[2]/46.XY[1]		par del	No fusion transcript detected truncated PAX5
112	2	M	ALL B-III	45.XY,dic(9:20)(p13;q11)[13]/46.XY[7]		par del	PAX5 (exon 5) / ILAGL2
113	2	F	ALL B-III	46.XX,dic(9:20)(p13;q11).+del(20)(q11)[15]/46.XX[1]		par del	No material available
114	3	F	ALL B-II	46.XX,der(9)del(9)(p13)del(9)(q11),der(20)pter->20q11::9p13::9q11->9qter[13]/46.XX[1]		par del	No material available
115	1	F	ALL B-II	45.XX,dic(9:20)(p13;q11),inv(9)(q22;q34)[4]/45.XX,der(9)(::9p13->9q13::9p13->?::9q13->9q22::?9q34->9q22).-20[3]/46.sl,+der(9)add(9)(p13)del(9)(q12)[12]		par del, del	No fusion transcript detected
116	2	M	ALL B-III	45.XY,der(5)t(5;18)(q35;q11-12),add(9)(p13).-18[28]/46.XY[5]		par del	No fusion transcript detected
117	3	M	ALL B-II	45.XY,t(1;5)(q24;q35),dic(9:17)(p13;p11)[5]/46.XY[26]		par del	No fusion transcript detected
118	14	M	ALL B-II	46.XY,t(7;?:)(?:?)t(9:14)(p22;q12),del(9)(p13p24)[6]/46.XY[24]		par del, pres	PAX5 (exon 5) / JAK2 (exon 19)
119	37	M	ALL B-III	46.XY,t(7:9)(q11;p13)[17]		pres	PAX5 (exon 7) / ENL (exon 2)
120	4	M	ALL B-I	46.XY,t(7:9)(q11;p13)[2]/46.XY[18]		pres	PAX5 (exon 7) / ENL (exon 2)
121	16	M	ALL B-II	46.XY,t(7:9)(q11;p13),del(9)(p21)[14]/46.XY[1]		par del	PAX5 (exon 7) / ENL (exon 2)
122	57	F	ALL B-II	46.XX,add(9)(p13)[3]/48.idem,+4,+21[7]/46.XX[6]		par del	truncated PAX5
123	8	F	ALL B-III	45.XX,del(6)(q?:q?)-9,der(12)(12qter->12p12::9p13::9q11->9qter)[6]/46.XX[4]		par del	No material available
124	78	F	ALL B-II	46.XX,t(9:11)(p13;q22),del(20)(q12)[3]/46.XX,dup(8)(q?:q?)[3]/46.XX[14]		par del	No material available
telomeric breakpoint (n=29)							
125	5	F	ALL B-II	46.XX,del(9)(p21)[6]/46.XX[22]		pres	
126	1	F	ALL B-II	45.XX,dic(9:20)(p21;q11)[13]/46.XX[7]		pres	
127	3	M	ALL B-III	45.XY,dic(9:20)(p13;q11)[5]/46.idem,+21[3]/46.XY[7]		par del	
128	1	F	ALL B-II	45.XX,dic(9:20)(p21;q12)[3]/46.idem,+mar[2]/46.XX[13]		pres	
129	21	F	ALL B-II	46.XX,t(2:9)(q22;p21)[19]/46.XX[1]		pres	
130	63	M	ALL B-III	46.XY,der(9)t(7:9)(q35;p24)[13]/46.XY[2]		pres	
131	16	M	ALL B-II	46.XY,add(9)(p21)[2]/46.XY[18]		pres	
132	5	F	ALL B-II	47.XX,del(1)(q32),inv(9)(p22-23q11).+21c[21]/47.XX,+21c[39]		pres	
133	8	M	ALL B	46.XY,der(9)t(9:9)(p23;q21),dic(9:9)(p21;p21)[12]/46.XY[8]		pres	
134	13	F	ALL B-II	46.XX,add(1)(p3?5),t(9:15)(p22;q12)[9]/46.XX[7]		pres	
135	52	M	ALL B-I	46.XY,del(3)(q2?6),del(6)(q2?1q?3),der(9)(p21).-11.-12,del(12)(p11),del(13)(q13q21).+2mar[5]/46.XY[10]		pres	
136	38	F	ALL B-II	46.XX,t(2;13)(q31;q34),dic(3;4)(p1;p16),del(6)(q13q21),add(9)(p21)x2,add(19)(p12)[20]		pres	
137	9	F	relapse	54.XX,+X,+4,+8,inv(9)(p21;q34).+19,+21,+21,+2mar[17]/46.XY[3]		pres	
138	59	F	relapse	47.XX,t(4;9)(q24;p21),add(14)(p12).?der(18).+amin[17]/46-47.idem,-7 or del(7)(q21;qter)[3]/46.XX[1]		pres	
139	10	F	ALL B-III	46.XX,t(3;4)(q12;q35),t(5;8)(q14;q21),der(7)t(7:9)(q22;q31),der(9)add(9)(p23)t(7:9)(q22;q31),rel(9)(p21)[18]/46.XX[2]		pres	
140	12	M	ALL B-II	46.XY,add(4)(q35),t(8:9)(q24;p22),add(9)(p23),add(12)(p13)[16]/46.idem,der(8)t(8;8)(p23;q21)4]/46.XY[7]		pres	
141	12	M	ALL B-III	50.XY,+X,+4,+8,t(9:9)(p13;q11).+12[7]/51.idem,-12,+13,+21[12]/46.XY[1]		par del	
142	23	F	ALL B-II	44.XX,+5,-6,der(6)del(6)(q16q23)t(6;22)(q27;q12).-9,der(9)t(9:9)(p21;q31)add(9)(q34),t(10;10)(q23;q26),del(12)(p1p12),der(17)add(17)(p11)del(17)(q22q23),der(21)t(6;21)(q11;p11),hsr(22q),der(22)t(17;22)(p11;q?)16]/46.XX[1]		pres	
143	15	M	ALL B-II	45.X,-Y,der(9)t(9:13)(p21;q14).?dup(13)(q12q14)[4]/46.idem,t(X;8)(p22;q22)[7]/46.XY[12]		pres	
144	21	M	ALL B-I relapse	45.X,-Y,+X,der(9)t(9:13)(q34;q14).-13,-20,+mar[21]/45.idem,-der(9).+der(9)del(9)(p21)t(9:13)(q34;q14)[2]/46.XY[2]		pres	
145	9	M	ALL B relapse	49.XY,inv(1)(p21;q43),del(2)(p16),del(6)(q13q23),t(9:13)(p24;q11),add(12)(p13).+add(16).+21+mar[15]/46.XY[11]		pres	
146	5	F	ALL B-II relapse	46.-X,t(X;9)(q11;p21),der(2)(2:7)(p23;p11).-7,+8,+12,del(12)(q11),der(13)ins(13;15)(q12;q12q15)(12;13)(q1;q34),del(15)(q12q15)[16]/46.idem,t(11;17)(q23;q22)[4]		pres	
147	5	M	ALL B-III	46.XY,add(1)(q43),del(9)(p21),del(12)(p13)[16]/46.XY[1]	ETV6/RUNX1	pres	
148	15	M	ALL B-II relapse	47.XY,t(5;12)(q22;p12),del(7)(p15),add(9)(p22).+10[6]/46.XY[1]	ETV6/RUNX1	pres	
149	12	M	ALL B-II	46.XY,t(2;3)(p16;p14),del(6)(q14),t(11;19)(p11;q11),t(12;20)(p12;q12),der(16)t(16;19),der(16)t(16;21)[9]/46.sl.-4,t(5;9)(p7;14;p23).+21[16]/49.sl.+10,+19,+21[cp6]/50.sl.+2[5]/46.XY[4]	ETV6/RUNX1	pres	
150	5	F	ALL B-II	46.XX,del(8)(q11),dic(9:13)(p21;p11).+10,del(11)(q21),add(12)(p13),add(15)(q14-15)[16]/47.idem,+der(21)t(12;21)[3]/46.XX[6]	ETV6/RUNX1	pres	
151	2	M	ALL B-II	46.XY,t(5:9)(q22;p22)[3]/46.XY[20]	BCR/ABL1	pres	
152	41	M	ALL B-III	55.XY,+X,+4,+6,t(9:22)(q34;q11),der(9)(9q34::22q11::9p21->9q34).+11,+14,+14,+17,+21,+21[11]	BCR/ABL1	pres	
153	35	M	ALL B-III	46.XY,t(1;19)(q23;p13),der(15)t(1;15)(q12;p11),der(18)t(1;18)(q12;p11)[8]/46.idem,del(9)(p21)3]/46.XY[4]	TCF3/PBX1	pres	

A

cytogenetic subgroup	t(9;22)	t(1;19)	t(12;21)	t(14q32)	t(11q23)	del(20q)	del(12p)	t(9q)	abn(13q)	del(6q)	+8/8q	del(7p)	abn(11q)	t(7q)	del(17p)	t(5q)	Breakpoint/ PAX5			complex	high hyper	
																	centro	intra	telo			
t(9;22)	4																					
t(1;19)		8																				
t(12;21)			9																			
t(14q32)				2																		
t(11q23)/ MLL					2																	
del(20q)						21																
del(12p)			5	1			16															
t(9q other than ABL1)		1	1		1	4	1	15														
abn(13q)		1				1	2		9													
del(6q)		2	3			1	4	2	3	9												
+8/8q						1	3		2		6											
del(7p)		2	1		1			1	1			6										
abn(11q) other than MLL		1	2			1	2	1	3	2	1	1	7									
t(7q)				1		1		1	2			1	2	6								
del(17p)	1	1				1			1	1					5							
t(5q)	1		1					1				1		1	1	6						
Breakpoint / PAX5	centromeric	3	8	5	2	1	10	8	8	5	6	2	4	5	3	4	1	48				
	intragenic					1	8	4	2	1	1	2	1	2	1	2	2	22				
	telomeric	1		4			3	4	5	3	2	2	1	2	1	3	2	1	19			
complex	NA	NA	NA	NA	NA	10	5	7	8	3	5	1	4	3	2	1	16	5	7	28		
high hyper								1											1	1	1	

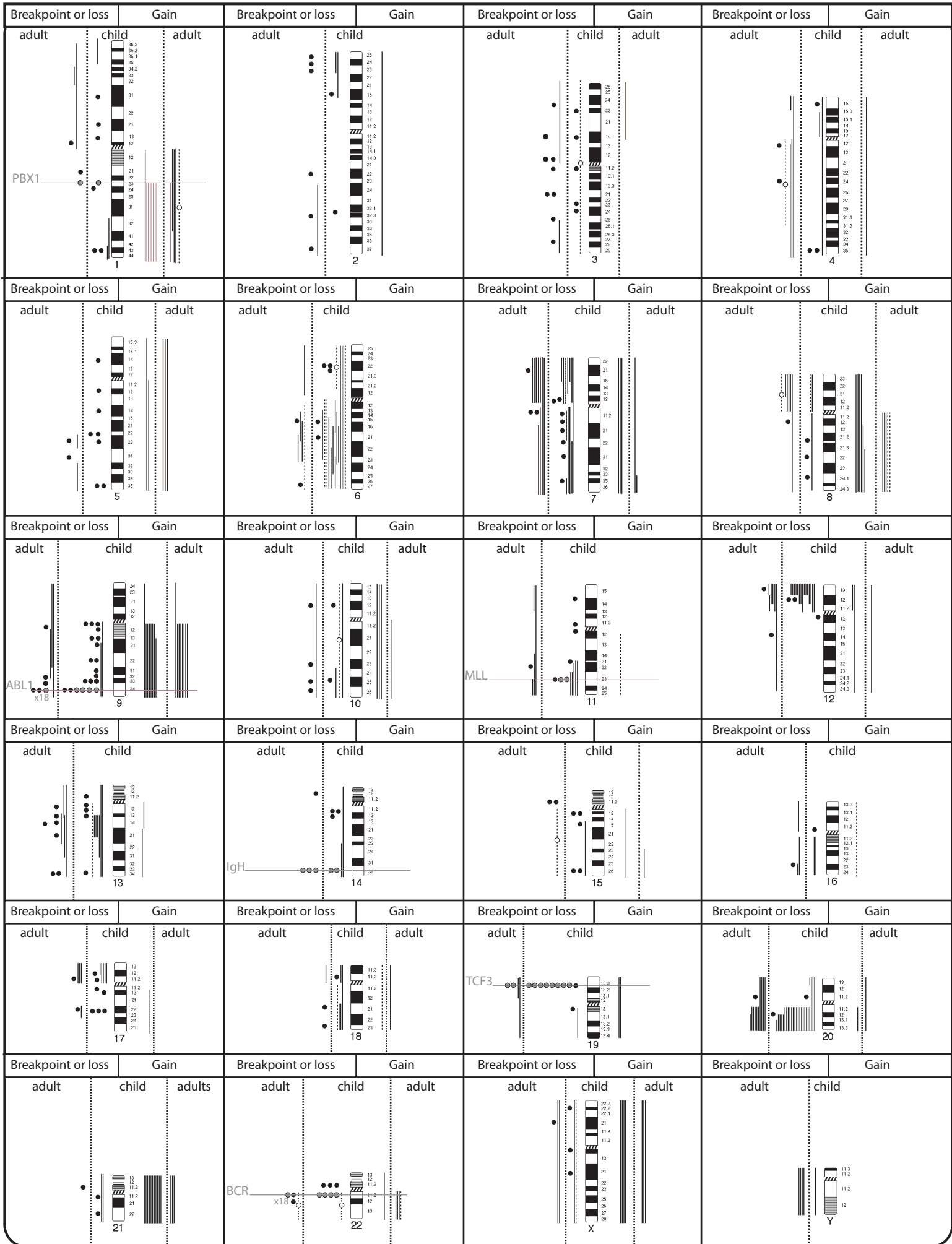
B

cytogenetic subgroup	t(9;22)	t(1;19)	t(12;21)	t(14q32)	t(11q23)	del(20q)	del(12p)	t(9q)	abn(13q)	del(6q)	+8/8q	del(7p)	abn(11q)	t(7q)	del(17p)	t(5q)	Breakpoint/ PAX5			complex	high hyper		
																	centro	intra	telo				
t(9;22)	18																						
t(1;19)		2																					
t(12;21)			0																				
t(14q32)				3																			
t(11q23)/ MLL					0																		
del(20q)	1					6																	
del(12p)							5																
t(9q other than ABL1)		1					1	6															
abn(13q)	1						2	2	8														
del(6q)							2	1	2	4													
+8/8q	4					2					5												
del(7p)	2			1					1			5											
abn(11q) other than MLL	2					1					1		3										
t(7q)														3									
del(17p)									1			1			3								
t(5q)																2							
Breakpoint / PAX5	centromeric	17	1		2	5	1	4	5	1	4	5	2		3	2	44						
	intragenic				1	1	2				1		1	2				10					
	telomeric	1	1				2	2	3	3				1				3	1	10			
complex	NA	NA	NA	NA	NA	3	2	5	6	4	1	1	1		3	1	14	3	5	22			
high hyper	1																		1				1

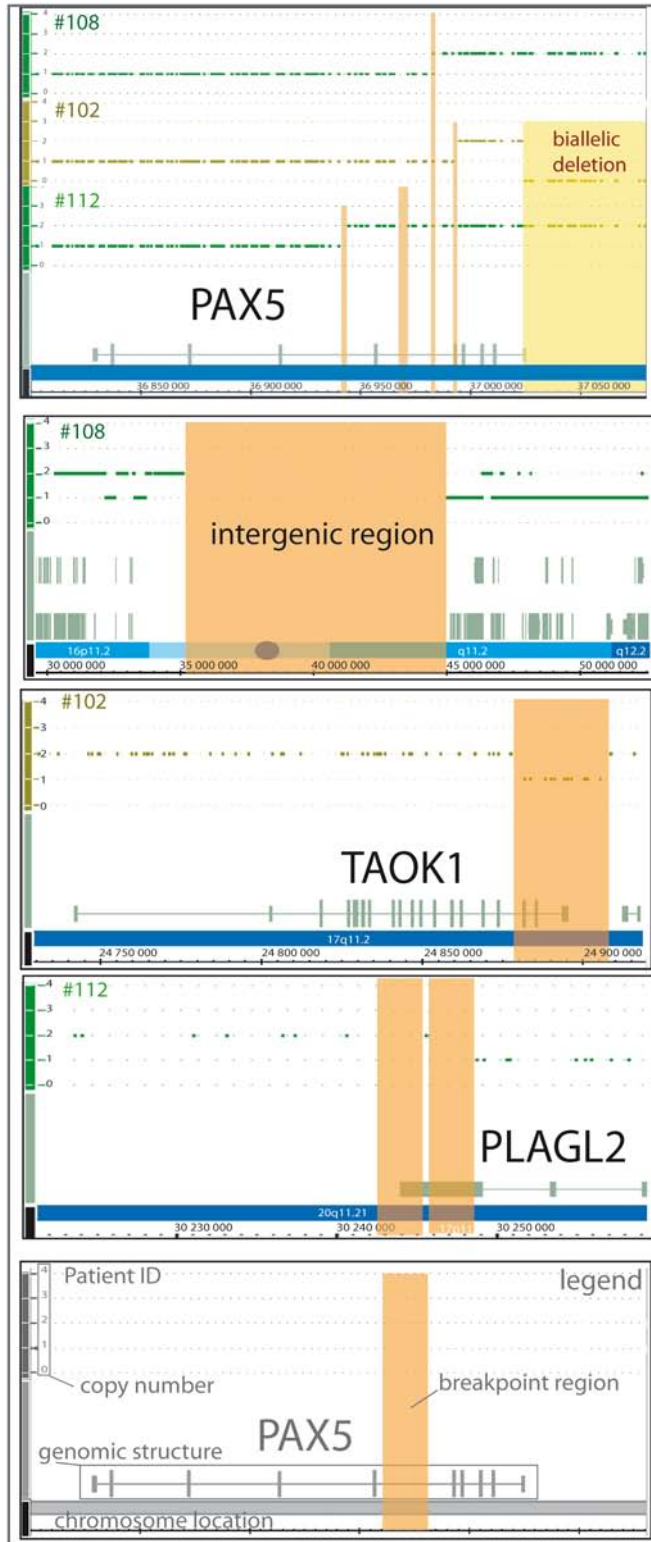
	nucleotide sequence	predictive fusion protein sequence
PAX5-DACH2	<p>...ACCCAACCAACCAGTCCCAGCTTCCAGT CACAGCATAGTGTCCACTGGCTCCGTGACG CAGGTGTCCTCGGTGAGCACGGATTCCGGC CGGCTCGTCTACTCCATCAGCGGCATCCT GGGCATCACGTCCCCAGCGCCGACACCA ACAAGCGCAAGAGAGACGAAGGTATAACA GCTGCAGCGATGGCTGAGGCGATGAAACTT CAGAAGATGAAGCTTATGGCTATGAACACTC TTCAGGGAAATGGAAGCCAAAATGGGACCG AATCAGAGCCTGATGATCTTAATTCTAACAC AGGTGGAAGTG...</p>	<p>MDLEKNYPTPRTSRTGHGGVNLGGVFNDRPLP DVVRQRIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILG RYYETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVEKIAEYKRQN PTMFAWEIRDLLAERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKV QQPPNQVPASSHSIVSTGSVTQVSSVSTDSAGSS YSISGILGITSPSADTNKRKRDEGITAAMAAMAEAMKLQ KMKLMAMNTLQGNQSQNGTESEPDDLNSNTGGSE SSWDKDKMQSPFAAPGPQHGIHAALAGQPGIGGA PTLNPLQQNHLLTNRLDLPFMMMPHLLPVSLPPAS VAMAMNQMNHLNTIANMAAAQIHSPLSRAGTSVIK ERIPESPSPAPSLEENHRPGSQTSSTSSSVSSSPS QMDHHLERMEEVPVQIPIPKSPLDKIQLTPGQALPA GFPGPFIFADSLSSVETLLTNIQGLLKVALDNARIQEK QIQQEKELRLELYREREIRENLERQLAVELQSRRT MQKRLKKEKTKRKLQEALEFESKRREQVEALKQ ATTSDSGLRMLKDTGIPDIEIENNGTPHDSAAMQGG NYYCLEMAQQLYSA</p>
PAX5-NCOR1	<p>...ACCCAACCAACCAGTCCCAGCTTCCAGT CACAGCATAGTGTCCACTGGCTCCGTGACG CAGGTGTCCTCGGTGAGCACGGATTCCGGC CGGCTCGTCTACTCCATCAGCGGCATCCT GGGCATCACGTCCCCAGCGCCGACACCA ACAAGCGCAAGAGAGACGAAGCAGCTGCT CAGCCAGGAAGTGGATCTTTAATCTGCCA GCAGTTACTACGTCAGGCTCAGTTAGCTCTA GAGGCCATTCTTTGCTGATCCTGCCAGTAA TCTTGGGCTGGAAGACATTATCAGGAAGGC TCTCATGGGAAGCTTTGATGACAAAAGTTGAG GATCATGGAGTTGTCATGTCCCAGCCTATG GGAGTAGTGCCTGGTACTGCCAACACC...</p>	<p>MDLEKNYPTPRTSRTGHGGVNLGGVFNDRPLP DVVRQRIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILG RYYETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVEKIAEYKRQN PTMFAWEIRDLLAERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKV QQPPNQVPASSHSIVSTGSVTQVSSVSTDSAGSS YSISGILGITSPSADTNKRKRDEAAAQPGTEIFNLPA VTTSGSVSSRGHSFADPASNLGLEDIIRKALMGSD DKVEDHGVVMSQPMGVVPGTANTSVVTSGETRRE EGDPSPHSGGVCKPKLISKNSNRKSKSPIPGQGYLG TERPSSVSSVHSEGDYHRQTPGWAWEDRPSSTGS TQFPYNPLTMRMLSSTPPTPIACAPSAVNQAAAPHQ QNRIVEREPAPLLSAQYETLSDSD</p>
PAX5-GOLGA6	<p>...CAGGTGTCCTCGGTGAGCACGGATTCCGG CCGGCTCGTCTACTCCATCAGCGGCATCC TGGGCATCACGTCCCCAGCGCCGACACC ACAAGCGCAAGAGAGACGAAGGTATTCA GGAGTCTCCGGTGCCGAACGGCCACTCGC TTCCGGCGAGAGACTTCTCCGGAAGCAG ATGCGGGGAGACTTGTTCACACAGCAGCA GCTGGAGGTGCTGGACCGCGTGTGTTGAGA GGCAGCACTACTCAGACATCTTACCACCA CAGAGCCCATCAAGCCCAGCAGAGCCAG TACCAAGAACTAGCAGTAGCCCTGGAGTCA AGCTCAGTGACAATCAGTCAACTCAATGAAA ACATAGAATCATTGAAACAGCAGAAGAAACA AGTGAACATCAGCTGGAAGAAGCAAAGAA AACAAACAATGAAATACACAAAGCACAAATG GAGCGGTTAGAGACAATCAACATCCTCACAT TGGAAAAGGCAG...</p>	<p>MDLEKNYPTPRTSRTGHGGVNLGGVFNDRPLP DVVRQRIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILG RYYETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVEKIAEYKRQN PTMFAWEIRDLLAERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKV QQPPNQVPASSHSIVSTGSVTQVSSVSTDSAGSS YSISGILGITSPSADTNKRKRDEGIQESVPPNGHSLP GRDFLRKQMRGDLFTQQQLEVLDRVFERQHYSDF TTTEPIKPEQSQYQELAVALESSSVTISQLNENIESLK QQKKQVEHQLEEAKKTNNEIHKQMERLETINILTLE KADLKTTLYHTKRAARHFEEESKDLAGRLQYSLQRI QELERALCAVSTQQQEEDRSSSCREAVLQRWLQ TIKERALLNAHVTVTEESLQKQVLERDEYAKHIKGER ARWQERMWKMVSVEARTLKEEKRDHRIQELERSL SELKNQMAEPPSLAPPVAVSVEQLQDEAKHLRQE VEGLEGLQSQVENNQALSLLSKEQKQRLQEQUEM LREQEAQRVREQERLCEQNERLREQQKTLQEQQE RLRKQEQRLRKQEERLKEEERLQKQEKRLWDQE ERLWKKEERLQKQEERLALSQNHKLDKQLAEPQCS FEDLNNEKKSALQLEQQVKELQEKLDEEHLEAASH QNQQLETQLSLVALPGEQDGGQHLDSEEEEEAPRPT PNIPEDLESREATSSFMDLPKEKADGTEQVERRELG FVQPSGVTGDMRESFTVYESQGAVPNTRHQEMED VIRLAQKEEEMKVKLELQELVPLVGNHEGHGKFLI AAQNPADPTPGAPAPQELGAAGEQDVFYEVSLDN NVEPAPGAAREGSPHDNPTVQQIVQLSPVMQDT</p>
PAX5-TAOK1	<p>...AGTGTCCACTGGCTCCGTGACGCAGGTG TCCTCGGTGAGCACGGATTCCGGCCGGCTC GTCGTACTCCATCAGCGGCATCCTGGGCAT CAGTCCCCAGCGCCGACACCAACAAGC GCAAGAGAGACGAAGGAACTATAGGAAATA GAGGAAAAATCTACAGGCCTATGGTCCAGA</p>	<p>MEIHCKHDPFASMHGHGGVNLGGVFNDRPLP VVRQRIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILG RYYETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVEKIAEYKRQN PTMFAWEIRDLLAERVCDNDTVPSVSSINRIIR TKVQQPPNQVPASSHSIVSTGSVTQVSSVSTDSA GSSYSISGILGITSPSADTNKRKRDEGTIGNRGI</p>

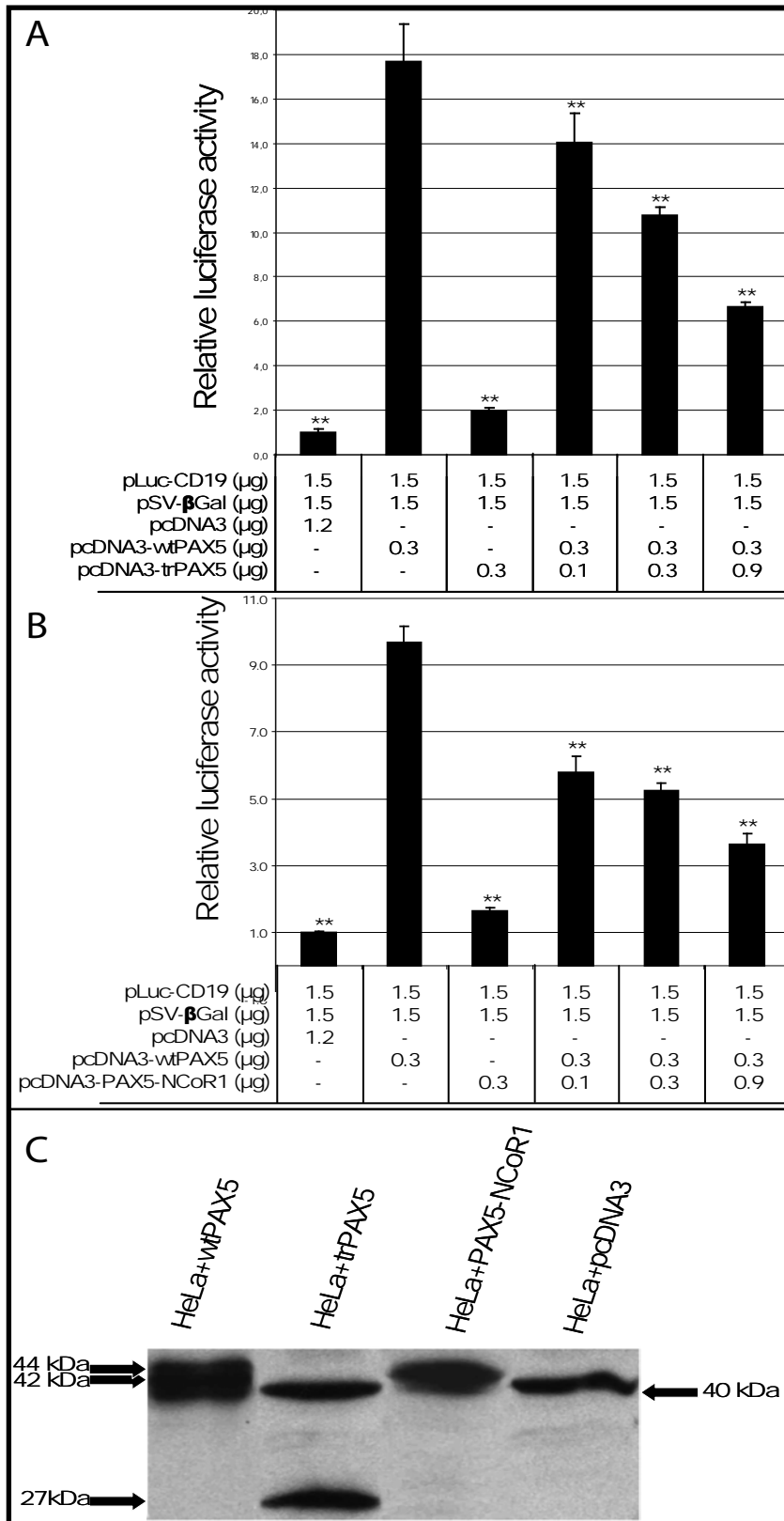
	<p>ACAATGACAACCTTTAGGAAGATCATTAGGT AAGTATTAATGCGATAACCGACGGACCTAA GACTACATCAGCTGTTGGGAATTTAAGACTC AA...</p>	<p>YRPMVQKQ</p>
<p>trPAX5 (intronic coding sequence is represented in small letters)</p>	<p>ATGGATTTAGAGAAAAATTATCCGACTCCTC GGACCAGCAGGACAGGACATGGAGGAGTG AATCAGCTTGGGGGGGTTTTGTGAATGGA CGGCCACTCCCGGATGTAGTCCGCCAGAG GATAGTGGAACCTGCTCATCAAGGTGTCAG GCCCTGCGACATCTCCAGGCAGCTTCGGGT CAGCCATGGTTGTGTGTCAGCAAATTTCTTGGC AGGTATTATGAGACAGGAAGCATCAAGCCT GGGGTAATTGGAGGATCCAAACCAAAGGTC GCCACACCCAAAGTGGTGAAAAAATCGCT GAATATAAACGCCAAAATCCCACCATGTTTG CCTGGGAGATCAGGGACCGGCTGCTGGCA GAGCGGGTGTGTGACAATGACACCGTGCCT AGCGTCAGTTCATCAACAGGATCATCCGG ACAAAAGTACAGCAGCCACCCAACCAACCA GTCCCAGCTTCCAGTCACAGCATAGTGTCC ACTGGCTCCGTGACGCAGGTGTCCTCGGTG AGCACGGATTCGGCCGGCTCGTCTACTCC ATCAGCGGCATCCTGGGCATCACGTCCCC AGCGCCGACACCAACAAGCGCAAGAGAGAC GAA<i>G</i>taagagagggcccgcgcagccccgtcggGgatgcg ctccacggggtctgttccggcgctcggtcgcggtggcagcag aggtgcccGgaacaccccccttacctgcagaggagcagtc ccccggcccgcacgctgtcctttcgtGaacacgggaaagggc tga</p>	<p>MDLEKNYPTPRTSRTGHGGVNQLGGVFNDRPLP DVVRQRIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILG RYYETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVEKIAEYKRQN PTMFAWEIRDLLAERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKV QPPNPQVPASSHSIVSTGSVTQVSSVSTDSAGSS YSISGILGITSPADTNKRKRDEGKRGPRSPVGDAL HGVCFRRSVAGGSRGAREHPPYLQRSESPGPHAV LfvntgkG</p>
<p>PAX5-POM121 (interstitial coding sequence is represented in small italic)</p>	<p>...GTGTCCTCGGTGAGCACGGATTCGGCCG GCTCGTCTACTCCATCAGCGGCATCCTGG GCATCACGCTCCCCAGCGCCGACACCAAC AAGCGCAAGAGAGACGAAG<i>ATCACCTGAAAGTATC TTGGGGACCCCTTCTTCCAACCTGGCAGGGCTCCCTGGACTACA CTTTGAAAATTTCTGCTTACCAAATCGGTTTGTAAATA ACACCTAGAAGACGCTATCCGATCCATCAG GCCAGTATTCTGTCTGGGGTACTTCCC ACCGTGTGCTGGAATGGTTATCACAAGAAG GCTGTGCTGTCCCCTCGCAACTCCAGGATG GTGTGTAGCCCAGTGACTGTGAGGAT...</i></p>	<p>MDLEKNYPTPRTSRTGHGGVNQLGGVFNDRPLP DVVRQRIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILG RYYETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVEKIAEYKRQN PTMFAWEIRDLLAERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKV QPPNPQVPASSHSIVSTGSVTQVSSVSTDSAGSS YSISGILGITSPADTNKRKRDE<i>DHLKVSWGPLLPTLAGLPLH FENFCLPNRFVITPRRRYPIHQAYSCGLVPTVCWNGYHKKAVLSPRNSRM VCSPVTVRIAPPDRRFRSAIPEQIISSTLSSPSSNAP DPCAKETVLSALKEKEKRTVEEEDQIFLDGQENKR RRHDSGSGHSAFEPLVANGVPASVFPKPGSLKRG LNSQSSDDHLNKRSRSSSMSLSTGAYASGIPSSSR NAITSSSTRGISQLWKRNGPSSSPFSSPASRSRQ TPERPAKKIREEELCHHSSSSTPLAADRESQGEKAA DTTPRKKQNSNSQSTPGSSGQRKRKQVLLPSRRG EQLTLPPPPQLGYSITAEDLDLEKKASLQWFNQALE DKSDAANSVTETPPITQPSFTFTLPAAAPASPPTSL LAPSTNPLLESLLKMQTPPSLPPCPESAGAAATEAL SPPKTPSLLPPLGLSQSGPPGLLPSPSFDKPPPTLL GLIPAPSMVPATDTKAPPTLQAETATKQATSAPSP APKQSFVLTQNTSPSSPAAPAASSAPPMPFKPIFTA PPKSEKEGPTPPGPSVTATAPSSSSLPTTTSTTAPT FQPVFSSMGPPASVPLPAPFFKQTTTTPATPTTTAP LFTGLASATSAVAPITASPSTDSASKPAFGFGINSV SSSSVSTTTSTATAASQPFLFGAPQASAAASFTPAMG SIFQFGKPPALPTTTTVTTFSQLHTAVPTATSSSAA DFSGFGSTLATSAPATSSQPTLTFSTNTSTPTFNIPFG SSAKSPLPSYPGANPQPAFGAAEGQPPGAAKPALA PSFGSSFTFGNSAAPAAAPTAPPSPMIKVVPAYVPT PIHPIFGGATHSAFGLKATASAFGAPASSQPAFGGS TAVFFGAATSSGFGATTQTASSGSSSVFGSTTSP FTFGGSAAPAGSGSFGINVATPGSSTTTGAFSFGAG QSGSTATSTPFAGGLGQNALGTTGQSTPFANVSS TTESKPVFGGTATPTFGLNTPAPGVGTSGSSLSFGA SSAPAQGFVGVAPFGNTFAHQQEHSRKGPNLNSK RKLLPAVRAQGLPRRGQASSFPTRKE</i></p>


Chromosomal translocation	<i>PAX5</i> fusion partner	Detection method	Reference
dic(9;12)(p13;p13)	<i>PAX5-ETV6</i>	5' RACE PCR RT-PCR	Cazzaniga et al. Cancer Res 2001 This work
t(9;15)(p13;q24)	<i>PAX5-PML</i>	FISH-based chromosome walking	Nebral et al. Br J Haematol 2007
t(7;9)(q11;p13)	<i>PAX5-ELN</i>	3'RACE PCR FISH	Bousquet et al. Blood 2007 This work
t(3;9)(p14;p13)	<i>PAX5-FOXP1</i>	SNP array RCA-3'RACE	Mullighan et al. Nature 2007 This work
t(9;18)(p13;q11)	<i>PAX5-ZNF521</i>	SNP-array	Mullighan et al. Nature 2007
t(7;9)(q11;p13)	<i>PAX5-AUTS2</i>	SNP array	Kawamata et al. PNAS 2008
dic(9;20)(p13;q11)	<i>PAX5-C20orf112</i>	SNP array	Kawamata et al. PNAS 2008
t(9;9)(p13;p24)	<i>PAX5-JAK2</i>	3'RACE	Nebral et al. Leukaemia 2009 This work
t(9;22)(p13;q13)	<i>PAX5-BRD1</i>	3'RACE	Nebral et al. Leukaemia 2009
t(7;9)(q11;p13)	<i>PAX5-POM121</i>	3'RACE RCA-3'RACE	Nebral et al. Leukaemia 2009 This work
t(1;9)(p13;p13)	<i>PAX5-HIPK1</i>	3'RACE	Nebral et al. Leukaemia 2009
t(9;13)(p13;q21)	<i>PAX5-DACH1</i>	3'RACE	Nebral et al. Leukaemia 2009
dic(7;9)(p12;p13)	<i>PAX5-LOC392027</i>	SNP array	An et al. PNAS 2008
dic(9;12)(p13;p12)	<i>PAX5-SLCO1B3</i>	SNP array	An et al. PNAS 2008
dic(9;20)(p13;q11)	<i>PAX5-ASXL1</i>	SNP array	An et al. PNAS 2008
dic(9;20)(p13;q11)	<i>PAX5-KIF3B</i>	SNP array	An et al. PNAS 2008
t(X;9)(q21;p13)	<i>PAX5-DACH2</i>	RCA-3'RACE	This work
t(9;17)(p13;p11)	<i>PAX5-NCOR1</i>	RCA-3'RACE	This work
t(9;15)(p13;q24)	<i>PAX5-GOLGA6</i>	RCA-3'RACE	This work
t(9;17)(p13;q11)	<i>PAX5-TAOK1</i>	RCA-3'RACE	This work





	#93 PAX5-DACH2	#97 PAX5-FOXP1	#98 PAX5-FOXP1	#101 PAX5-NCOR1	#102 PAX5-TAOK1	#103 PAX5-GOLGA6	#120 PAX5-ELN	#118 PAX5-JAK2
PAX5 status RP11-243F8 (green) RP11-344B23 (red)								
Partner status								
Supplemental experiments	Not performed	Not performed					Not performed	Not performed
			No RNA available				Bousquet et al.	



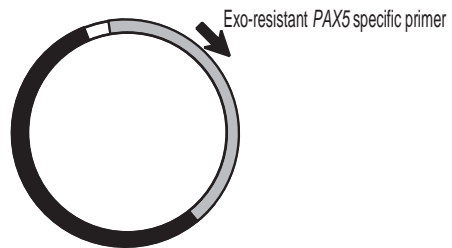


Chimeric mRNA 5'  AAAAAAA 3'

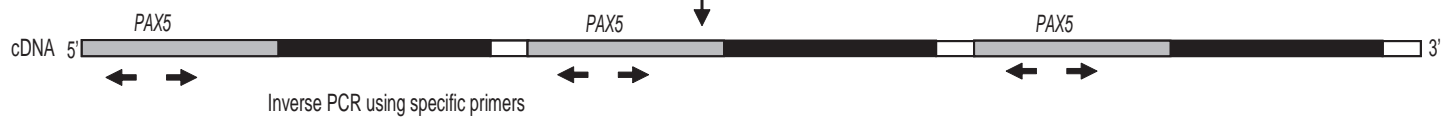
Chimeric cDNA 3'  TTTTTTTT  5'P

Reverse transcription (SuperScript III)

Self cDNA circularization (CircLigase)



Rolling Circle Amplification (Φ 29 DNA polymerase)
Generation of target gene enriched cDNA matrix



3. Etude fonctionnelle des mutants de PAX5 dans un modèle *ex vivo*

Travaux en cours : Evaluation de l'impact des mutants de PAX5 sur la différenciation lymphocytaire B

J Familiades, E Coyaud

Cette étude entre dans la continuité de l'identification des mutations de *PAX5* dans l'étude du GRAALL03. Je me suis intéressé à caractériser le rôle et l'impact des mutations de *PAX5* sur la différenciation des cellules B. A partir du modèle de co-culture mis en place par A. Rolink, j'ai pu maintenir à un stade précoce de la différenciation B des pro-B en présence d'IL-7 (conduisant à un blocage de la différenciation et à une stimulation de la prolifération des cellules B) sur une couche de cellules stromales, les OP9.

Les mutants ponctuels étudiés altèrent des régions différentes de *PAX5*. En effet, la mutation P80R se situe dans le domaine de liaison à l'ADN dans l'exon 3 alors que la mutation G336 modifie la région transactivatrice dans l'exon 8 et conduit à un décalage du cadre lecture. Les translocations *PAX5-ELN* et *PAX5-ETV6* ont servi de contrôle pour le blocage de la différenciation B. Les contrôles utilisés ont été le vecteur rétroviral vide et le forme pleine taille de *PAX5* wt. Les ADN complémentaires de ces mutants ont été obtenus à partir de matériel de patients dont nous disposions, et intégrés par clonages dans des vecteurs rétroviraux murins.

Après mise en culture des cellules pro-B, maintenues à un stade précoce grâce à l'interleukine 7, les vecteurs rétroviraux ont été introduits par spinoculation dans les cellules d'intérêt. En enlevant l'IL-7, la différenciation des cellules pro-B débutent et par l'analyse de marqueurs de surface : B220 (marqueur spécifique des cellules de la lignée B), Ig κ (caractéristique d'un stade tardif de la différenciation B), BP1 (marqueur des stades précoces du développement B) nous pouvons suivre l'évolution des lymphocytes B.

L'étude fonctionnelle a porté sur différents types de mutations : des mutations ponctuelles, des délétions partielles et des translocations. Cette analyse va permettre d'évaluer les différences de comportement existant entre les mutants sur la différenciation B. Les cellules ayant été infectées les mutants peuvent être suivis par la GFP (Figure 21). En cytométrie en flux, les fenêtres d'analyse ont été faites sur la population des cellules B, sur les cellules vivantes, le marqueur B220 positif et enfin sur les marqueurs BP1 et Ig κ .

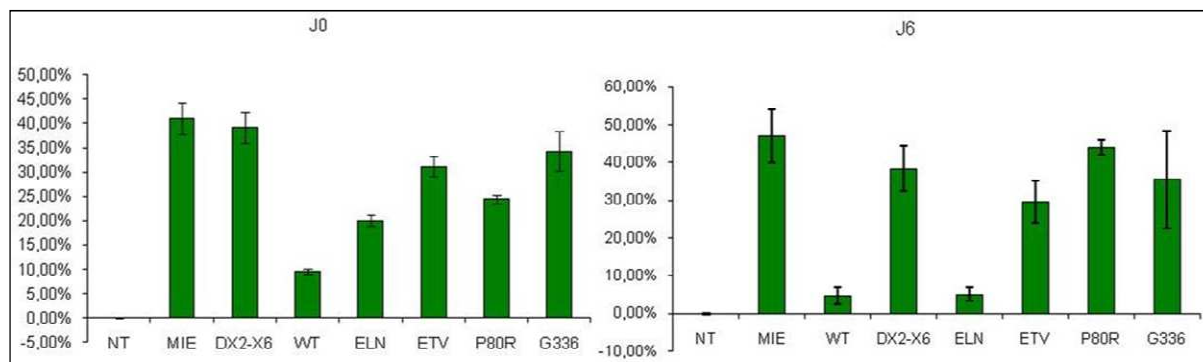


Figure 21 : Graphique représentant le taux de GFP des cellules B infectées.

En présence d'IL-7, la plupart des mutants n'ont aucun effet, le système reste stable, les cellules restent bloquées à un stade précoce. Ces cellules sont BP1 positif et Igκ négatif. P80R semble quant à lui, pousser la différenciation, les cellules acquièrent le marqueur Igκ et perdent le marqueur BP1.

En absence d'IL-7, on constate des variations dans le comportement des contrôles ainsi que des mutants. Les contrôles MIE (vecteur rétroviral vide) et le mutant de délétion partielle, ne bloquent pas cellules et les laissent différencier. Ces cellules acquièrent le marqueur Igκ et perdent BP1. De façon inattendue, le contrôle PAX5 wt bloque la différenciation des cellules B, elles conservent le marqueur BP1 sans acquérir le marqueur Igκ, le dosage de PAX5 wt serait-il crucial pour le bon déroulement de la différenciation B ? Les mutants ponctuelles et les translocations semblent agir de la même manière en bloquant la différenciation, les cellules sont marquées BP1 positif et Igκ négatif (Figure 22).

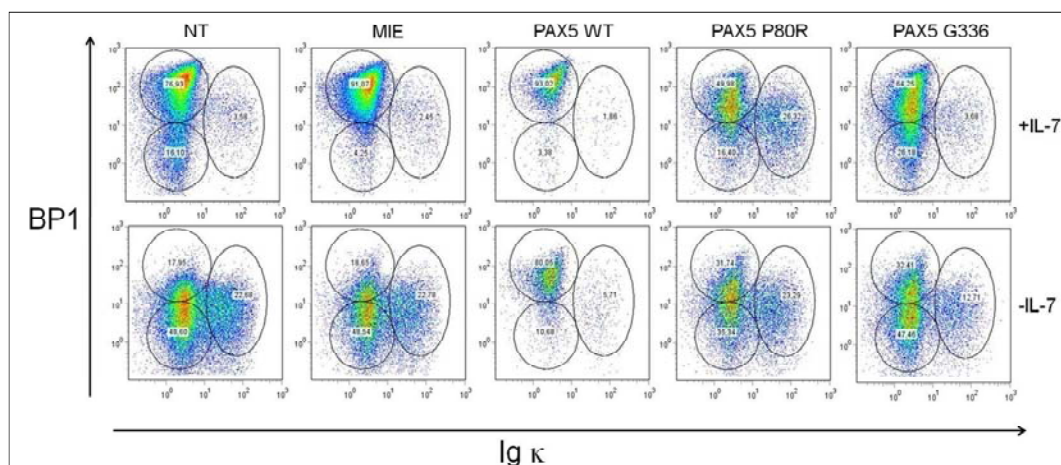


Figure 22 : Dot plot de différenciation à J6 en présence ou en absence d'IL-7 pour les cellules non transduites (NT), le vecteur vide (MIE), PAX5 sauvage (PAX5 WT) et les deux mutants ponctuels (PAX5 P80R et PAX5 G336).

Chapitre III :

Discussion et perspectives

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude du gène *PAX5* dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de type B. Ce facteur de transcription est indispensable dans la différenciation des cellules B et toutes dérégulations de celui-ci conduit à un phénotype oncogénique. La caractérisation des mutations de *PAX5* chez l'adulte dans cette pathologie, a constitué la majeure partie de mon travail. Cette étude a révélé une forte fréquence et une grande diversité dans les anomalies moléculaires affectant ce gène. La suite de mon projet consistait à déterminer l'impact des mutants de *PAX5* et plus particulièrement les mutants ponctuels, dans la différenciation B afin d'évaluer leur potentiel oncogénique. Ces anomalies affectant le domaine de liaison à l'ADN ou le domaine de transactivation de *PAX5*, se comportent de manière différente sur la différenciation B, soit en bloquant le développement des cellules B soit en accélérant cette dernière.

1. Statut du gène *PAX5* dans les LAL-B

La mise en place des leucémies aiguës nécessite selon le schéma classique de Gilliland (Kelly et al., 2002), au moins deux évènements dont la dérégulation de facteurs de transcription essentiels à la différenciation normale.

Mon travail s'est focalisé sur la recherche des mutations de *PAX5* dans les LAL-B de l'adulte dans un protocole clinique GRAALL03. Cette approche a montré que *PAX5* était muté dans 34% des cas, et qu'on retrouvait la même diversité que dans les LAL-B de l'enfant. Les patients ont été classés en plusieurs catégories : *PAX5* sauvage, délétion totale d'un allèle de *PAX5* (groupe *PAX5* délété), conduisant théoriquement à une diminution de l'expression de *PAX5*, amplification de plusieurs exons de *PAX5* et les mutations dites structurelles aboutissant à une altération de la fonction de *PAX5*, dont des mutations partielles, des mutations ponctuelles et des translocations (groupe *PAX5* hypomorphe).

J'ai classé les mutations de *PAX5* en fonction de leurs conséquences fonctionnelles probables, basées sur l'étude de Mullighan *et al.* (Mullighan et al., 2007). L'équipe de Downing a montré que les mutants ayant des délétions de *PAX5* et des mutations du domaine de liaison à l'ADN avaient une activité compétitive avec le *PAX5* wt plus faible que les protéines chimères qui agissent comme de forts inhibiteurs compétitifs de *PAX5* wt. La délétion complète d'un allèle de *PAX5* est retrouvée dans 15 % des cas de LAL-B de l'adulte et dans 11 % des cas de LAL-B de l'enfant. Les délétions partielles représentent 18 % chez l'adulte et 22 % chez l'enfant.

En ce qui concerne les mutations ponctuelles de *PAX5*, elles sont détectées dans 7 % des LAL-B de l'adulte et 7 % des LAL-B de l'enfant. La mutation *PAX5* P80R est un évènement fréquent et récurrent, elle est détectée dans 5 des 117 cas chez l'adulte et 4 des 192 cas chez l'enfant représentant donc 3 % des LAL-B. Nous avons identifié trois nouvelles mutations : *PAX5* S67N, une insertion d'un G dans le codon 138 (exon 4) (I138) et une insertion de deux G dans le codon 336 (exon 8) menant à un décalage du cadre de lecture des derniers exons de *PAX5*, codant le domaine de transactivation et les domaines inhibiteurs. Malgré les différences d'incidence des causes connues entre l'enfant et l'adulte, *PAX5* est affecté de la même manière.

La délétion homozygote de *Pax5* dans des souris bloque la différenciation B à un stade précoce. L'analyse des données cliniques a montré que les cellules du groupe *PAX5* sauvage et celles du groupe *PAX5* hypomorphe sont bloquées à un stade précoce, en B-II alors que les blastes du groupe *PAX5* ayant perdu un allèle, sont clairement bloqués à un stade plus tardif en B-III. De plus, le fait le plus marquant pour ce groupe, est qu'il n'y a aucune cellule en B-I (CD10 négatif). Ce résultat suggère que la perte d'un allèle de *PAX5* entraîne un déficit dans le nombre de copies de *PAX5* se caractérisant par un blocage tardif des cellules leucémiques. Il semblerait que ce type d'anomalie soit un évènement secondaire dans la mise en place de la pathologie.

En fonction des anomalies affectant *PAX5*, deux hypothèses ont été émises : les mutations peuvent être un évènement tardif ou un évènement précoce. Afin de pouvoir répondre à ces hypothèses, une analyse FISH chez un patient ayant la translocation E2A-PBX1, a montré que tous les noyaux possédaient le réarrangement chromosomique E2A-PBX1 mais que la perte d'un allèle de *PAX5* était retrouvée uniquement dans 60% des noyaux (Familiades et al., 2009). Cet élément permet d'affirmer que la mutation de *PAX5* est clairement un évènement secondaire, ce qui expliquerait le blocage plus tardif des cellules de ce groupe.

De plus la délétion complète d'un allèle de *PAX5* est fréquemment associée avec la délétion de *CDKN2A* localisé dans la partie plus télomérique du bras court du chromosome 9 (Mullighan et al., 2008). Le groupe de Downing avait présenté en 2008, une étude sur la coopération entre les fréquentes mutations de *PAX5* et *BCR-ABL1* dans les LAL-B. Pour examiner cette association, ils ont transplanté des cellules *Pax5*^{+/-} de moelle osseuse infectée par des rétrovirus exprimant *BCR-ABL1*, dans des souris irradiées à une dose sub-létale. La survie des animaux était sévèrement diminuée. De plus les haploinsuffisances concomitantes affectant *PAX5* et *CDKN2A*, réduisent considérablement la survie. Donc la perte d'une copie

des gènes *PAX5* et *CDKN2A* est synergique pendant la transformation due à BCR-ABL1 (Miller, Mullighan, Su, et al., *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2008).

Les mutations structurales ne se comportent pas comme les délétions d'un allèle de *PAX5*. En effet, les mutations ponctuelles sont fréquemment associées avec la perte du deuxième allèle, suggérant que ces anomalies ne sont pas suffisantes au blocage de différenciation inclus dans le processus oncogénique. Les translocations comme PAX5-ELN, PAX5-ETV6 and PAX5-FOXP1 ont été caractérisées comme des dominants négatifs sur la fonction sauvage de *PAX5* (Familiades et al., 2009). D'un point de vue clinique, les patients possédant des mutations structurales de *PAX5*, sont plus sujets aux rechutes.

Dans le groupe hypomorphe, les mutations ponctuelles semblent représenter une entité à part. Les réarrangements VDJ de la chaîne lourde des immunoglobulines surviennent dès les premières étapes de la différenciation B. Dans une moelle osseuse normale, environ 2% des cellules utilisent le réarrangement proximal V_{H6-1} (le segment V_H le plus proximal). Il a été décrit que le segment V_{H6-1} était sur-utilisé dans 10% des patients LAL-B de l'adulte (Mortuza et al., 2001). La délétion homozygote de *Pax5* chez la souris a montré que *Pax5* était crucial pour la transition D_HJ_H à $V_HD_HJ_H$ de la chaîne lourde des immunoglobulines et spécialement pour les réarrangements distaux (Nutt et al., 1997). V_{H6-1} a été quantifié chez les patients du protocole GRAALL03. En moyenne, 11,4% des adultes LAL-B (12 cas sur 105) testés sur-utilisent le segment V_{H6-1} , suggérant une modification de l'accessibilité aux autres segments V_H dans cette pathologie. Il semblerait que les mutants affectant le domaine de liaison à l'ADN de *PAX5* P80R et *PAX5* S67N, sont associés à cette utilisation, néanmoins cette hypothèse reste à être confirmée (Familiades et al., 2009). Cette association tendrait à démontrer que les mutations ponctuelles sont des événements précoces dans la mise en place de la maladie. De plus, on a noté aucune association entre les mutations ponctuelles et la présence de BCR-ABL1.

Les mutations de *PAX5* déterminées dans les LAL-B de l'adulte varient en termes de structure et de fonction. L'étude des différentes altérations de *PAX5* nous renseignera sur leur rôle dans l'oncogenèse B.

2. Translocations de PAX5

La recherche des altérations du 9p dans des LAL-B acquises et plus particulièrement de *PAX5* a été effectuée sur une large cohorte d'enfant et d'adulte LAL-B. Par une stratégie innovante, la recherche des fusions de *PAX5* a été facilitée. La technique de RACE-RCA est une stratégie basée sur la circularisation d'ADN pour générer les brins d'ADN concaténés permettant une augmentation du nombre de copies des gènes cibles. L'analyse de cet ADN concaténé par PCR, par l'utilisation d'amorces reverses sur *PAX5*, a conduit à la détermination des différentes parties de la chimère. Les points de cassure internes à *PAX5* peuvent conduire à deux conséquences : la production de chimères menant à l'expression d'une protéine chimérique (*PAX5-ETV6*, *PAX5-ELN*) ou à la production de protéines tronquées issues d'une fusion de gènes n'ayant pas la même orientation (*PAX5-FOXP1*), d'une fusion de gènes juxtaposés avec des orientations opposées (*PAX5/TAOK1*) ou d'une fusion avec des séquences non codantes. Dans la plupart des cas, un codon stop est généré immédiatement après l'exon 5 de *PAX5*.

Cette étude a permis le clonage de nouvelles translocations impliquant *PAX5* : *PAX5-NCoR1*, *PAX5-DACH2*, et *PAX5-GOLGA6*.

NCoR1 est un composant du complexe des histones désacétylases et agit comme un répresseur transcriptionnel empêchant ainsi l'accessibilité des facteurs de transcription aux sites de régulation génomique (Horlein et al., 1995). Il est intéressant de noter que le domaine bipartite de liaison à l'ADN de NCoR1 remplace le domaine de transactivation de *PAX5* et la protéine hypothétique pourrait agir comme un répresseur constitutif de cibles de *PAX5*.

DACH2 est un facteur de transcription impliqué dans organogenèse et semble être impliqué dans la prolifération, notamment en réprimant l'expression d'un inhibiteur de kinase cycline-dépendante (Davis et al., 2001). Comme chez le patient ayant la translocation t(X;9), la fusion *PAX5-DACH2* est associée avec la perte totale du deuxième allèle de *DACH2*. De plus, l'équipe de Sabine Strehl a décrit une translocation de *PAX5* fusionnant *DACH1*, t(9;13)(p13;q22) (Nebral et al., 2009) et les structures de *DACH1* et *DACH2* sont proches, ce qui suggère une implication importante des gènes de la famille *DACHs* dans l'oncogenèse B.

La troisième nouvelle fusion conduit à la formation d'une chimère de *PAX5*, *PAX5-GOLGA6*. *GOLGA6* est fortement exprimé dans les testicules chez l'Homme, mais sa fonction reste inconnue (Gilles et al., 2000).

Les deux tiers des patients (enfants et adultes) présentent une délétion monoallélique de *PAX5*. La complexité des caryotypes et la présence de fusions classiques (*BCR-ABL1*, *TCF3-*

PBX1, ETV6-RUNX1, et des réarrangements *MLL*) chez ces patients, suggèrent que la délétion de *PAX5* semble être un évènement de nature secondaire contrairement aux translocations de *PAX5* à l'instar de ce que nous avons décrit dans le papier de Leukemia avec E2A-PBX1 (Familiades et al., 2009).

L'étude effectuée par Miller et al., indique que la perte de *Pax5* contribue à la leucémogénèse, que les changements génomiques supplémentaires dans des gènes réglementant le développement lymphoïde B et les régulateurs du cycle cellulaire/suppresseurs de tumeur (*Arf*) sont des événements fréquents dans les leucémies aiguës lymphoblastiques Ph+ et que ces lésions résultent en un déficit de la maturation des lymphocytes B dans les LAL-B. La délétion de *PAX5* pourrait être concomitante à la perte de *INK4a/ARF* localisé en 9p21 (Miller, Mullighan, Su, et al., *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2008).

Nous avons détecté des altérations de *PAX5* dans 81% des cas, associées à des anomalies du 9p dont une majorité de délétion totale. Les réarrangements internes de *PAX5* comme les translocations récurrentes fréquemment trouvées dans les LAL-B, pourraient être suffisantes pour l'initiation de la leucémogénèse par blocage de la différenciation B. Les protéines chimériques possèdent le domaine de liaison à l'ADN, l'octapeptide et le site d'adressage au noyau (point de cassure après l'exon 5), suggérant une localisation nucléaire de la chimère et donc une capacité de liaison sur les cibles de *PAX5*. Il est probable que ces protéines *PAX5-X* tronquées bloquent la différenciation des cellules B à la manière d'un inhibiteur compétitif. Les translocations impliquant *PAX5* comme *PAX5-ELN*, *PAX5-FOXP1* et *PAX5-ETV6*, ont été caractérisées comme trans-dominant négatif sur l'effet de *PAX5* sauvage.

En ce qui concerne le criblage HRM (High Resolution Melting) des mutations ponctuelles sur la cohorte GFCH, une nouvelle mutation, la S212L, a été détectée sur l'exon 6 de *PAX5* (Figure 23). Cette unique mutation sur un allèle de *PAX5* est associée avec la forme tronquée de *PAX5* sur l'autre allèle. Ce patient âgé d'un an et demi, possède un point de cassure dans la région génomique de *PAX5* et ne présente aucune translocation *PAX5-X* associé. Il ne présente aucune translocation récurrente. Tout comme les autres cellules LAL-B avec des mutations ponctuelles de *PAX5*, les blastes de ce patient sont bloqués au stade pré-BII (classification EGIL). Par extrapolation, on peut suggérer un mécanisme similaire de mise en place des mutations ponctuelles chez l'enfant et l'adulte.

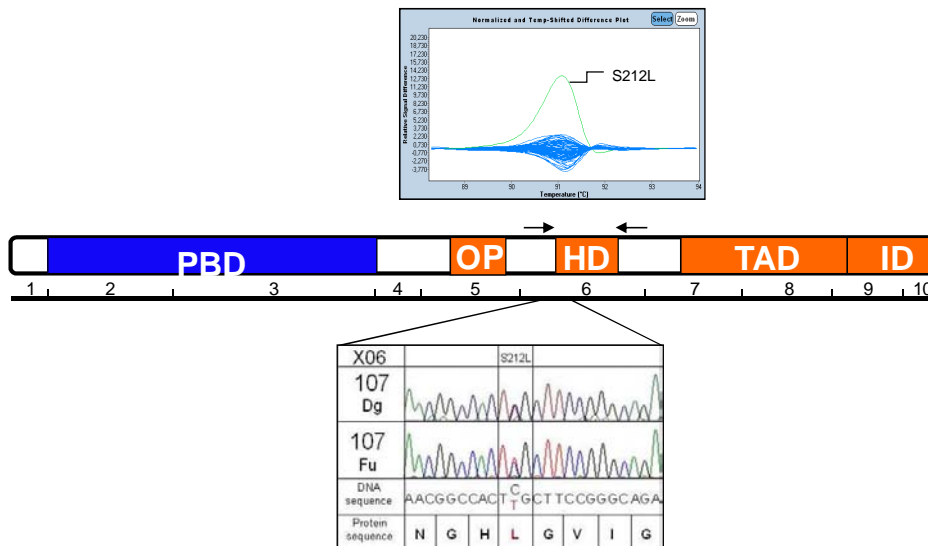


Figure 23 : Schéma représentant la mutation après analyse HRM et séquençage.

3. Impact des altérations de PAX5 sur la différenciation B

La modélisation des altérations de PAX5 dans des systèmes *ex vivo* ou *in vivo* permettrait de décrypter leur implication dans la leucémogénèse B. Ces altérations affectent tous les domaines de PAX5 suggérant des mécanismes d'action différents. Pour les mutations ponctuelles, on distingue le mutant P80R dont le domaine de liaison à l'ADN est altéré et le mutant G336 dont le domaine de transactivation est muté. Les translocations quant à elles conservent les 5 premiers exons de PAX5 juxtaposés à ELN ou ETV6. Enfin le mutant de délétion partielle a perdu le cas présent, les exons 2 à 6 c'est-à-dire le domaine de liaison à l'ADN et l'octapeptide.

En présence d'IL-7, les cellules infectées par le mutant P80R acquièrent le marqueur Igκ et perdent le marqueur BP1. Il semble pousser la différenciation B. Ce résultat suggère que la modification du domaine de liaison à l'ADN bipartite pourrait permettre la fixation de PAX5 muté sur des cibles qui ne peuvent pas être activées en présence d'IL-7. La nature bipartite du domaine paired permet une spécificité plus variée des sites de liaisons (Czerny et al., 1993). La mutation pourrait changer l'affinité du domaine à l'ADN, entraînant une fixation sur un large éventail de cibles de PAX5 sauvage, en présence d'IL-7. De plus, on constate une augmentation de la prolifération (comptage des cellules en culture). En plus de la voie de signalisation IL-7 récepteur dépendante, le mutant du fait de sa modification pourrait agir sur

des cibles intervenant dans le cycle cellulaire. La validation de ces hypothèses nécessite des analyses complémentaires afin de déterminer les cibles spécifiques de ce mutant par rapport au PAX5 sauvage. De plus, P80R semble être insensible à l'IL-7 et semble forcer l'expression d'Igk à la surface des cellules (normalement indétectable à ce stade).

En absence d'IL-7, on constate des variations de comportement du contrôle PAX5 wt ainsi que des mutants. Nos contrôles négatifs MIE (vecteur rétroviral vide) et le mutant de délétion partielle (délétion des exons 2 à 6 de PAX5), ne bloquent pas la différenciation, les cellules acquièrent Igk et perdent BP1. Ce contrôle a permis de montrer que le blocage dû aux mutants n'était pas lié à l'expression d'une protéine dans les cellules pro-B.

Nous voulions utiliser le PAX5 wt comme contrôle de différenciation. Or étonnamment, ce contrôle bloque la différenciation des cellules B, elles conservent le marqueur BP1 sans acquérir le marqueur Igk. L'expression rétrovirale de PAX5 dans les cellules B possède un niveau d'expression supérieur au PAX5 endogène. Ceci pourrait être à l'origine du blocage de différenciation observé en absence d'IL-7. PAX5 contrôle finement l'expression de gènes permettant la progression des cellules B dans la différenciation lymphoïde. Parmi ces cibles, PAX5 régule l'expression du pré-BCR. Le pré-BCR est essentiel pour le développement normal des cellules B et une modification d'expression conduirait à la mise en place de processus oncogéniques. La signalisation en aval conduit au passage pro-B/pré-B, l'exclusion allélique de l'isotype μ de la chaîne lourde et la sous expression de la machinerie de recombinaison, de la prolifération et de la transcription des composants *VpréB* et $\lambda 5$ de la pseudo-chaîne légère (Martensson et al., 2010). PAX5 active des gènes cibles des composants essentiels des voies de signalisation des pré-BCR comme la chaîne mb-1 de transduction du signal (appelé aussi Cd79a) (Fitzsimmons et al., 1996; Nutt et al., 1997), les récepteurs stimulateurs Cd19 et Cd21 (Horcher et al., 2001; Kozmik et al., 1992; Nutt et al., 1998), le récepteur inhibiteur Cd72 (Horcher et al., 2001; Ying et al., 1998) et l'adaptateur central Blnk (aussi appelé SLP65) (Schebesta et al., 2002). Une modification d'expression de ces gènes par PAX5 aussi minime soit elle, aurait alors un effet sur le point de contrôle du pré-BCR en empêchant les cellules de passer au stade de différenciation suivant et conduirait à une augmentation de la mort cellulaire. Chaque molécule de pré-BCR est produite de manière stœchiométrique, la surexpression de certaines molécules comme CD79a pourrait-il avoir un effet seul sans être couplé au récepteur, menant alors à un défaut dans sa signalisation et

bloquant de ce fait le développement normal des cellules B. PAX5 pourrait avoir un effet sur cet équilibre.

En absence d'IL-7, les translocations et les mutants ponctuels bloquent la différenciation en conservant le marqueur BP1 et n'acquièrent pas Igκ. Les translocations PAX5-X et le P80R se maintiennent en pré-B en gardant l'expression du marqueur BP1. Ces mutants conservent le signal de localisation nucléaire, donc ils entrent en compétition avec la molécule sauvage de PAX5. Ces résultats suggèrent que ces mutants agissent sur les cibles de PAX5, modulant leur expression, ils empêchent le passage des cellules au stade suivant de la différenciation B. Le mutant ponctuel G336 quant à lui semble entraîner la mise en place d'un processus de dédifférenciation, parce que les cellules perdent le marqueur BP1 mais n'acquièrent pas Igκ. Ce mutant conserve le domaine de liaison à l'ADN de PAX5 mais perd les domaines trans-activateur et inhibiteur, la conséquence la plus probable serait qu'une fois fixé sur les cibles de PAX5, le G336 conduirait à un arrêt avant l'acquisition d'Igκ ou à une reprogrammation des cellules B.

Les différents mutants de PAX5 ne sont pas équivalents en fonction, ils ne semblent pas avoir les mêmes impacts sur la différenciation B. Comme le mutant de délétion partiel n'a aucun effet sur la différenciation B, la présence du domaine de liaison à l'ADN semble essentiel dans la mise en place d'un processus oncogénique. Le système étudié ne nous permet pas d'évaluer de manière optimale les conditions pathologiques du fait de la présence de deux copies du gène *PAX5* sauvage mais nous aiguille vers des pistes de travail à creuser par la suite.

4. Perspectives

Mon projet de thèse s'est articulé autour d'une étude translationnelle scindée en deux parties : la première clinique et la deuxième fonctionnelle.

La première partie m'a permis de rechercher les mutations affectant le gène *PAX5* dans les LAL-B de l'adulte. J'ai eu à ma disposition les échantillons de patients inclus dans le protocole clinique GRAALL03. La recherche de ces anomalies, a montré la présence de mutations fréquentes mais structurellement différentes. L'objectif n'était pas de dresser un

catalogue exhaustif des mutations de *PAX5* mais de pouvoir par la suite évaluer leurs effets sur le processus oncogénique.

La deuxième partie de ma thèse a été la mise en place au laboratoire d'un modèle cellulaire permettant l'analyse de ces altérations. L'étude fonctionnelle des mutants m'a permis de déterminer leur impact sur la différenciation B. La mise en place de cet outil cellulaire a nécessité de nombreux réglages et un suivi attentif et rigoureux, afin d'obtenir des résultats exploitables.

Les travaux fonctionnels ont démarré depuis peu et les résultats encourageants obtenus sont un point de départ à l'analyse de nos mutants dans le processus oncogénique. Les perspectives à court terme consistent en des tests de prolifération, et des tests d'apoptose sur les cellules B cultivées en présence ou en absence d'IL-7. On pourra ainsi répondre à la question : les mutations du gène *PAX5* sont-elles suffisantes pour induire à elles seules le processus oncogénique ? La deuxième perspective est de déterminer comment le mutant ponctuel G336 pouvait en absence d'IL-7, perdre le marqueur précoce BP1 et ne pas acquérir le marqueur Igk.

Le mutant P80R est souvent associé avec la perte du deuxième allèle mais certains patients conservent le deuxième allèle, suggérant qu'il peut être suffisant pour le blocage de la différenciation. Afin de pouvoir évaluer *in vivo* le pouvoir oncogène du P80R, une expérience de reconstitution de moelle osseuse peut être effectuée. Des cellules déficientes pour le gène *Pax5* seraient infectées avec le mutant et seraient injectées dans une souris irradiée à une dose sub-létale. De plus afin de tester l'effet inhibiteur compétitif du P80R, des cellules *Pax5* +/- et *Pax5* -/- seront infectées afin de confirmer les effets observés dans notre modèle *ex vivo*. Enfin, une collaboration avec l'équipe de Michel Cogné à Limoges, s'attèle à la création d'une souris KI permettant d'étudier l'impact réel du mutant en condition pathologique avec un allèle P80R et un allèle *PAX5* wt.

Comprendre les mécanismes d'activation de la différenciation B est essentiel. Une analyse transcriptomique permettrait la caractérisation des gènes cibles des mutants de *PAX5*. A long terme, cette connaissance des cibles servirait au développement de thérapeutiques en contrecarrant l'effet des mutants de *PAX5*.

Ces analyses ont pour but une meilleure compréhension des phénomènes oncogéniques.

Références bibliographiques

Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (1996). Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: correlations with hematologic findings outcome. A Collaborative Study of the Group Francais de Cytogenetique Hematologique. *Blood* 87, 3135-3142.

Adams, B., Dorfler, P., Aguzzi, A., Kozmik, Z., Urbanek, P., Maurer-Fogy, I., and Busslinger, M. (1992). Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev* 6, 1589-1607.

Allman, D., Jain, A., Dent, A., Maile, R.R., Selvaggi, T., Kehry, M.R., and Staudt, L.M. (1996). BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* 87, 5257-5268.

Alpdogan, O., Muriglian, S.J., Eng, J.M., Willis, L.M., Greenberg, A.S., Kappel, B.J., and van den Brink, M.R. (2003). IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Invest* 112, 1095-1107.

Alt, F.W., Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., and Baltimore, D. (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J* 3, 1209-1219.

An, Q., Wright, S.L., Konn, Z.J., Matheson, E., Minto, L., Moorman, A.V., Parker, H., Griffiths, M., Ross, F.M., Davies, T., *et al.* (2008). Variable breakpoints target PAX5 in patients with dicentric chromosomes: a model for the basis of unbalanced translocations in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17050-17054.

Anderson, K., Rusterholz, C., Mansson, R., Jensen, C.T., Bacos, K., Zandi, S., Sasaki, Y., Nerlov, C., Sigvardsson, M., and Jacobsen, S.E. (2007). Ectopic expression of PAX5 promotes maintenance of biphenotypic myeloid progenitors coexpressing myeloid and B-cell lineage-associated genes. *Blood* 109, 3697-3705.

Angelin-Duclos, C., Johnson, K., Liao, J., Lin, K.I., and Calame, K. (2002). An interfering form of Blimp-1 increases IgM secreting plasma cells and blocks maturation of peripheral B cells. *Eur J Immunol* 32, 3765-3775.

Arakawa, H., and Buerstedde, J.M. (2004). Immunoglobulin gene conversion: insights from bursal B cells and the DT40 cell line. *Dev Dyn* 229, 458-464.

Armstrong, S.A., and Look, A.T. (2005). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 23, 6306-6315.

Aspland, S.E., Bendall, H.H., and Murre, C. (2001). The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene* 20, 5708-5717.

Barlev, N.A., Emelyanov, A.V., Castagnino, P., Zegerman, P., Bannister, A.J., Sepulveda, M.A., Robert, F., Tora, L., Kouzarides, T., Birshstein, B.K., *et al.* (2003). A novel human Ada2 homologue functions with Gcn5 or Brg1 to coactivate transcription. *Mol Cell Biol* 23, 6944-6957.

Bassing, C.H., Swat, W., and Alt, F.W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109 Suppl, S45-55.

- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33, 451-458.
- Bertolino, E., Reddy, K., Medina, K.L., Parganas, E., Ihle, J., and Singh, H. (2005). Regulation of interleukin 7-dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5. *Nat Immunol* 6, 836-843.
- Bousquet, M., Broccardo, C., Quelen, C., Meggetto, F., Kuhlein, E., Delsol, G., Dastugue, N., and Brousset, P. (2007). A novel PAX5-ELN fusion protein identified in B-cell acute lymphoblastic leukemia acts as a dominant negative on wild-type PAX5. *Blood* 109, 3417-3423.
- Buffler, P.A., Kwan, M.L., Reynolds, P., and Urayama, K.Y. (2005). Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. *Cancer Invest* 23, 60-75.
- Busslinger, M. (2004). Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* 22, 55-79.
- Busslinger, M., Klix, N., Pfeffer, P., Graninger, P.G., and Kozmik, Z. (1996). Deregulation of PAX-5 by translocation of the Emu enhancer of the IgH locus adjacent to two alternative PAX-5 promoters in a diffuse large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6129-6134.
- Carter, R.H., Wang, Y., and Brooks, S. (2002). Role of CD19 signal transduction in B cell biology. *Immunol Res* 26, 45-54.
- Cattoretti, G., Chang, C.C., Cechova, K., Zhang, J., Ye, B.H., Falini, B., Louie, D.C., Offit, K., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1995). BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 86, 45-53.
- Cazzaniga, G., Daniotti, M., Tosi, S., Giudici, G., Aloisi, A., Pogliani, E., Kearney, L., and Biondi, A. (2001). The paired box domain gene PAX5 is fused to ETV6/TEL in an acute lymphoblastic leukemia case. *Cancer Res* 61, 4666-4670.
- Chu, P.G., and Arber, D.A. (2001). CD79: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9, 97-106.
- Cobaleda, C., and Busslinger, M. (2008). Developmental plasticity of lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 20, 139-148.
- Cobaleda, C., Jochum, W., and Busslinger, M. (2007a). Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* 449, 473-477.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., and Busslinger, M. (2007b). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 8, 463-470.
- Cotta, C.V., Zhang, Z., Kim, H.G., and Klug, C.A. (2003). Pax5 determines B- versus T-cell fate and does not block early myeloid-lineage development. *Blood* 101, 4342-4346.

- Coyaud, E., Struski, S., Dastugue, N., Brousset, P., Broccardo, C., and Bradtke, J. (2010). PAX5-AUTS2 fusion resulting from t(7;9)(q11.2;p13.2) can now be classified as recurrent in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*.
- Czerny, T., Schaffner, G., and Busslinger, M. (1993). DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev* 7, 2048-2061.
- Davis, R.J., Shen, W., Sandler, Y.I., Heanue, T.A., and Mardon, G. (2001). Characterization of mouse Dach2, a homologue of Drosophila dachshund. *Mech Dev* 102, 169-179.
- Decker, T., Pasca di Magliano, M., McManus, S., Sun, Q., Bonifer, C., Tagoh, H., and Busslinger, M. (2009). Stepwise activation of enhancer and promoter regions of the B cell commitment gene Pax5 in early lymphopoiesis. *Immunity* 30, 508-520.
- DeFranco, A.L. (1993). Structure and function of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Cell Biol* 9, 377-410.
- Deininger, M., Buchdunger, E., and Druker, B.J. (2005). The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 105, 2640-2653.
- DeKoter, R.P., Lee, H.J., and Singh, H. (2002). PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* 16, 297-309.
- Delogu, A., Schebesta, A., Sun, Q., Aschenbrenner, K., Perlot, T., and Busslinger, M. (2006). Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* 24, 269-281.
- Difilippantonio, M.J., McMahan, C.J., Eastman, Q.M., Spanopoulou, E., and Schatz, D.G. (1996). RAG1 mediates signal sequence recognition and recruitment of RAG2 in V(D)J recombination. *Cell* 87, 253-262.
- Dorfler, P., and Busslinger, M. (1996). C-terminal activating and inhibitory domains determine the transactivation potential of BSAP (Pax-5), Pax-2 and Pax-8. *EMBO J* 15, 1971-1982.
- Eberhard, D., and Busslinger, M. (1999). The partial homeodomain of the transcription factor Pax-5 (BSAP) is an interaction motif for the retinoblastoma and TATA-binding proteins. *Cancer Res* 59, 1716s-1724s; discussion 1724s-1725s.
- Emelyanov, A.V., Kovac, C.R., Sepulveda, M.A., and Birshtein, B.K. (2002). The interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx can result in transcriptional activation in B cells. *J Biol Chem* 277, 11156-11164.
- Espinoza, C.R., and Feeney, A.J. (2007). Chromatin accessibility and epigenetic modifications differ between frequently and infrequently rearranging VH genes. *Mol Immunol* 44, 2675-2685.
- Familiades, J., Bousquet, M., Lafage-Pochitaloff, M., Bene, M.C., Beldjord, K., De Vos, J., Dastugue, N., Coyaud, E., Struski, S., Quelen, C., *et al.* (2009). PAX5 mutations occur

frequently in adult B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia and PAX5 haploinsufficiency is associated with BCR-ABL1 and TCF3-PBX1 fusion genes: a GRAALL study. *Leukemia* 23, 1989-1998.

Fazio, G., Palmi, C., Rolink, A., Biondi, A., and Cazzaniga, G. (2008). PAX5/TEL acts as a transcriptional repressor causing down-modulation of CD19, enhances migration to CXCL12, and confers survival advantage in pre-BI cells. *Cancer Res* 68, 181-189.

Fisher, A.L., and Caudy, M. (1998). Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev* 12, 1931-1940.

Fitzsimmons, D., Hodsdon, W., Wheat, W., Maira, S.M., Wasylyk, B., and Hagman, J. (1996). Pax-5 (BSAP) recruits Ets proto-oncogene family proteins to form functional ternary complexes on a B-cell-specific promoter. *Genes Dev* 10, 2198-2211.

Ford, A.M., Bennett, C.A., Price, C.M., Bruin, M.C., Van Wering, E.R., and Greaves, M. (1998). Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4584-4588.

Ford, A.M., Palmi, C., Bueno, C., Hong, D., Cardus, P., Knight, D., Cazzaniga, G., Enver, T., and Greaves, M. (2009). The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF-beta pathway in early B lineage progenitor cells. *J Clin Invest* 119, 826-836.

Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E., and Busslinger, M. (2004). Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev* 18, 411-422.

Gallant, S., and Gilkeson, G. (2006). ETS transcription factors and regulation of immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 54, 149-163.

Garvie, C.W., Hagman, J., and Wolberger, C. (2001). Structural studies of Ets-1/Pax5 complex formation on DNA. *Mol Cell* 8, 1267-1276.

Gilles, F., Goy, A., Remache, Y., Manova, K., and Zelenetz, A.D. (2000). Cloning and characterization of a Golgin-related gene from the large-scale polymorphism linked to the PML gene. *Genomics* 70, 364-374.

Gokbuget, N., and Hoelzer, D. (2004). Treatment with monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia: current knowledge and future prospects. *Ann Hematol* 83, 201-205.

Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K.J., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J Exp Med* 198, 1427-1437.

Greaves, M.F. (1997). Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 349, 344-349.

Hagman, J., and Lukin, K. (2005). Early B-cell factor 'pioneers' the way for B-cell development. *Trends Immunol* 26, 455-461.

- Hagman, J., and Lukin, K. (2006). Transcription factors drive B cell development. *Curr Opin Immunol* 18, 127-134.
- Harris, M.B., Shuster, J.J., Carroll, A., Look, A.T., Borowitz, M.J., Crist, W.M., Nitschke, R., Pullen, J., Steuber, C.P., and Land, V.J. (1992). Trisomy of leukemic cell chromosomes 4 and 10 identifies children with B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia with a very low risk of treatment failure: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 79, 3316-3324.
- Hartgring, S.A., Bijlsma, J.W., Lafeber, F.P., and van Roon, J.A. (2006). Interleukin-7 induced immunopathology in arthritis. *Ann Rheum Dis* 65 Suppl 3, iii69-74.
- Heavey, B., Charalambous, C., Cobaleda, C., and Busslinger, M. (2003). Myeloid lineage switch of Pax5 mutant but not wild-type B cell progenitors by C/EBPalpha and GATA factors. *Embo J* 22, 3887-3897.
- Heerema, N.A., Sather, H.N., Sensel, M.G., Zhang, T., Hutchinson, R.J., Nachman, J.B., Lange, B.J., Steinherz, P.G., Bostrom, B.C., Reaman, G.H., *et al.* (2000). Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *J Clin Oncol* 18, 1876-1887.
- Hesslein, D.G., Pflugh, D.L., Chowdhury, D., Bothwell, A.L., Sen, R., and Schatz, D.G. (2003). Pax5 is required for recombination of transcribed, acetylated, 5' IgH V gene segments. *Genes Dev* 17, 37-42.
- Hikida, M., Mori, M., Takai, T., Tomochika, K., Hamatani, K., and Ohmori, H. (1996). Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells. *Science* 274, 2092-2094.
- Hirokawa, S., Sato, H., Kato, I., and Kudo, A. (2003). EBF-regulating Pax5 transcription is enhanced by STAT5 in the early stage of B cells. *Eur J Immunol* 33, 1824-1829.
- Hoflinger, S., Kesavan, K., Fuxa, M., Hutter, C., Heavey, B., Radtke, F., and Busslinger, M. (2004). Analysis of Notch1 function by in vitro T cell differentiation of Pax5 mutant lymphoid progenitors. *J Immunol* 173, 3935-3944.
- Holmes, M.L., Carotta, S., Corcoran, L.M., and Nutt, S.L. (2006). Repression of Flt3 by Pax5 is crucial for B-cell lineage commitment. *Genes Dev* 20, 933-938.
- Honjo, T., Kinoshita, K., and Muramatsu, M. (2002). Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 20, 165-196.
- Honjo, T., Muramatsu, M., and Fagarasan, S. (2004). AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity* 20, 659-668.
- Horcher, M., Souabni, A., and Busslinger, M. (2001). Pax5/BSAP maintains the identity of B cells in late B lymphopoiesis. *Immunity* 14, 779-790.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., *et al.* (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

- Hsu, C.L., King-Fleischman, A.G., Lai, A.Y., Matsumoto, Y., Weissman, I.L., and Kondo, M. (2006). Antagonistic effect of CCAAT enhancer-binding protein-alpha and Pax5 in myeloid or lymphoid lineage choice in common lymphoid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 672-677.
- Hu, M., Krause, D., Greaves, M., Sharkis, S., Dexter, M., Heyworth, C., and Enver, T. (1997). Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* 11, 774-785.
- Hunger, S.P., Ohyashiki, K., Toyama, K., and Cleary, M.L. (1992). Hlf, a novel hepatic bZIP protein, shows altered DNA-binding properties following fusion to E2A in t(17;19) acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev* 6, 1608-1620.
- Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Vallabhajosyula, P., Otipoby, K.L., Rajewsky, K., and Glimcher, L.H. (2003). Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol* 4, 321-329.
- Jackson, J.F., Boyett, J., Pullen, J., Brock, B., Patterson, R., Land, V., Borowitz, M., Head, D., and Crist, W. (1990). Favorable prognosis associated with hyperdiploidy in children with acute lymphocytic leukemia correlates with extra chromosome 6. A Pediatric Oncology Group study. *Cancer* 66, 1183-1189.
- Johnson, K., Pflugh, D.L., Yu, D., Hesslein, D.G., Lin, K.I., Bothwell, A.L., Thomas-Tikhonenko, A., Schatz, D.G., and Calame, K. (2004). B cell-specific loss of histone 3 lysine 9 methylation in the V(H) locus depends on Pax5. *Nat Immunol* 5, 853-861.
- Kamb, A., Gruis, N.A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitigian, S.V., Stockert, E., Day, R.S., 3rd, Johnson, B.E., and Skolnick, M.H. (1994a). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-440.
- Kamb, A., Shattuck-Eidens, D., Eeles, R., Liu, Q., Gruis, N.A., Ding, W., Hussey, C., Tran, T., Miki, Y., Weaver-Feldhaus, J., *et al.* (1994b). Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 8, 23-26.
- Karasuyama, H., Kudo, A., and Melchers, F. (1990). The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J Exp Med* 172, 969-972.
- Kelly, L.M., Kutok, J.L., Williams, I.R., Boulton, C.L., Amaral, S.M., Curley, D.P., Ley, T.J., and Gilliland, D.G. (2002). PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8283-8288.
- Kinlen, L.J., and Petridou, E. (1995). Childhood leukemia and rural population movements: Greece, Italy, and other countries. *Cancer Causes Control* 6, 445-450.
- Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.

- Koop, K.E., MacDonald, L.M., and Lobe, C.G. (1996). Transcripts of *Grg4*, a murine groucho-related gene, are detected in adjacent tissues to other murine neurogenic gene homologues during embryonic development. *Mech Dev* 59, 73-87.
- Kosak, S.T., Skok, J.A., Medina, K.L., Riblet, R., Le Beau, M.M., Fisher, A.G., and Singh, H. (2002). Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* 296, 158-162.
- Kozmik, Z., Wang, S., Dorfler, P., Adams, B., and Busslinger, M. (1992). The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol Cell Biol* 12, 2662-2672.
- Lang, D., Powell, S.K., Plummer, R.S., Young, K.P., and Ruggeri, B.A. (2007). PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol* 73, 1-14.
- Liedtke, M., and Cleary, M.L. (2009). Therapeutic targeting of MLL. *Blood* 113, 6061-6068.
- Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z., *et al.* (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7580-7584.
- Lin, K.I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., and Calame, K. (2002). Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol* 22, 4771-4780.
- Lowen, M., Scott, G., and Zwollo, P. (2001). Functional analyses of two alternative isoforms of the transcription factor Pax-5. *J Biol Chem* 276, 42565-42574.
- Maier, H., Ostraat, R., Gao, H., Fields, S., Shinton, S.A., Medina, K.L., Ikawa, T., Murre, C., Singh, H., Hardy, R.R., *et al.* (2004). Early B cell factor cooperates with Runx1 and mediates epigenetic changes associated with mb-1 transcription. *Nat Immunol* 5, 1069-1077.
- Martensson, I.L., Almqvist, N., Grimsholm, O., and Bernardi, A.I. (2010). The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Lett* 584, 2572-2579.
- McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M., and Oettinger, M.A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83, 387-395.
- Medina, K.L., Pongubala, J.M., Reddy, K.L., Lancki, D.W., Dekoter, R., Kieslinger, M., Grosschedl, R., and Singh, H. (2004). Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. *Dev Cell* 7, 607-617.
- Meyer, C., Kowarz, E., Hofmann, J., Renneville, A., Zuna, J., Trka, J., Ben Abdelali, R., Macintyre, E., De Braekeleer, E., De Braekeleer, M., *et al.* (2009). New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 23, 1490-1499.
- Mikkola, I., Heavey, B., Horcher, M., and Busslinger, M. (2002). Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science* 297, 110-113.

- Morshead, K.B., Ciccone, D.N., Taverna, S.D., Allis, C.D., and Oettinger, M.A. (2003). Antigen receptor loci poised for V(D)J rearrangement are broadly associated with BRG1 and flanked by peaks of histone H3 dimethylated at lysine 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 11577-11582.
- Mortuza, F.Y., Moreira, I.M., Papaioannou, M., Gameiro, P., Coyle, L.A., Gricks, C.S., Amlot, P., Prentice, H.G., Madrigal, A., Hoffbrand, A.V., *et al.* (2001). Immunoglobulin heavy-chain gene rearrangement in adult acute lymphoblastic leukemia reveals preferential usage of J(H)-proximal variable gene segments. *Blood* *97*, 2716-2726.
- Mullighan, C.G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C.B., Coustan-Smith, E., Dalton, J.D., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S.B., *et al.* (2007). Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* *446*, 758-764.
- Mullighan, C.G., Williams, R.T., Downing, J.R., and Sherr, C.J. (2008). Failure of CDKN2A/B (INK4A/B-ARF)-mediated tumor suppression and resistance to targeted therapy in acute lymphoblastic leukemia induced by BCR-ABL. *Genes Dev* *22*, 1411-1415.
- Murre, C. (2005). Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nat Immunol* *6*, 1079-1086.
- Nebral, K., Denk, D., Attarbaschi, A., Konig, M., Mann, G., Haas, O.A., and Strehl, S. (2009). Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* *23*, 134-143.
- Nebral, K., Konig, M., Harder, L., Siebert, R., Haas, O.A., and Strehl, S. (2007). Identification of PML as novel PAX5 fusion partner in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* *139*, 269-274.
- Nera, K.P., Kohonen, P., Narvi, E., Peippo, A., Mustonen, L., Terho, P., Koskela, K., Buerstedde, J.M., and Lassila, O. (2006). Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity* *24*, 283-293.
- Nera, K.P., and Lassila, O. (2006). Pax5--a critical inhibitor of plasma cell fate. *Scand J Immunol* *64*, 190-199.
- Nobori, T., Miura, K., Wu, D.J., Lois, A., Takabayashi, K., and Carson, D.A. (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* *368*, 753-756.
- Nutt, S.L. (2008). B-cell identity--commitment is not forever. *The New England journal of medicine* *358*, 82-83.
- Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* *401*, 556-562.
- Nutt, S.L., and Kee, B.L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* *26*, 715-725.

- Nutt, S.L., Morrison, A.M., Dorfler, P., Rolink, A., and Busslinger, M. (1998). Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *Embo J* 17, 2319-2333.
- Nutt, S.L., Urbanek, P., Rolink, A., and Busslinger, M. (1997). Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev* 11, 476-491.
- O'Riordan, M., and Grosschedl, R. (1999). Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* 11, 21-31.
- Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517-1523.
- Ohno, H., Furukawa, T., Fukuhara, S., Zong, S.Q., Kamesaki, H., Shows, T.B., Le Beau, M.M., McKeithan, T.W., Kawakami, T., and Honjo, T. (1990). Molecular analysis of a chromosomal translocation, t(9;14)(p13;q32), in a diffuse large-cell lymphoma cell line expressing the Ki-1 antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 628-632.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Kuppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412, 341-346.
- Pillai, S., and Baltimore, D. (1987). Formation of disulphide-linked mu 2 omega 2 tetramers in pre-B cells by the 18K omega-immunoglobulin light chain. *Nature* 329, 172-174.
- Poe, J.C., Hasegawa, M., and Tedder, T.F. (2001). CD19, CD21, and CD22: multifaceted response regulators of B lymphocyte signal transduction. *Int Rev Immunol* 20, 739-762.
- Poppe, B., De Paepe, P., Michaux, L., Dastugue, N., Bastard, C., Herens, C., Moreau, E., Cavazzini, F., Yigit, N., Van Limbergen, H., *et al.* (2005). PAX5/IGH rearrangement is a recurrent finding in a subset of aggressive B-NHL with complex chromosomal rearrangements. *Genes Chromosomes Cancer* 44, 218-223.
- Pui, C.H., Relling, M.V., and Downing, J.R. (2004). Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350, 1535-1548.
- Pui, C.H., Robison, L.L., and Look, A.T. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371, 1030-1043.
- Radich, J.P., Kopecky, K.J., Boldt, D.H., Head, D., Slovak, M.L., Babu, R., Kirk, J., Lee, A., Kessler, P., Appelbaum, F., *et al.* (1994). Detection of BCR-ABL fusion genes in adult acute lymphoblastic leukemia by the polymerase chain reaction. *Leukemia* 8, 1688-1695.
- Raimondi, S.C., Pui, C.H., Hancock, M.L., Behm, F.G., Filatov, L., and Rivera, G.K. (1996). Heterogeneity of hyperdiploid (51-67) childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 10, 213-224.

- Reimold, A.M., Ponath, P.D., Li, Y.S., Hardy, R.R., David, C.S., Strominger, J.L., and Glimcher, L.H. (1996). Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *J Exp Med* 183, 393-401.
- Reljic, R., Wagner, S.D., Peakman, L.J., and Fearon, D.T. (2000). Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *J Exp Med* 192, 1841-1848.
- Roato, I., Brunetti, G., Gorassini, E., Grano, M., Colucci, S., Bonello, L., Buffoni, L., Manfredi, R., Ruffini, E., Ottaviani, D., *et al.* (2006). IL-7 up-regulates TNF-alpha-dependent osteoclastogenesis in patients affected by solid tumor. *PLoS One* 1, e124.
- Robichaud, G.A., Perreault, J.P., and Ouellette, R.J. (2008). Development of an isoform-specific gene suppression system: the study of the human Pax-5B transcriptional element. *Nucleic Acids Res* 36, 4609-4620.
- Roessler, S., Gyory, I., Imhof, S., Spivakov, M., Williams, R.R., Busslinger, M., Fisher, A.G., and Grosschedl, R. (2007). Distinct promoters mediate the regulation of Ebf1 gene expression by interleukin-7 and Pax5. *Mol Cell Biol* 27, 579-594.
- Roldan, E., Fuxa, M., Chong, W., Martinez, D., Novatchkova, M., Busslinger, M., and Skok, J.A. (2005). Locus 'decontraction' and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat Immunol* 6, 31-41.
- Rolink, A.G. (2004). B-cell development and pre-B-1 cell plasticity in vitro. *Methods Mol Biol* 271, 271-281.
- Rolink, A.G., Nutt, S.L., Melchers, F., and Busslinger, M. (1999). Long-term in vivo reconstitution of T-cell development by Pax5-deficient B-cell progenitors. *Nature* 401, 603-606.
- Romana, S.P., Le Coniat, M., and Berger, R. (1994). t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 9, 186-191.
- Romana, S.P., Mauchauffe, M., Le Coniat, M., Chumakov, I., Le Paslier, D., Berger, R., and Bernard, O.A. (1995). The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* 85, 3662-3670.
- Sayegh, C.E., Jhunjhunwala, S., Riblet, R., and Murre, C. (2005). Visualization of looping involving the immunoglobulin heavy-chain locus in developing B cells. *Genes Dev* 19, 322-327.
- Schebesta, A., McManus, S., Salvagiotto, G., Delogu, A., Busslinger, G.A., and Busslinger, M. (2007). Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity* 27, 49-63.
- Schebesta, M., Pfeffer, P.L., and Busslinger, M. (2002). Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene. *Immunity* 17, 473-485.

Scher, I., Sharrow, S.O., Wistar, R., Jr., Asofsky, R., and Paul, W.E. (1976). B-lymphocyte heterogeneity: ontogenetic development and organ distribution of B-lymphocyte populations defined by their density of surface immunoglobulin. *J Exp Med* *144*, 494-506.

Secker-Walker, L.M., Berger, R., Fenaux, P., Lai, J.L., Nelken, B., Garson, M., Michael, P.M., Hagemeijer, A., Harrison, C.J., Kaneko, Y., *et al.* (1992). Prognostic significance of the balanced t(1;19) and unbalanced der(19)t(1;19) translocations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* *6*, 363-369.

Seet, C.S., Brumbaugh, R.L., and Kee, B.L. (2004). Early B cell factor promotes B lymphopoiesis with reduced interleukin 7 responsiveness in the absence of E2A. *J Exp Med* *199*, 1689-1700.

Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltnane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., *et al.* (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* *17*, 51-62.

Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Qian, S.B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., *et al.* (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* *21*, 81-93.

Shaffer, A.L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E.P., and Staudt, L.M. (2000). BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* *13*, 199-212.

Shapiro-Shelef, M., Lin, K.I., McHeyzer-Williams, L.J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M.G., and Calame, K. (2003). Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* *19*, 607-620.

Souabni, A., Cobaleda, C., Schebesta, M., and Busslinger, M. (2002). Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity* *17*, 781-793.

Souabni, A., Jochum, W., and Busslinger, M. (2007). Oncogenic role of Pax5 in the T-lymphoid lineage upon ectopic expression from the immunoglobulin heavy-chain locus. *Blood* *109*, 281-289.

Stapleton, P., Weith, A., Urbanek, P., Kozmik, Z., and Busslinger, M. (1993). Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nat Genet* *3*, 292-298.

Stifani, S., Blaumueller, C.M., Redhead, N.J., Hill, R.E., and Artavanis-Tsakonas, S. (1992). Human homologs of a *Drosophila* Enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins. *Nat Genet* *2*, 343.

Strehl, S., Konig, M., Dworzak, M.N., Kalwak, K., and Haas, O.A. (2003). PAX5/ETV6 fusion defines cytogenetic entity dic(9;12)(p13;p13). *Leukemia* *17*, 1121-1123.

Stuart, E.T., and Gruss, P. (1995). PAX genes: what's new in developmental biology and cancer? *Hum Mol Genet* *4 Spec No*, 1717-1720.

- Su, I.H., Basavaraj, A., Krutchinsky, A.N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B.T., and Tarakhovskiy, A. (2003). Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol* 4, 124-131.
- Sudo, T., Ito, M., Ogawa, Y., Iizuka, M., Kodama, H., Kunisada, T., Hayashi, S., Ogawa, M., Sakai, K., and Nishikawa, S. (1989). Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development. *J Exp Med* 170, 333-338.
- Sun, X.H. (1994). Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development. *Cell* 79, 893-900.
- Tagoh, H., Ingram, R., Wilson, N., Salvagiotto, G., Warren, A.J., Clarke, D., Busslinger, M., and Bonifer, C. (2006). The mechanism of repression of the myeloid-specific c-fms gene by Pax5 during B lineage restriction. *Embo J* 25, 1070-1080.
- Tavian, M., Hallais, M.F., and Peault, B. (1999). Emergence of intraembryonic hematopoietic precursors in the pre-liver human embryo. *Development* 126, 793-803.
- Tavian, M., Robin, C., Coulombel, L., and Peault, B. (2001). The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. *Immunity* 15, 487-495.
- Thomas, E.K., Cancelas, J.A., Zheng, Y., and Williams, D.A. (2008). Rac GTPases as key regulators of p210-BCR-ABL-dependent leukemogenesis. *Leukemia* 22, 898-904.
- Tkachuk, D.C., Westbrook, C.A., Andreeff, M., Donlon, T.A., Cleary, M.L., Suryanarayan, K., Homge, M., Redner, A., Gray, J., and Pinkel, D. (1990). Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. *Science* 250, 559-562.
- Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.I., and Nagasawa, T. (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20, 707-718.
- Tsubata, T., and Reth, M. (1990). The products of pre-B cell-specific genes (λ 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J Exp Med* 172, 973-976.
- Tunayaplin, C., Shaffer, A.L., Angelin-Duclos, C.D., Yu, X., Staudt, L.M., and Calame, K.L. (2004). Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol* 173, 1158-1165.
- Tze, L.E., Schram, B.R., Lam, K.P., Hogquist, K.A., Hippen, K.L., Liu, J., Shinton, S.A., Otipoby, K.L., Rodine, P.R., Vegoe, A.L., *et al.* (2005). Basal immunoglobulin signaling actively maintains developmental stage in immature B cells. *PLoS Biol* 3, e82.
- Urbanek, P., Wang, Z.Q., Fetka, I., Wagner, E.F., and Busslinger, M. (1994). Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* 79, 901-912.

Walther, C., Guenet, J.L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M.D., Plachov, D., Balling, R., and Gruss, P. (1991). Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics* *11*, 424-434.

Xie, H., Ye, M., Feng, R., and Graf, T. (2004). Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* *117*, 663-676.

Xu, C.R., and Feeney, A.J. (2009). The epigenetic profile of Ig genes is dynamically regulated during B cell differentiation and is modulated by pre-B cell receptor signaling. *J Immunol* *182*, 1362-1369.

Yancopoulos, G.D., and Alt, F.W. (1985). Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* *40*, 271-281.

Ying, H., Healy, J.I., Goodnow, C.C., and Parnes, J.R. (1998). Regulation of mouse CD72 gene expression during B lymphocyte development. *J Immunol* *161*, 4760-4767.

Yoshida, T., Ng, S.Y., Zuniga-Pflucker, J.C., and Georgopoulos, K. (2006). Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nat Immunol* *7*, 382-391.

Zhang, Z., Espinoza, C.R., Yu, Z., Stephan, R., He, T., Williams, G.S., Burrows, P.D., Hagman, J., Feeney, A.J., and Cooper, M.D. (2006). Transcription factor Pax5 (BSAP) transactivates the RAG-mediated V(H)-to-DJ(H) rearrangement of immunoglobulin genes. *Nat Immunol* *7*, 616-624.

AUTHOR : Julien FAMILIADES

TITLE : Molecular abnormalities of PAX5 gene in B acute lymphoblastic leukemia

SUPERVISORS : Pr Eric DELABESSE and Pr Pierre BROUSSET

PLACE AND DAY OF ORAL: Toulouse, December 14 2010

ABSTRACT :

B cell lymphocytes are essential for humoral adaptive immunity. The expression of transcription factors drives the commitment of cells in B lineage. Among those factors, PAX5 fulfils a dual role by repressing B lineage ‘inappropriate’ genes and simultaneously activating B lineage-specific genes. PAX5 is expressed at similar levels throughout B cell development from the pro-B to the mature B cell stage and is subsequently repressed during terminal plasma cell differentiation. When Pax5^{-/-} pro-B cells are stimulated with other lineage-appropriate cytokines, they are able to differentiate into functional macrophages, granulocytes, dendritic cells, osteoclasts and natural killer cells.

Transcription factors mutations are frequently detected in hematopoietic cancers. The PAX5 gene was the prevalent target of somatic mutation, being altered in 38.9% of cases.

We screened PAX5 mutations in a unique cohort of adult BCP-ALL treated according to the protocols of the GRAALL03 (Group of Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia) and we reported that PAX5 is mutated in 34% of cases. Moreover, PAX5 complete loss and PAX5 point mutations differ. Indeed, PAX5 complete loss is significantly associated with BCR-ABL1 fusion gene and seems to be a secondary event consequence of genetic instability, whereas PAX5 point mutation might be the initial event in leukemogenesis.

Using classic cytogenetic techniques and a newly developed molecular strategy, we investigated 9p abnormalities, focusing especially on the PAX5 locus, on 153 childhood and adult B-ALL include in the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH).

Finally we undertook the functional characterization of PAX5 mutants using the *ex vivo* differentiation system described by Rolink and showed that the various kind of mutations not have the same impact on the B cell pathogenesis.

KEY WORDS : PAX5, acute lymphoblastic leukemia, mutations, *ex vivo* mouse model

DISCIPLINE : Cancerology

LABORATORY : INSERM U563-Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan

AUTEUR : Julien FAMILIADES

TITRE : Anomalies moléculaires du gène PAX5 dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de la lignée B

DIRECTEURS DE THESE : Pr Eric DELABESSE et Pr Pierre BROUSSET

LIEU et DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, le 14 Décembre 2010

RESUME :

Les lymphocytes B sont la clé de voute de cellules de l'immunité adaptative humorale. La mise en place de la lignée B dépend de l'expression coordonnée de facteurs de transcription. Parmi ceux-ci, *PAX5* a un rôle prépondérant en activant des gènes spécifiques de la lignée B et en réprimant des gènes nécessaires à l'engagement vers les autres lignages hématopoïétiques. Son expression est finement régulée durant la lymphopoïèse B jusqu'à son extinction dans les cellules matures permettant la différenciation terminale en cellules plasmocytaires productrices d'anticorps. La délétion homozygote de *Pax5* dans les modèles murins conduit à une trans ou une dédifférenciation des cellules B dans plusieurs autres lignées hématopoïétiques.

Les mutations de facteurs de transcription clés sont fréquemment détectées dans les hémopathies malignes. Dans ce contexte, *PAX5* a été décrit comme la cible préférentielle de mutations somatiques dans les LAL-B de l'enfant dans 38.9% de cas.

Nous avons réalisé une étude des mutations de *PAX5* dans les LAL-B de l'adulte, inclus dans le protocole clinique GRAALL03 (Group of Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia) et avons montré que *PAX5* était altéré dans 34% des cas. De plus les délétions de *PAX5* sont associées à la présence de BCR-ABL1 alors que les mutations ponctuelles sont toujours isolées. Ceci laisse penser que ces deux types d'altérations de *PAX5* ne sont pas équivalents, la mutation ponctuelle pourrait être un événement princeps de la leucémogénèse alors que la délétion de *PAX5* ne serait qu'une conséquence de l'instabilité génétique d'une cellule dans un processus leucémique. Nous avons également réalisé une recherche de translocations impliquant *PAX5* dans une cohorte du GFCH (Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique) de 153 patients LAL-B possédant un réarrangement du 9p.

Enfin nous avons entrepris la caractérisation fonctionnelle des mutants de *PAX5* en utilisant le système de différenciation *ex vivo* décrit par Rolink et montré que les différents types de mutations n'ont pas le même impact sur la pathogénèse B.

MOTS CLES : PAX5, leucémies aiguës lymphoblastiques, mutations, modèle *ex vivo* murin

DISCIPLINE : Cancérologie

LABORATOIRE : INSERM U563-Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan