



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 *Etienne Coyaud*
Le 27 avril 2011 à 14h30

Titre : *Caractérisation des réarrangements de PAX5 dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B*

JURY

Christian Récher (PU/PH, Président)
Pierre Brousset (PU/PH, Directeur)
Florence Nguyen-Khac (PU/PH, Rapporteur)
Laurent Delpy (CR1, Rapporteur)
Nicole Dastugue (MD/PH, Examinatrice)
Michel Cogné (PU/PH, Examineur)

Ecole doctorale : *Biologie Santé Biotechnologie*
Unité de recherche : *CRCT INSERM-UMR 1037*
Directeur(s) de Thèse : *Pr. Pierre Brousset*
Rapporteurs : *Florence Nguyen-Khac (PU/PH), Laurent Delpy (CR1)*

Remerciements

A mon directeur de thèse,

Je souhaite remercier le Professeur **Pierre Brousset** pour m'avoir fait confiance et laissé des libertés d'initiative tout au long de ces quatre années de travail en commun. Vous m'avez toujours assuré la possibilité de travailler dans les meilleures conditions et, comme vous avez coutume de le dire, totalement respecté votre part du contrat. Nos rapports ont évolué au cours de mon doctorat et je peux dire aujourd'hui que j'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme directeur de thèse. Au cours de ces dernières années, vous vous êtes impliqué dans l'orientation de mes travaux et vous vous êtes également investi dans celle de mon avenir. Vous n'y étiez pas obligé mais je vous en suis infiniment reconnaissant. Vous avez eu un réel impact positif sur mon parcours professionnel et personnel. Je suis heureux que vous fassiez ainsi partie aujourd'hui des personnes qui ont marqué ma vie.

Aux membres du jury,

Je tiens à vous remercier chaleureusement d'avoir accepté de juger mes travaux et d'avoir dégagé du temps pour vous y consacrer. J'ai été touché que vous ayez répondu si rapidement, et avec enthousiasme, à ma demande.

Merci au Professeur **Christian Récher** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je vous ai contacté bien tard et je vous suis gré d'avoir accueilli ma demande avec bienveillance. Bien que vous baigniez d'habitude dans l'univers des leucémies aiguës myéloblastiques, j'espère que vous avez trouvé de l'intérêt à cette incursion dans le monde des leucémies lymphoblastiques.

Je remercie également le Professeur **Florence Nguyen-Khac** d'avoir bien voulu être rapporteur de mes travaux. Je vous suis reconnaissant d'avoir porté votre regard d'experte sur mon manuscrit et de vos remarques on ne peut plus pertinentes pour l'améliorer. Votre contribution est pour moi essentielle dans la mesure où la cytogénétique a été ma plus fidèle alliée dans la conception de mon projet et dans l'orientation de mes travaux.

Docteur **Laurent Delpy**, vous avez vous aussi immédiatement accepté d'être rapporteur dans mon jury. Je vous suis vraiment gré pour votre investissement dans l'évaluation de mon travail et pour votre implication très positive. Au cours de la période assez anxiogène de préparation de cet examen, le rapport sur mon manuscrit que vous avez transmis à l'école doctorale m'a fait beaucoup de bien. Dans la mesure où c'est la première thèse dont vous êtes rapporteur, vous risquez de vous en souvenir longtemps. J'espère donc que vous en garderez un agréable souvenir.

Merci beaucoup au Docteur **Nicole Dastugue** d'avoir accepté de participer à mon jury. Vous êtes à l'origine de nombreux travaux de recherche de notre équipe et votre implication à mes côtés a toujours été sans faille. J'ai eu la chance de vous côtoyer au cours de mon master, puis de ma thèse, et vous m'avez toujours reçu avec patience et gentillesse. Ça a été pour moi un vrai privilège d'interagir avec vous et je garderai un excellent souvenir de nos collaborations.

Je tiens à remercier le Professeur **Michel Cogné** d'avoir accepté de venir assister à la présentation de mes travaux. Nous nous sommes croisés au congrès du CHO en septembre dernier et j'en garde un très bon souvenir. Je souhaitais vivement que vous veniez et je suis très heureux et honoré que vous ayez réussi à vous libérer pour ma soutenance.

A mes collègues,

Cathy (Kattel de Francis) : C'est vachement dur d'écrire sur toi parce que j'ai l'impression que quoi que je mette, je serais en deçà de la vérité. Je devrais écrire un bouquin pour te remercier, quelques lignes ne suffiront certainement pas à te donner toute la mesure de ma gratitude. Je ne m'étendrais pas sur la fois où tu as essayé de me tuer à coups de tiroir... (Cela dit le choix de l'arme n'était pas des plus judicieux). Tu es vraiment une nana adorable et tu as toute mon amitié. Tu as été à mon écoute dans mes périodes de doute et tu m'as toujours soutenu dans les moments les plus difficiles. Je pense que tu ne conçois pas à quel point il a été précieux pour moi de te voir ces dernières années. J'ai appris et je me suis construit à tes côtés. Toute ta générosité et ton attitude positive dans l'équipe sont des choses difficiles à mesurer mais absolument essentielles. Je suis heureux que tu fasses toi aussi une thèse car c'est non seulement la récompense de tes réelles compétences scientifiques, mais aussi le juste retour de toute ta contribution immatérielle au bien-être de chacun. Ma thèse t'appartient aussi car si j'en suis là aujourd'hui, c'est qu'à travers toi j'ai retrouvé à chaque fois du sens à mon investissement. Tu as été mon point de repère durant plus de quatre ans et tu ne m'as jamais déçu. Je ne suis pas sûr que je recroiserais des gens de ta qualité humaine dans mon avenir professionnel, et quand bien même ça arriverait, tu resteras unique pour moi car tu as été là pendant une période où j'avais plus que jamais besoin de toi. J'ai aimé passer du temps avec toi et tu vas me manquer.

Cécile : Ma plus ancienne colloc de bureau ! Quand tu es arrivée, je me souviens que tu m'avais aidé avec bienveillance à me dépatouiller de mes soucis techniques. Ça m'avait touché et je ne l'oublierai pas. J'ai beaucoup apprécié ta compagnie, je te souhaite de faire un beau bébé et que ton avenir professionnel s'éclaircisse.

Céline (et pas Christine !) : Ma deuxième plus ancienne colloc de bureau ! Même si tu parles trop fort au téléphone, ça a été un plaisir de te côtoyer. Merci pour ta compagnie, ta spontanéité et ta bonne humeur.

Charlotte (Painchette) : La relayeuse du flambeau PAX5. Tu m'as beaucoup fait rire avec tes expressions venues d'une autre planète ! Je te souhaite du courage pour les années de thèse qu'il te reste. Tu passeras probablement par les divers sentiments et périodes plus ou moins agréables, mais garde le cap, tu travailles assez pour être certaine que ça paiera bientôt. Tu auras aussi besoin d'une part de chance, alors je t'en souhaite plein pour que tu cartannes !

Cyril : On n'a pas eu des rapports toujours simples et on a des points de vue parfois divergents sur la façon de mener des recherches. En dépit de ça, tu t'es investi dans mes projets et a remplis ton rôle. J'ai apprécié ta compagnie et ton sens de l'humour très développé (tu as un répertoire de blagues assez impressionnant !). En outre, les quelques occasions que l'on a eu de trinquer ensemble après le labo ont toujours été de très agréables moments pour moi. Je te remercie de ton investissement dans ma thèse, et en particulier dans tes corrections et ton écoute dans la préparation de mes divers rapports ou oraux. J'ai écouté et tenu compte de tes remarques pertinentes à chaque fois. Bon courage pour ta carrière !

David : Tu m'as ouvert les yeux sur différentes façons de percevoir les choses quand je manquais de discernement. Je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté. Ça serait trop long

de faire la liste alors je me contente des grands axes. Merci pour l'esprit scientifique que tu as tenté de me transmettre. Merci aussi pour ton amitié et pour tous les bons moments que l'on a partagé ensemble. Ça m'a fait énormément de bien que tu sois là et, un peu à l'image de Cathy, tu as été un soutien majeur au cours de mon doctorat. J'ai aimé ton honnêteté, ta compétence et tes talents artistiques. J'ai aussi apprécié ta générosité, ton humour et ta culture. Je suis très admiratif de tout ce que tu fais et du cœur que tu mets dans tes passions, ton travail en faisant partie. J'espère que ton avenir te réserve de très belles surprises et je suis fier de te compter aujourd'hui parmi mes amis. Tu es vraiment quelqu'un d'admirable. Merci encore mille fois.

Eric : Je regrette que l'on n'ait pas eu l'occasion de plus travailler directement ensemble. J'ai toujours été impressionné par votre connaissance encyclopédique des hémopathies. Vos conseils, tant sur le plan méthodologique que technique, ont toujours été pour moi très précieux. Merci du temps que vous avez consacré à mes travaux.

Emilie Dejean : Ta compagnie m'a été très agréable. J'ai apprécié ta spontanéité et ton intelligence dans la perception des gens et des projets. Tu es plus qu'une collègue pour moi et je te remercie de ton soutien au cours de ma thèse. J'ai quelques impérissables souvenirs en ta compagnie et je souhaite vraiment que l'on reste en contact dans l'avenir. Bonne chance pour ta fin de thèse, tu vas vraiment assurer j'en suis certain !

Estelle : Merci pour ta gentillesse et ton soutien technique qui m'a été indispensable à mon arrivée au laboratoire. Quand j'ai vu que tu jouais du violon à la soirée de l'IFR (en 2007 je crois), je me suis dit qu'une musicienne ne pouvait être que sensible et ouverte d'esprit. Les conversations que l'on a eues par la suite n'ont jamais trahi ces *a priori* positifs. Je ne sais pas comment tu fais pour être aussi active et bosser autant entre le labo, la fac et tes bambins, mais vraiment chapeau ! Ne te départi jamais de ton sourire, c'est ta marque de fabrique et ça te va très bien ! Merci encore d'avoir été là pendant ma thèse.

Fabienne : J'ai appris à te connaître au fil de mes années dans le laboratoire. J'ai apprécié ton franc parlé et ton attitude positive. Merci pour le repas de labo que tu as organisé, c'était une très bonne idée, un très bon moment et c'est ces choses là qui apportent de la cohésion dans une équipe. Merci d'avoir ce souci du bien-être collectif. Je te souhaite tout ce qui peut arriver de meilleur pour les années qui viennent.

Janine : Vous avez été au cœur de la logistique de ma thèse. Vous avez géré tout ce que je vous ai demandé à merveille, et c'est donc aussi grâce à vous que j'ai pu mener mes travaux à bien. Votre bonne humeur rejaillie sur l'équipe et ça a été un vrai plaisir de travailler à vos côtés.

Julie : On a traversé l'un et l'autre des moments compliqués en master. C'était super de t'avoir dans la même équipe. Merci pour tes « tictictic », « tactactac » et autres, sur fond de fringues colorées, qui ont rythmé mes années de doctorat. Merci aussi pour les soirées que tu as organisées chez toi. Ça m'a aidé de t'avoir dans les parages. Tu es une fille joyeuse et marrante, tes futurs collègues auront de la chance de t'avoir dans leur équipe. Je te souhaite une bonne fin de thèse, beaucoup de bonheur, et puis on se reverra sûrement à Montréal ou Toronto dans pas si longtemps. En attendant, force et honneur !

Julien (Painch) : Faites entrer l'artiste ! Merci pour tes extraordinaires performances *a capela* et sans aucun trucage, tes références culturelles de haute volée (notamment Gérard Saint-

Brice), et tes éclats de rire. Tu es la seule personne que je connaisse qui est capable de citer autant de références de la Tour Montparnasse Infernale. Merci aussi pour les spectacles que l'on est allé voir ensemble, c'était de très bons moments. J'ai pris plaisir à travailler avec toi et on a franchement à la fois avancé scientifiquement et bien rigolé ensemble. La partie du projet où l'on a manipulé côte à côte a été la plus intéressante pour moi. Je ne te souhaite que des très belles choses pour l'avenir !

Laurence : J'ai toujours eu beaucoup de plaisir à te voir. Merci pour la sympathie que tu m'as témoignée, ta douceur de caractère, et ta capacité à transmettre tes visions positives des choses. Ça a été à chaque fois un plaisir pour moi de discuter avec toi.

Marie-Pierre : Quel plaisir de t'avoir dans le bureau ! J'ai été vraiment content de te connaître et de travailler avec toi. J'espère que tu sauras profiter de mon ancien fauteuil et de l'assise confortable que j'ai façonnée avec amour pendant de longues années (en prévision de ce legs bien entendu). Je te remercie de tout le soutien que tu m'as apporté, de ton amitié et de tes sourires (et aussi de ton humour car t'es vraiment drôle). Tu as illuminé (au moins !) ma deuxième partie de thèse et je ne t'oublierai pas.

Michèle : Merci pour les conversations scientifiques intéressantes que l'on a eu tout au long de ces années. J'ai beaucoup apprécié votre sens de l'humour.

Naïs : Merci pour ta contribution à mon travail et pour ton attitude posée et positive. Je te souhaite un avenir radieux.

Sophie : Tu es arrivée récemment et nous avons très peu eu l'occasion de travailler ensemble. Cela dit j'ai passé d'agréables moments à interagir avec toi. Je te remercie de ton calme, de tes sourires et de ta confiance.

Stéphanie : Tu ne peux pas savoir combien j'ai appris à tes côtés. Tu as été pour moi une lumière cytogénétique et une précieuse conseillère dans mes travaux. Nous nous sommes toujours bien entendus et je garderai un impérissable souvenir de notre collaboration. Merci de tout le temps que tu as consacré à essayer de combler le puits sans fond de mon ignorance. Merci de ta gentillesse, de ta franchise et de ton intelligence.

Sylvie : On a eu quelques longues conversations en salle de culture qui m'ont permis, en fin de compte que récemment, de te connaître un peu mieux. J'ai apprécié ta compagnie et ces dialogues. Je te souhaite à toi aussi beaucoup de réussites dans ta vie personnelle et professionnelle.

Wilfried : Tu m'as appris de nouveaux mots. Tu m'as aussi appris ce qui se passait à Tours et, bien qu'y ayant vécu pendant 14 ans, je n'avais pas dans le souvenir que les soirées étudiantes y étaient si « festives » (cela dit je ne me souviens peut être pas de toutes mes soirées...) ! Tu m'as aussi beaucoup fait rire ! Pour tout ça, je te remercie vraiment. J'en profite aussi pour te dire que je suis impressionné par ton parcours. Je te souhaite d'avoir de la chance dans la suite de ta thèse, conjugée à ton sens critique et à la quantité de travail que tu fournis, ça devrait faire des étincelles. J'ai failli oublier mais tu n'y couperas pas, je te souhaite de trouver chaussure à ton pied (et quand ça arrivera, tâche de trouver le même modèle pour l'autre pied). En tous cas je trouve vraiment que tu es quelqu'un d'intéressant et je suis bien content d'avoir croisé ton chemin.

A mes anciens collègues,

Alan Benard : Presqu'homonyme et presque le même physique qu'Alain Bernard, je te remercie pour les bons moments que j'ai passé en ta compagnie.

Georges Delsol : Merci pour votre participation à mes travaux de thèse. Ça a été un honneur pour moi d'appartenir à votre équipe de recherche.

Florence : On a peu travaillé ensemble mais je garde un super souvenir de toi. Merci pour ton attitude décontractée et les conversations passionnantes que l'on a eues.

Gilles : J'ai énormément apprécié votre sens de l'humour et votre attitude avec moi. J'ai toujours admiré votre insatiable appétit (scientifique bien entendu). Je vous souhaite de belles aventures humaines et scientifiques dans votre nouvelle équipe.

Jean-François : Tu as été vraiment super avec moi au cours de mon master et j'ai à chaque fois trouvé du réconfort à parler avec toi. Merci pour tout ce que tu m'as apporté, je ne t'oublierai pas.

Jérôme : Mon maître irradiateur vénéré. Merci pour tous les petits coups de mains que tu m'as donné, toujours avec enthousiasme. Merci aussi pour tes excellentes crêpes ! Je te souhaite à toi aussi une bonne fin de thèse et je te félicite pour la qualité de ton travail.

Marina : Merci beaucoup pour tes qualités humaines et la bonne humeur qui émane de toi. Tu sais toi aussi être très drôle et ça m'a fait plaisir de travailler à tes côtés. Je te souhaite une bonne fin de post-doc et de réussir lors de ton retour. Ça va te faire du bien de revenir.

Ruth : Je garde un excellent souvenir de toi et j'espère que l'on aura l'occasion de travailler ensemble un jour ou l'autre. Merci pour ton amitié et bravo pour tes compétences scientifiques, tu m'as toujours impressionné.

Merci également à tous les étudiants qui ne sont resté que quelques mois au laboratoire. Vous m'avez tous apporté quelque chose et votre sang neuf m'a à chaque fois poussé à revoir les bases de mes projets.

Aux collègues des autres équipes,

Equipe de Jean-Jacques Fournié / Guy Laurent : Merci beaucoup de m'avoir accompagné ces quatre années et demi. En particulier, merci à **Emilie-Fleur** pour sa douceur de caractère, son amitié et son soutien sans faille. Merci aussi à **Emilie** Laprevotte pour son amitié et de m'avoir également toujours soutenu. Merci encore à **Emilie** Gross et **Samar** pour avoir été d'excellente compagnie, toujours sympathiques et souriantes ; à **Anne** pour les échanges très sympathiques et enrichissants que l'on a eu ; aux **Christines** pour les bonnes rigolades et nos discussions intéressantes. Merci enfin à **Jean-Jacques** pour son écoute, sa gentillesse, et pour m'avoir soutenu dans mon projet post-doctoral.

Equipe de Bernard Payrastra : Un grand merci à vous tous, et plus particulièrement à **Frédéric** qui a été pour moi un fidèle compagnon de thèse. Merci pour tes imitations géniales, ton amitié, et bravo pour tes travaux ! Merci aussi à **Gaëtan** qui a toujours été parmi les premiers à répondre présent et avec beaucoup de gentillesse quand j'avais des questions techniques. Merci aussi à **Frédérique** pour ses phrases venues d'ailleurs, son soutien et ses conseils toujours pertinents. Vous avez vous aussi marqué ma thèse par votre présence à mes côtés.

A mes amis,

Merci à **Laurent, Antoine, Benoit, Sarah, Miguel, Julien, Lisa, Marion, Joffrey** (et à leurs moitiés respectives) pour leur amitié sans faille depuis plus de quinze ans. Je n'ai pas pu vous voir assez pendant ma thèse et vous m'avez manqué. Je vous aime de tout cœur. Merci aussi à **Christine, Ludovic, Mathieu, Céline, Julien** et **Florence** pour avoir été un vrai soutien moral à mes cotés à Toulouse.

A la famille d'Estelle,

Vous m'avez toujours traité comme un des vôtres. **Elisabeth, Jean-Louis, Emilie, Etienne** (...et **Raphaël**), j'ai été très sensible à votre générosité, à votre souci de mon bien-être et à votre soutien sans faille au cours de cette thèse. Votre présence a été chaleureuse, rassurante et bienveillante. Vous avez été vraiment adorables avec moi. Merci de la confiance que vous m'avez témoigné et de tout ce que vous avez fait pour moi durant toutes ces années.

A ma famille,

Merci beaucoup pour votre amour et de votre soutien au cours de ces dernières années où j'ai été loin de vous. Des plus jeunes aux moins jeunes : **Pierre-Marie & Mélanie** (...et **Valentine**), votre installation dans la région m'a fait moralement beaucoup de bien. **Martin & Estelle** (...et **Tiphaine**), merci pour tous les conseils bienveillants que vous m'avez donnés. **Anne-Sabine** et **Emmanuel** (...et **Marie, Madeleine, Claire, Louise**), je vous remercie de l'attention que vous avez porté à mon bien être. Merci également à toi **Maman** pour te soucier de mon bonheur. **Tonton**, merci pour ta générosité et ton écoute durant ces années. Merci enfin à toi **Papa**, je n'aurais probablement pas fait cette thèse sans le goût que tu nous as transmis pour les études. Merci de tout le soutien et l'amour que vous m'avez donné.

A Estelle,

Cette thèse t'est dédiée. Merci pour ton amour, ta patience et tes encouragements sans faille durant ces quatre années. Je ne vois pas comment j'y serais parvenu sans toi. Je suis fier de toi, de nos projets, et de partir avec toi au Canada.

I.	Principes généraux de l'hématopoïèse	11
A.	Modèles de développement du tissu hématopoïétique	11
1.	Modèle classique de l'hématopoïèse	11
2.	Modèle révisé de l'hématopoïèse	14
B.	Les facteurs de transcription dans le choix des spécialisations	16
C.	Principes moléculaires de l'hématopoïèse	17
D.	Autres éléments déterminants de l'hématopoïèse	19
1.	Les Micro-ARNs	19
2.	Les modifications intra cellulaires	19
3.	Les signaux extracellulaires	20
II.	La lymphopoïèse B.....	22
A.	Vue d'ensemble des différentes étapes de différenciation	22
B.	Les événements précoces de la différenciation B	25
1.	La signalisation induite par les cytokines	25
2.	Les facteurs de transcription des stades précoces d'engagement vers la lignée B... ..	26
a)	Ikaros	26
b)	PU.1	26
c)	E2A.....	27
C.	Les facteurs de transcription impliqués dans l'identité et la maturation B	28
1.	Ebf1	28
2.	Pax5	29
3.	Ikaros	31
4.	Les autres facteurs de transcription importants dans la différenciation B	31
D.	Les mécanismes de maintien de l'identité B	32
1.	La différenciation terminale	32
E.	Caractérisation phénotypique des stades de différenciation B.....	33
F.	Les points de contrôle de la différenciation B.....	34
1.	Le point de contrôle pré-BCR	34
2.	Le point de contrôle du BCR.....	39
G.	Les interactions avec les cellules stromales	39
III.	Le gène <i>Pax5</i>	41
A.	Les gènes de la famille Pax	41
1.	Dans l'embryogénèse	41
2.	Structure des protéines Paired Box	42
3.	Fonctions spécifiques des membres de la famille Pax	42
4.	Organisation du gène PAX5	43
5.	Structure de la protéine PAX5	44
6.	Les isoformes de PAX5.....	45
7.	Fonctions de Pax5 au cours de la lymphopoïèse B	47
a)	Engagement dans la lymphopoïèse B.....	47
b)	Promotion de la transcription des gènes B spécifiques	48
c)	Répression de la transcription des gènes non-B.....	50
d)	Implication de Pax5 dans les réarrangements V(D)J	50
e)	Différenciation plasmocytaire	52
IV.	Les leucémies aiguës lymphoblastiques de type B	54
A.	Généralités.....	54
1.	Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)	54
B.	Bases moléculaires et génétiques des LAL-B	55
1.	Les anomalies cytogénétiques	55
2.	Mécanismes associés aux translocations chromosomiques	56

a)	Défauts de machineries de réparation	56
b)	Organisation 3D de la chromatine dans le noyau.....	58
c)	Séquences spécifiques et sélection des événements oncogéniques.....	59
3.	Anomalies fréquentes des LAL-B	60
a)	Anomalies de structure.....	60
b)	Anomalies de nombre.....	62
c)	Anomalies de séquences.....	63
C.	Les altérations de PAX5 dans les LAL-B	64
1.	Délétions de PAX5.....	64
2.	Mutations ponctuelles de PAX5.....	65
3.	Les translocations chromosomiques impliquant PAX5	65
V.	Expérimentation	67
A.	Problématiques	67
B.	Démarches expérimentales.....	68
1.	Vue d'ensemble.....	68
2.	Mise en place des outils de biologie moléculaire.....	69
a)	Techniques associées à l'ADN polymérase Phi29.....	69
3.	Travaux publiés – le statut du locus <i>PAX5</i> dans les LAL-B	74
4.	Travaux préliminaires – expression des fusions de <i>PAX5</i> dans la différenciation B	
	102	
a)	Présentation du modèle	102
b)	Résultats expérimentaux préliminaires	106
c)	Discussion sur les résultats préliminaires.....	121
VI.	Discussion générale et conclusions	129
VII.	Perspectives.....	135
VIII.	Références bibliographiques	136
IX.	Annexes	155
1.	Annexe#1 : <i>Protocole RCA sur BAC</i>	155
2.	Annexe#2 : <i>Protocole détaillé RCA-RACE</i>	157
3.	Annexe#3 : <i>Publication du GRAAL</i>	159
4.	Annexe#4 : <i>Idéogramme couleur (figure S4 Blood)</i>	170
5.	Annexe#5 : <i>Protocole système murin de différenciation B</i>	171
6.	Annexe#6 : <i>Liste des abréviations et des gènes</i>	177
7.	Annexe#7 : <i>Abréviations cytogénétiques utilisées</i>	183

I. Principes généraux de l'hématopoïèse

Le système hématopoïétique représente un modèle de choix pour étudier les éléments de régulation qui permettent à une cellule souche de générer des cellules immunitaires et sanguines, de morphologies et de fonctions très différentes. Une même cellule souche hématopoïétique (CSH) est en effet capable de produire des érythrocytes, des plaquettes, des mastocytes, des granulocytes, des basophiles, des éosinophiles, des macrophages, des cellules dendritiques, ainsi que des lymphocytes B, T et Natural Killer (NK) (**figure 1**). L'hématopoïèse regroupe l'ensemble des mécanismes permettant à une CSH de générer la totalité des lignées cellulaires impliquées dans l'hémostase, le transport de gaz, l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'auto-renouvellement des CSH permet la production de l'ensemble de ces cellules tout au long de la vie. La CSH, relativement quiescente, génère une série de progéniteurs, hiérarchiquement organisés, qui entrent en prolifération et, dans le même temps, restreignent progressivement leur capacité à se différencier en divers types cellulaires. Ces phénomènes sont corrélés à l'expression de gènes spécifiques des lignées qui destinent les cellules vers l'acquisition d'un phénotype mature, c'est-à-dire fonctionnel.

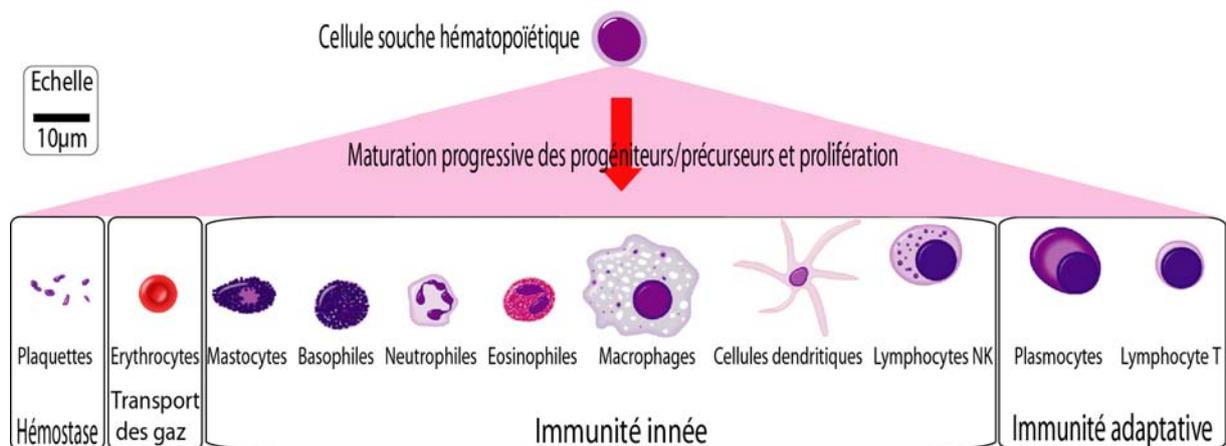


Figure 1 : Principe général de l'hématopoïèse et grandes fonctions des cellules du tissu sanguin (pictographie des cellules : Wikimedia Commons, Andre). En bas sont représentées les cellules fonctionnelles de chacune des lignées regroupées dans les grandes fonctions auxquelles elles participent.

A. Modèles de développement du tissu hématopoïétique

1. Modèle classique de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus hiérarchisé. Ce modèle a été renforcé par l'isolement de différents progéniteurs, cellules de stades intermédiaires entre CSH et cellules matures, sur la base de phénotypes membranaires analysés en cytométrie de flux. Des expériences de

développement *in vitro* et *in vivo* de ces cellules ont permis de définir une architecture de l'hématopoïèse. Durant les 15 dernières années, les chercheurs ont exploré ces pistes et ont ainsi décrit différents stades cellulaires comme les CSH de long terme (CSH-LT), les CSH de court terme (CSH-CT), les progéniteurs multipotents (PMP). Ces expériences se sont notamment basées sur la capacité de ces cellules intermédiaires à reconstituer un plus ou moins large spectre d'espèces cellulaires différenciées. Ils ont ainsi décrit une série de progéniteurs ayant perdu un certain potentiel de différenciation : les progéniteurs myéloïde communs (PMC), les progéniteurs lymphoïdes communs (PLC) (Kondo et al., 1997), les progéniteurs granulo-monocytaires (PGM) et les progéniteurs érythro-mégakaryocytaires (PEM) (Akashi et al., 2000) (**figure 2**).

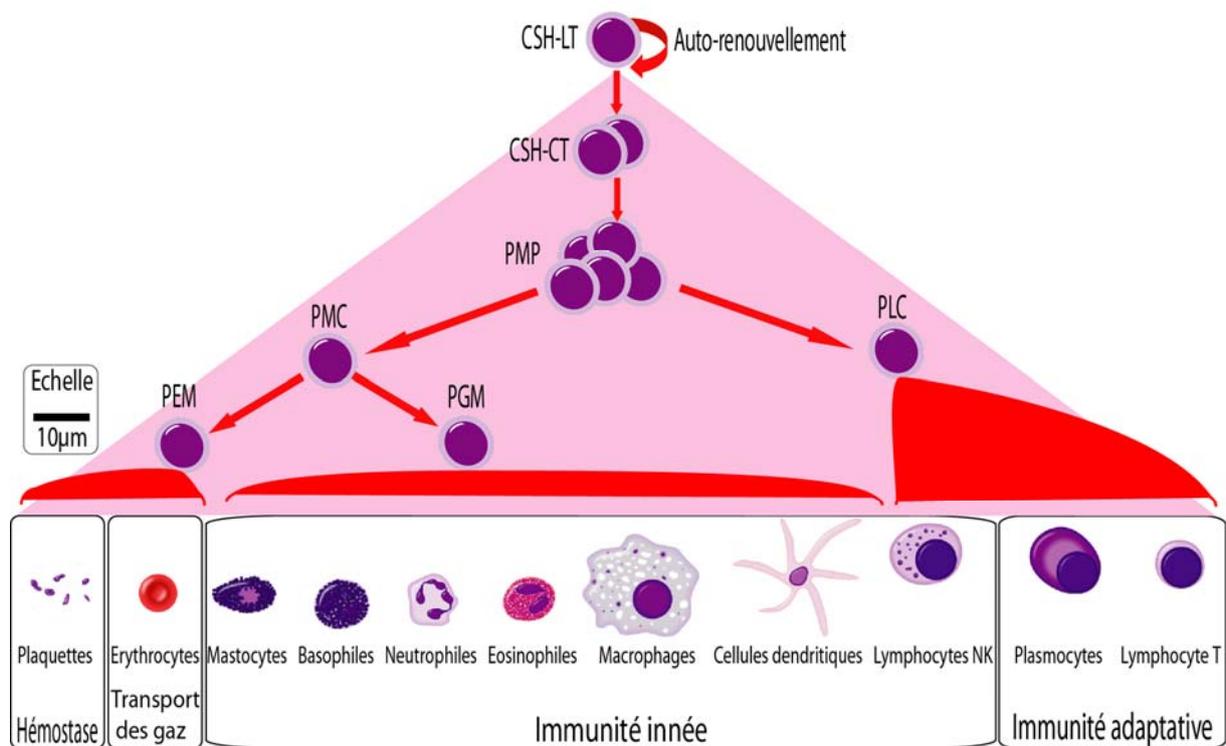


Figure 2 : Modèle classique de l'hématopoïèse. CSH-LT : Cellules Souches Hématopoïétiques de Long Terme ; CSH-CT : CSH de Court Terme ; PMP : Progéniteur Multi-Potent ; PMC : Progéniteur Myéloïde Commun ; PLC : Progéniteur Lymphoïde Commun ; PEM : Progéniteurs Erythro-Mégakaryocytaires ; PGM : Progéniteurs Granulo-Monocytaires. Les potentiels de différenciation des PEM, PGM et PLC sont représentés par les cellules attenantes aux aires rouges. Ces aires rouges incluent des stades de différenciation vers les cellules matures représentées en bas.

L'analyse des potentiels de différenciation de ces cellules intermédiaires isolées a permis de consolider le modèle classique de l'hématopoïèse. Il présente les PMP comme les dernières cellules capables de produire tous les types cellulaires matures. Ces PMP vont en effet être capables de reconstituer l'ensemble des lignées quand ils sont greffés chez la souris mais seront cependant incapables de soutenir la reconstitution du tissu hématopoïétique à long

terme, du fait de leur incapacité à s'auto-renouveler. Ce modèle classique présente également une dichotomie entre les lignées myéloïde et lymphoïde. L'hypothèse de cette ségrégation myéloïde *versus* lymphoïde est intuitive car il existe des différences fondamentales de développement entre ces deux lignées. Les cellules B et T se différencient en assurant l'assemblage de leurs récepteurs antigéniques, mécanisme associé au remaniement de leur ADN. Ce mécanisme permet aux cellules de l'immunité adaptative d'acquérir un potentiel de réponses spécifiques à un large panel d'antigènes. Ce modèle classique est également étayé par l'analyse des profils d'expression génique des différents progéniteurs. Les CSH et les PMP expriment l'ensemble des gènes nécessaires à l'engagement dans chacune des lignées (Hu et al., 1997). La génération suivante exprime un profil de gènes plus restreint, corrélé à une diminution de leur potentiel de différenciation en plusieurs lignées. A titre d'exemple, les CSH, PMP et PMC co-expriment des gènes granulo-monocytaires et érythro-mégacaryocytaires, ce qui n'est pas le cas des progéniteurs en aval (PGM et PEM) qui expriment l'un ou l'autre des profils (Miyamoto et al., 2002). La co-expression de gènes spécifiques de lignées différentes dans les progéniteurs très précoces de l'hématopoïèse peut refléter leur multi-potentiel de différenciation, qui sera par la suite restreint vers telle ou telle lignée en fonction de stimulations extrinsèques et de remaniements de la chromatine.

Bien que ce modèle classique ait prouvé son bien-fondé en permettant la découverte des gènes régulant l'hématopoïèse, il est difficilement conciliable avec certaines données expérimentales (Singh, 1996). Par exemple, l'analyse de l'hématopoïèse fœtale dans des souris PU.1^{-/-}, facteur de transcription majeur de l'hématopoïèse, a révélé un défaut de formation des lymphocytes B et T, des monocytes et des progéniteurs granulocytaires. Dans ce modèle, la formation de mégacaryocytes et d'érythrocytes n'était pas affectée (Scott et al., 1994). Ce résultat a depuis été confirmé dans l'hématopoïèse adulte (Iwasaki et al., 2005) et prouve l'existence d'un progéniteur commun, au carrefour de la formation des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. En cohérence avec cette observation, des travaux ont permis d'isoler des cellules progénitrices aux potentiels à la fois B et macrophages (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2002). D'autre part, la caractérisation de l'origine des lymphocytes T a aussi remis en question la pertinence du modèle classique de l'hématopoïèse. Des études ont démontré que les précurseurs des cellules T peuvent se former indépendamment des PLC (Allman et al., 2003) et que les précurseurs thymiques des cellules T conservent un potentiel de différenciation en granulocytes et en macrophages (Bell and Bhandoola, 2008; Wada et al., 2008). L'ensemble de ces résultats remet sérieusement en

question la position centrale des PLC dans le développement des lymphocytes et plaide en faveur de l'existence d'un progéniteur commun de l'ensemble des lignées de l'immunité, innée ou adaptative.

2. Modèle révisé de l'hématopoïèse

Des expériences particulièrement probantes ont permis de construire une architecture plus cohérente de l'hématopoïèse. À l'aide de souris transgéniques, porteuses de la *gfp* sur un locus *Rag1* (recombinase dont l'expression est restreinte aux cellules lymphoïdes B et T), le groupe de Paul Kincaid a démontré que l'orientation vers les lignées lymphoïdes advient plus précocement que ce qui est décrit dans le modèle classique de l'hématopoïèse (Igarashi et al., 2002). Les cellules RAG1/GFP⁺ isolées dans le compartiment Lin⁻/Sca^{hi}/c-Kit^{hi} (LSK) montrent une capacité bien plus forte à se différencier en lymphocytes et un potentiel faible de différenciation en granulocytes ou en macrophages. En se basant sur l'expression du récepteur Flt3, l'équipe de Sten Jacobsen a montré que le compartiment des PMP peut être divisé en une sous-population de progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (PEM, Flt3⁻) et une sous-population de progéniteurs multipotents amorcés vers la différenciation lymphoïde (Flt3⁺, PMAL) (Adolfsson et al., 2005). La caractérisation fonctionnelle de la population PMAL a été entreprise (Forsberg et al., 2006) et d'autres travaux ont confirmé l'existence de ce stade de différenciation en identifiant cette population au sein des progéniteurs hématopoïétiques sur le critère d'expression de VCAM (Lai and Kondo, 2006). Ces travaux ont mené à la proposition d'un modèle revu de l'hématopoïèse (**figure 3**).

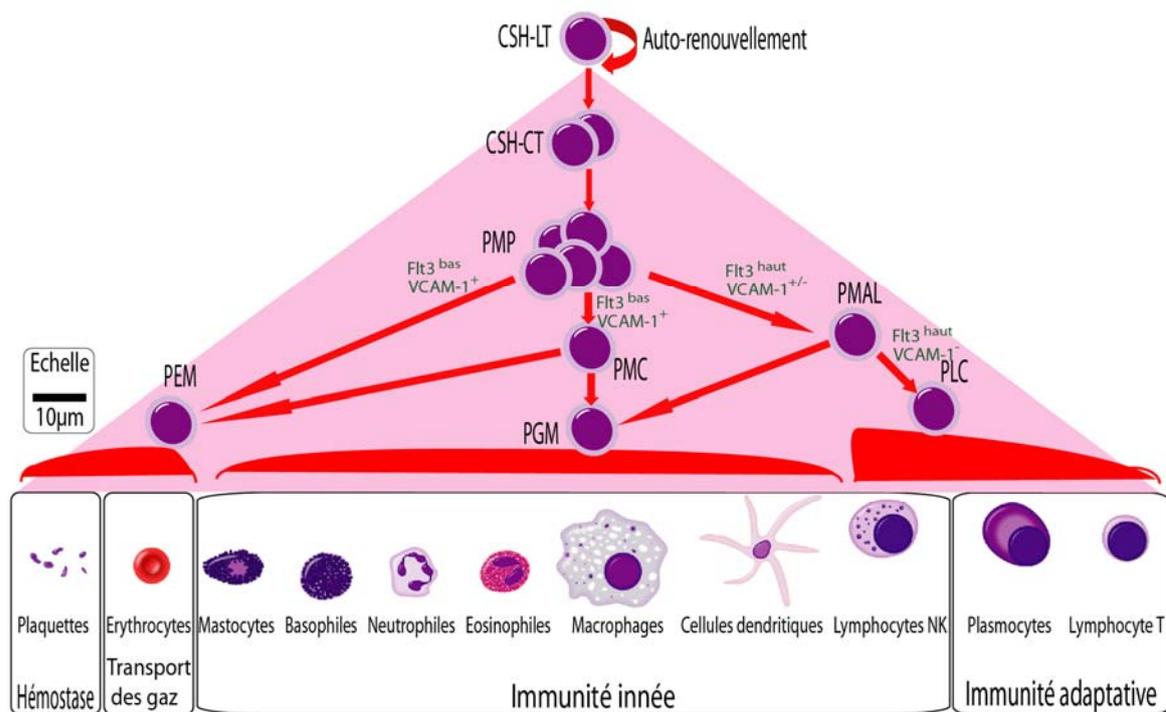


Figure 3 : Modèle révisé de l'hématopoïèse. Schéma reprenant les populations représentées dans la figure 2. Représentation de la population PMAL. La plasticité de différenciation est symbolisée par les flèches rouges.

Au lieu d'une dichotomie entre les lignées myéloïde et lymphoïde dès les premiers stades du développement hématopoïétique, ce modèle révisé avance la notion d'une ségrégation précoce de l'option de différenciation des PMP vers la lignée érythro-mégacaryocytaire et les autres lignées. Les facteurs de transcription PU.1 et GATA1 semblent jouer un rôle fondamental dans cette propriété. Il a été démontré que ces deux facteurs ont des rôles antagonistes dans la régulation des gènes de l'érythropoïèse et de la myélopoïèse (Nerlov et al., 2000; Zhang et al., 1999). Divers travaux soutiennent l'hypothèse d'un rôle de la balance d'activité de ces deux facteurs de transcription dans les choix de différenciation des PMP. Ainsi, l'analyse de souris *Mi-2β^{-/-}*, facteur de remodelage de la chromatine, suggère que des régulations épigénétiques influencent l'orientation des PMP vers l'une ou l'autre des lignées (Yoshida et al., 2008). En effet, l'absence de *Mi-2β* perturbe le compartiment des CSH et provoque un accroissement de la production d'érythrocytes, au dépend des cellules des autres lignées. La possibilité d'une interaction physique entre GATA1 et Mi-2β pourrait expliquer ce phénotype (Rodriguez et al., 2005). En outre, Mi-2β peut interagir avec Ikaros pour réprimer le potentiel érythroïde et promouvoir le développement du compartiment PMAL (O'Neill et al., 2000; Yoshida et al., 2006). Enfin, le facteur de transcription à hélice-

boucle-hélice E2A participe également à la détermination du développement des CSH en les orientant vers le compartiment PMAL (Dias et al., 2008). PU.1, GATA1, Mi-2 β , Ikaros et E2A apparaissent donc impliqués dans la détermination des voies de différenciation des CSH et des PMP. Le modèle révisé de l'hématopoïèse propose l'existence d'un progéniteur commun aux lignées de l'immunité innée et adaptative. Un diagramme radial décrit bien ce principe révisé de l'hématopoïèse en soulignant la restriction de potentiel de différenciation avec l'avancée en différenciation (**figure 4 (A)**).

B. Les facteurs de transcription dans le choix des spécialisations

Les profils d'expression des facteurs de transcription majeurs de l'hématopoïèse conditionnent l'articulation des mécanismes de maturation des différentes lignées. D'un point de vue moléculaire, la restriction de potentiel de différenciation en lignées spécialisées est conditionnée par l'induction de gènes spécifiques d'une lignée. Ces processus ont été étudiés de manière approfondie dans la différenciation des lymphocytes B qui sera développée ici à titre d'exemple. Dans cette lignée, l'orientation développementale en cellule B est initiée au sein des PMAL par l'induction de l'expression des gènes *Rag1/Rag2* et *Dntt* (gène codant la désoxyribonucléotidyl transferase ; TdT) (Igarashi et al., 2002; Medina et al., 2001) par les facteurs de transcription Ikaros et E2A (Dias et al., 2008; Reynaud et al., 2008; Yoshida et al., 2006). L'induction de gènes spécifiques de la lignée B qui apparaît en aval des PMAL engendre une répression progressive des gènes des autres lignées. D'après ce processus, l'engagement en différenciation B se fait tout autant de manières active et passive, les cellules au stade PMAL conservant encore un potentiel de différenciation en granulocytes ou en macrophages (Hardy et al., 2007). Sur un plan moléculaire, la restriction du potentiel de différenciation vers d'autres lignées semble requérir l'activité séquentielle ou coopérante des facteurs de transcription tels qu'Ikaros, E2A, EBF1 ou Pax5 (Dias et al., 2008; Nutt et al., 1999; Pongubala et al., 2008; Reynaud et al., 2008). Cette orientation progressive vers la lignée B se poursuit jusqu'au stade pro-B où une boucle de régulation positive entre Ebf1 et Pax5 consolide l'identité B (Pongubala et al., 2008). De manière analogue, ce processus se produit au cours de la différenciation des neutrophiles et des macrophages, contrôlé aux stades les plus précoces respectivement par PU1 et C/EBP α (Laslo et al., 2006).

C. Principes moléculaires de l'hématopoïèse

Les paramètres quantitatifs des profils d'expression des facteurs de transcription majeurs de l'hématopoïèse ont un impact déterminant dans la régulation de l'hématopoïèse. La concentration ou le niveau d'activité de ces gènes a un rôle prépondérant dans l'entrée des cellules dans un programme de différenciation donné. Par exemple, des différences de niveau d'expression de PU.1 ont été associées à l'engagement du programme de spécialisation des PMAL en macrophages ou en lymphocytes B. Une faible concentration de PU.1 induit une différenciation en lymphocytes B, alors qu'une concentration 4-5 fois supérieure oriente les PMAL vers une différenciation en macrophages et bloque activement la différenciation B (DeKoter and Singh, 2000). De la même façon, dans la lignée B, la coordination de la commutation de classe isotypique de l'immunoglobuline lors de la différenciation plasmocytaire est contrôlée par la cinétique d'accumulation et le niveau d'expression du facteur de transcription IRF-4 (Sciammas et al., 2006). Les bases moléculaires de tels mécanismes, impliquant les niveaux d'expression et d'activité de facteurs de transcription, restent encore mal décrites aujourd'hui. Il apparaît cependant que la conjugaison des paramètres qualitatifs (profils d'expression des gènes majeurs de la différenciation) et quantitatifs (niveaux d'expression relatifs de ces facteurs) soit au cœur des mécanismes de détermination des options de différenciation.

Comme évoqué précédemment, les cellules multi-potentes expriment à un faible niveau et simultanément des gènes associés à différentes lignées (Hu et al., 1997; Miyamoto et al., 2002). Afin de s'engager dans un programme de différenciation, les cellules multi-potentes doivent donc sur-activer des gènes spécifiques d'une lignée et dans le même temps réprimer ceux spécifiques des autres options de différenciation. Ceci suggère que certains facteurs de transcription auront la capacité d'induire l'expression d'un panel de gène poussant les cellules vers une spécialisation, et dans le même temps de réprimer les gènes spécifiques des autres lignées. Plusieurs de ces régulateurs majeurs, tels PU.1 et GATA1 évoqués plus haut, ont été identifiés comme ayant ce double rôle. La différenciation d'une cellule multi-potente vers une spécialisation est associée à l'expression séquentielle de quelques gènes cruciaux qui pilotent, par activation et par répression, l'ensemble des gènes nécessaires à l'acquisition des éléments fonctionnels de la cellule en maturation. Ces « masters » gènes restreignent dans le même temps la possibilité des cellules de se détourner de leur destinée d'origine (**figure 4(B)**).

(A)

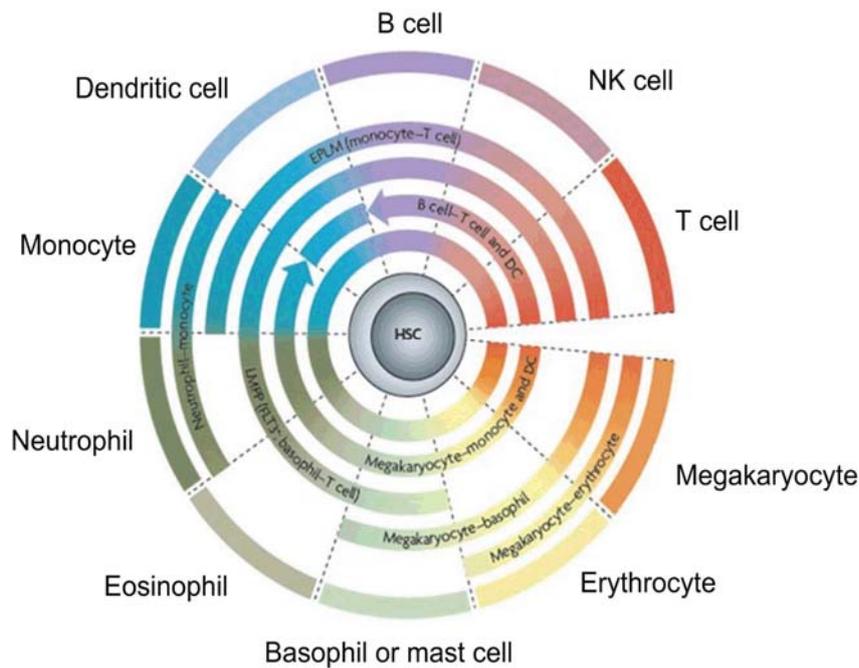
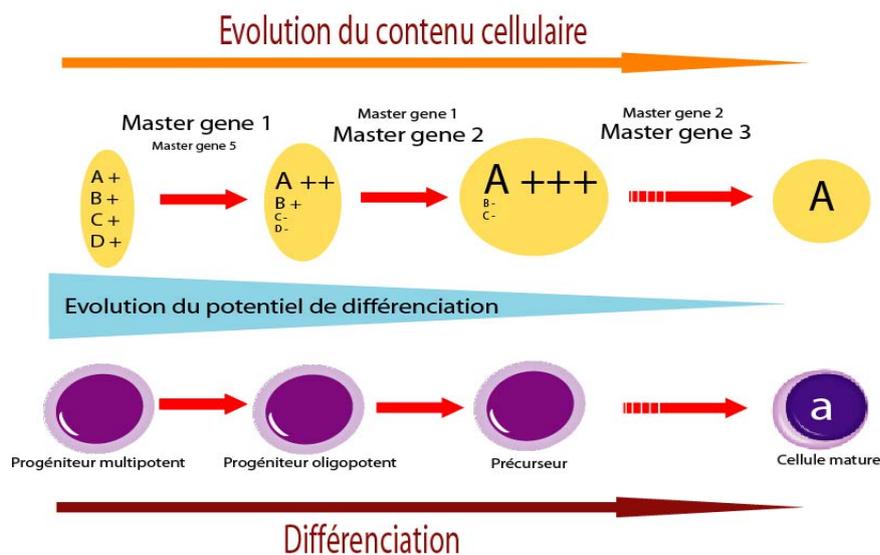


Figure 4 : (A) Principe de continuum de l'hématopoïèse. Ce schéma radial montre la restriction progressive de potentiel concomitante à l'avancée en différenciation. Les progéniteurs et leurs potentiels de différenciation sont représentés comme des arcs de cercle. L'avancée en différenciation est représentée par un éloignement du centre du cercle symbolisant la HSC (=CSH). Les flèches représentent la capacité des cellules dendritiques de se différencier à partir de progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes (Brown et al., 2010).



(B) Schéma de principe de la différenciation hématopoïétique. A, B, C et D représentent des profils d'expression d'éléments caractéristiques de 4 lignées différentes, correspondant à la capacité des cellules de se différencier en a, b, c ou d (cellules matures). Les masters gènes sont des facteurs de transcriptions cruciaux dans l'orientation de la différenciation. En bleu est symbolisée la restriction du potentiel de différenciation vers plusieurs lignées. En bas est schématisé l'avancement

de différenciation correspondant à l'acquisition progressive de caractères propres à la lignée A. Le master gène 1 (MG1) est plus actif que le master gène 5 (MG5) à la première étape décrite ici. MG1 va promouvoir le profil d'expression correspondant à la lignée A et réprimer les profils C et D. Au stade suivant, l'activité de MG1 va diminuer et celle de MG2 va prendre le relais. MG2 va ainsi pousser encore l'activation du profil A, réprimer le profil B, maintenir le blocage du profil C, et supprimer le profil D. Le MG3 va s'activer au stade suivant et permettre l'acquisition d'un phénotype A mature tout en maintenant le blocage des autres phénotypes encore accessibles. Les notions d'action coordonnée et séquentielle des différents masters gènes sont représentées par la présence de deux master gènes lors des transitions entre les stades, la taille de la police reflétant leur niveau d'activité. L'acquisition progressive d'un phénotype par activation d'un panel de gènes spécifiques d'une lignée et inhibition des autres sont représentées par l'augmentation de police du panel de gène A et la diminution de celles des autres au fur et à mesure de l'avancement en différenciation. Les éléments constitutifs des profils d'expression A, B, C et D ne sont pas exclusifs à chacun de ces profils (des gènes correspondants au profil A peuvent appartenir également au profil B par exemple). Les niveaux d'expression et la combinaison d'expression des masters gènes, mais aussi de gènes importants dans l'acquisition des phénotypes, apparaissent régir le choix des options de différenciation.

D. Autres éléments déterminants de l'hématopoïèse

L'activité des masters gènes s'inscrit dans un contexte cellulaire complexe faisant intervenir plusieurs modes de régulation. Ces masters gènes sont à la fois des inducteurs et des cibles de ces mécanismes.

1. Les Micro-ARNs

Les miRNAs sont une classe d'ARNs non codants dont les fonctions les mieux connues sont de contrôler les quantités d'ARNm cibles au niveau de leur transcription, de leur stabilisation ou de leur traduction. Ils constituent ainsi un mode de régulation rapide et simultané sur des pans entiers de gènes lors de l'entrée en différenciation des cellules (Bartel, 2004; Fazi and Nervi, 2008). Les miARNs ont été montrés comme particulièrement importants dans l'érythropoïèse, la myélopoïèse et la lymphopoïèse B (Bousquet et al., 2008; Felli et al., 2005; Fontana et al., 2007; Ventura et al., 2008). Des facteurs de transcription spécifiques des lignées régulent l'expression de miARNs, qui vont à leur tour réguler des ARNm codant des facteurs de transcription majeurs dans la différenciation. Ceci établit un réseau de régulation de contrôles positif et négatif entre ces deux classes de molécules régulatrices. Il apparaît ainsi que les mécanismes de régulation des miARNs peuvent être superposés aux boucles de contrôle réciproques entre les facteurs de transcription cruciaux que nous avons évoqués précédemment. Ce mode de régulation semble agir très finement sur le niveau d'expression des masters gènes conditionnant la différenciation vers les diverses lignées.

2. Les modifications intra cellulaires

Les modifications épigénétiques jouent un rôle central dans l'activation et la répression de groupes de gènes impliqués dans les programmes de différenciation. L'importance de Mi-2 β que nous avons présenté illustre bien cette assertion. Ce mode de régulation inclut la méthylation de l'ADN et toute une série de modifications covalentes des histones (Rice et al., 2007). Plusieurs études ont montré la capacité qu'ont des masters gènes à recruter différents complexes de modification des histones. De tels mécanismes ont été associés à GATA1 dans l'érythropoïèse (Letting et al., 2003) ou PU.1 dans la myélopoïèse (Stopka et al., 2005). De plus, de nombreux régulateurs transcriptionnels sont capables de recruter à la fois des facteurs activateurs et des facteurs répresseurs de la structure de la

chromatine. Les mécanismes conduisant au recrutement d'un complexe activateur plutôt que répresseur par un même facteur de transcription à un locus donné ne sont pas connus à ce jour.

3. Les signaux extracellulaires

Au sein de la moelle osseuse, les cellules hématopoïétiques en cours de développement interagissent avec des microenvironnements variés, tant par la nature des cellules stromales que par les espèces cytokiniques rencontrées.

La régulation de l'hématopoïèse est associée à de nombreux signaux extracellulaires. La nécessité des cytokines dans la régulation de l'hématopoïèse est avérée depuis de nombreuses années (**figure 5**). Comme pour les facteurs de transcription, il apparaît notable que les facteurs solubles agissent en combinaison pour déterminer la spécialisation ou entrainer la prolifération d'un type cellulaire. Les facteurs constituant ces combinaisons et leurs dosages relatifs apparaissent tout aussi importants que celles des facteurs de transcription dans le déroulement de l'hématopoïèse. Ceci paraît d'autant plus vrai que les cytokines peuvent réguler l'expression et le niveau d'expression des masters gènes de la différenciation (Dahl et al., 2003). Ces masters gènes semblent à leur tour capables de réguler le niveau d'expression des récepteurs aux différentes cytokines, ce qui crée des boucles de renforcement des processus de différenciation.

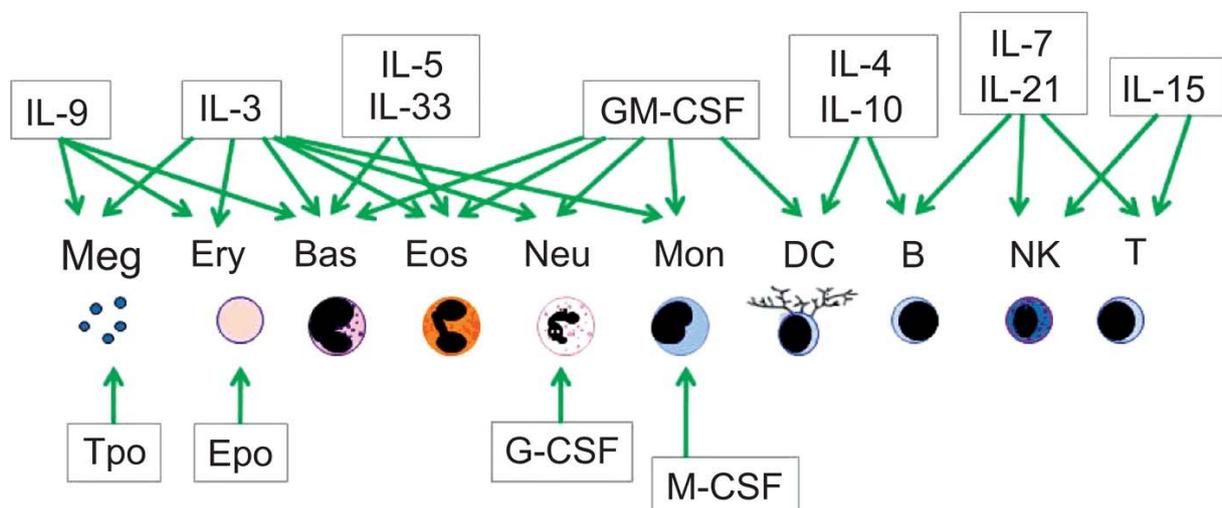


Figure 5 : Utilisation des cytokines et facteurs de croissance au cours de la spécialisation des différentes lignées. Ce schéma souligne la diversité des signaux reçus et intégrés par les cellules au cours de leur développement. Les flèches vertes indiquent que les facteurs solubles représentés ici sont impliqués dans les mécanismes de différenciation et/ou de prolifération des lignées désignées (Brown et al., 2010).

Une différence semble exister entre les cytokines myéloïdes et les cytokines lymphoïdes. Les récepteurs aux cytokines myéloïdes (GM-CSF, G-CSF et M-CSF)

n'apparaissent pas indispensables pour la différenciation myéloïde (Hibbs et al., 2007), bien qu'ils aient un rôle important dans le contrôle de la prolifération de ces progéniteurs durant l'hématopoïèse normale. Au contraire, les récepteurs aux cytokines lymphoïdes (Flt3 et IL-7) apparaissent indispensables au maintien du potentiel de différenciation des cellules dans la lignée B (Sitnicka et al., 2003). Dans le développement B, la nature de la signalisation Flt3 reste à préciser. Les voies de signalisation activées par l'IL-7R sont bien décrites et conduisent à l'induction de l'expression du gène *Ebfl*, facteur déterminant dans le processus d'acquisition de l'identité B (Roessler et al., 2007). L'IL-7 active la différenciation *via* son récepteur, mais également la prolifération et le réarrangement du locus des *IgH* dans les cellules pro-B. Plus tard dans la différenciation B, le signal IL-7R doit être atténué pour permettre les réarrangements du locus des *IgL* (Johnson et al., 2008). La modulation du signal induit par l'IL-7 semble être régulée par un changement des niveaux d'expression de récepteurs aux chemokines, permettant aux cellules B de s'éloigner des cellules stromales productrices d'IL-7 (Nagasawa, 2006). Les voies de signalisation associées à l'IL-7 dans le développement B illustrent bien comment l'ensemble des signaux extracellulaires (cytokines, chemokines, molécules d'adhésion) et intracellulaires (facteurs de transcription) coopèrent pour l'accomplissement de la différenciation lymphocytaire.

En plus des facteurs solubles, les cellules hématopoïétiques rencontrent différents types de cellules stromales qui conditionneront également les mécanismes de développement et de prolifération. Les niches hématopoïétiques sont des structures spatiales ou des concentrations de types cellulaires déterminés fournissant aux cellules hématopoïétiques un microenvironnement favorable à leur développement. Le concept de niches a bien été décrit par leur implication dans les propriétés d'auto-renouvellement des CSH (Martinez-Agosto et al., 2007). Le rôle des ostéoblastes dans la constitution de ces niches apparaît essentiel, tant par leur expression de molécules d'adhésion comme la N-cadhérine et VCAM-1 (Rafii et al., 1997; Zhang and Li, 2008), que par leur capacité à sécréter des facteurs solubles tels que l'angiopoïétine et Jagged-1 (associés à la quiescence et au blocage de différenciation des CSH respectivement) (Arai et al., 2004; Calvi et al., 2003). Les cellules souches ou progénitrices hématopoïétiques placées dans des niches reçoivent les différents stimuli nécessaires à leur développement (Arai and Suda, 2007; Espeli et al., 2009; Heissig et al., 2005; Morrison and Spradling, 2008; Nagasawa, 2006; Tokoyoda et al., 2004). Des niches de nature variée existent au sein de la moelle osseuse et sont associées au développement de différents stades cellulaires de diverses lignées. Ainsi, le groupe de Nagasawa a démontré l'existence de niches

spécialisées dans le support de plusieurs stades du développement B (Tokoyoda et al., 2004). Ces travaux décrivent que des cellules stromales sécrétrices de CXCL12 forment le microenvironnement favorable au développement des cellules pré-pro-B. Les cellules pro-B ont été retrouvées dans des niches différentes, composées de cellules stromales sécrétant de l'IL-7. La moelle osseuse contient donc une multitude de microenvironnements, chacun permettant le développement des différents sous-types cellulaires. La localisation des cellules dans la moelle osseuse semble être un mécanisme fondamental et initiateur dans le choix des options de différenciation.

II. La lymphopoïèse B

La production de lymphocytes B fonctionnels est nécessaire à la mise en place d'une protection immunitaire efficace. Sous leur forme mature, ces cellules vont exprimer une large variété d'anticorps membranaires (BCR). Chaque BCR est capable de reconnaître des déterminants antigéniques particuliers. L'activation du BCR par son antigène va engendrer une réponse immunitaire adaptée qui consistera en la sécrétion massive d'anticorps solubles, tous identiques au BCR activé et spécifiques de l'antigène incriminé. Ces anticorps vont permettre la destruction de la cible identifiée par l'antigène en trois étapes : liaison à l'antigène (opsonisation); activation du système du complément ; recrutement de cellules de l'immunité innée. Ils sont associés à la réponse immunitaire à médiation humorale.

A. Vue d'ensemble des différentes étapes de différenciation

Vers la différenciation B

La différenciation des CSH en lymphocytes B est un processus multi-étape passant par plusieurs stades (Nutt and Kee, 2007). Les premières cellules issues des CSH sont les PMP qui ont perdu la propriété d'auto-renouvellement mais qui ont conservé celle de se différencier dans l'ensemble des lignées hématopoïétiques (Adolfsson et al., 2001). Une certaine sous-population de PMP qui surexprime *Flt3* va former les PMAL décrits précédemment (Adolfsson et al., 2005). Cette population de PMAL contient une population de progéniteurs lymphoïdes précoces (PLP) dont l'identité lymphoïde est établie dans la mesure où ils expriment le gène rapporteur *gfp* sous la dépendance des éléments régulateurs de *Rag1* (Igarashi et al., 2002). Ces PLP se différencient ensuite en PLC qui n'ont qu'un potentiel de différenciation lymphoïde *in vivo* alors qu'ils conservent un potentiel myéloïde *in vitro* (Balciunaite et al., 2005; Kondo et al., 1997; Rumfelt et al., 2006). Au sein des PLP

existent différentes sous-populations, définies notamment en fonction de l'expression de Flt3. Il semblerait que les PLC Flt3⁻ représentent la fraction de PLC n'ayant comme seul potentiel que la différenciation B (Karsunky et al., 2008; Mansson et al., 2008). Récemment, l'identification du marqueur Ly6D a permis de diviser la population PLC en une sous-population de progéniteurs de toutes les lignées lymphoïdes (PTL, Ly6D⁻) et en une sous-population de progéniteurs lymphoïdes B (PLB, Ly6D⁺) (Inlay et al., 2009).

La différenciation lymphoïde B

Les premières cellules unanimement décrites comme spécifiques de la lignée B dans la moelle osseuse sont les lymphocytes pré-pro-B. Ces cellules sont identifiées par l'expression de Flt3, IL7R α et de B220 (marqueur pan-B). Elles ont subi le réarrangement D_H-J_H de la chaîne lourde des immunoglobulines et expriment un profil de gènes spécifique des lymphocytes B (Gounari et al., 2002; Rumfelt et al., 2006). En situation physiologique, ces cellules pré-pro-B vont devenir des lymphocytes B matures. Cependant, le succès de ce programme est conditionné par l'expression de *Pax5* dès le stade suivant, pro-B (Fuxa and Busslinger, 2007b). Le réarrangement correct du locus *IgH* au stade pro-B permet le passage au stade pré-B. Les cellules pré-B prolifèrent rapidement et initient la recombinaison V_L-J_L du locus *IgL* (Martensson et al., 2007). La bonne recombinaison du locus *IgL* permet ensuite aux cellules de progresser vers le stade de lymphocyte B immature et de sortir de la moelle osseuse (Rolink et al., 2004). Les lymphocytes B matures sont localisés dans les ganglions lymphatiques où ils persistent 5 à 7 semaines en restant quiescents. Cependant, leur stimulation par un antigène spécifique induit l'activité des mécanismes d'hyper-recombinaison somatique (SHM) et de commutation de classe isotypique (CSR). La stimulation antigénique s'accompagne ensuite d'une entrée en prolifération et de leur maturation en plasmocytes, cellules sécrétrices d'anticorps à durée de vie courte (quelques heures à quelques jours) (Ding and Chandirakumaran, 2005; Fairfax et al., 2008) (**figure 6**). Les lymphocytes B mémoires sont issus des cellules stimulées mais ne se différencient pas en plasmocytes. Ils ont une durée de vie très longue et servent à conserver une mémoire immunitaire qui pourra être rapidement réactivée si l'organisme est à nouveau confronté à la même stimulation antigénique.

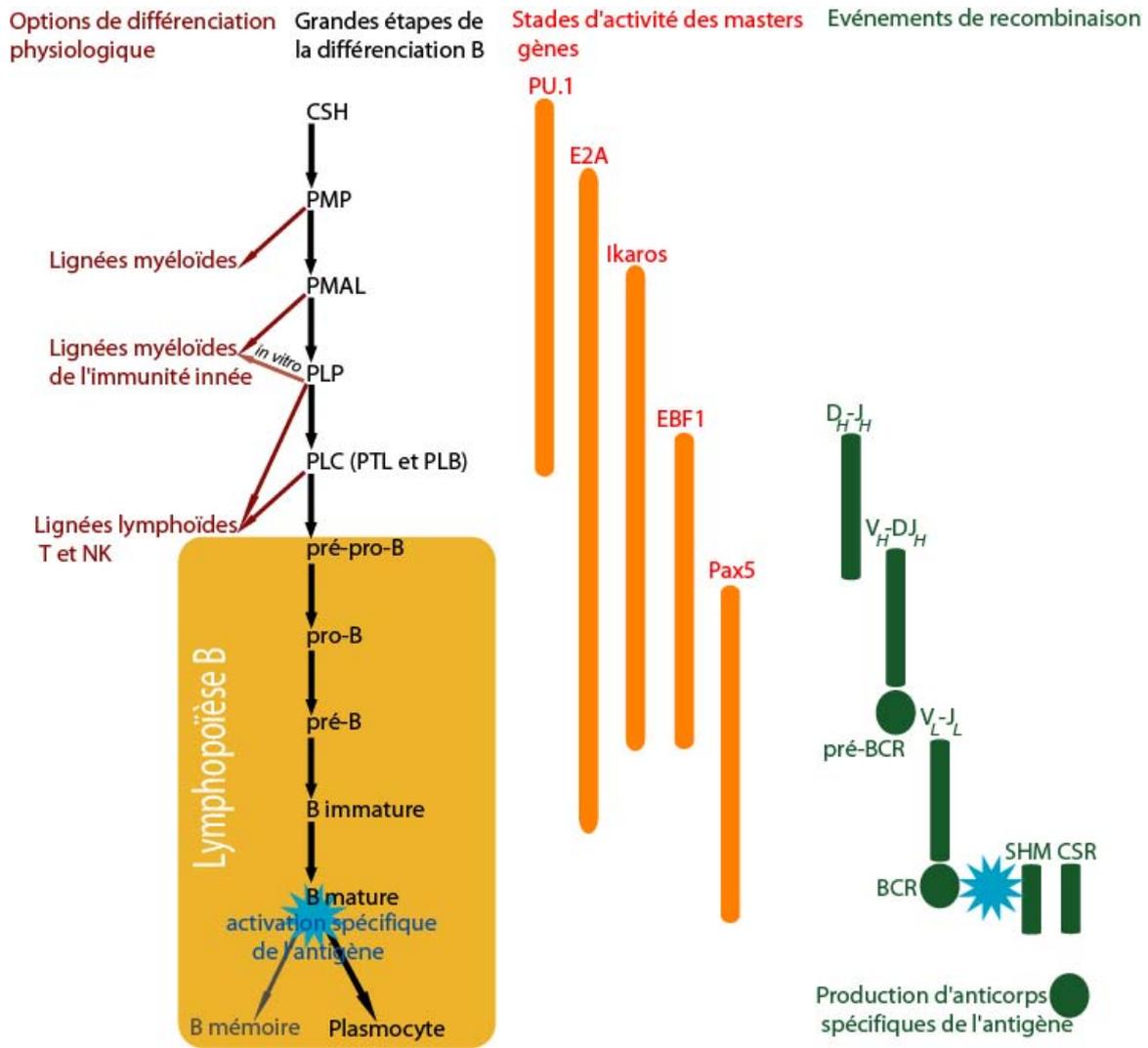


Figure 6 : Vue d'ensemble de la différenciation B dans les conditions physiologiques. La progression de la différenciation va de haut en bas. Les principaux stades sont figurés par leurs sigles. En rouge, à gauche sont notées les options de différenciation qui disparaissent au fur et à mesure de l'avancement de la maturation B. Les éléments à droite (en orange et vert) sont en vis-à-vis avec la progression de la différenciation (en noir). En orange à droite sont représentées les plages d'activité nécessaires des masters gènes évoqués dans ce paragraphe. Ces plages d'expression ne correspondent pas systématiquement à une activité indispensable des facteurs de transcription rattachés mais à leur présence. Cette représentation est uniquement qualitative. En vert à droite sont figurés les événements de recombinaison essentiels à l'acquisition des propriétés d'immunocompétence. Les rectangles arrondis représentent des événements sur l'ADN ; Les cercles représentent la production d'éléments fonctionnels associés aux événements de recombinaison de l'ADN. Pré-BCR : précurseur du récepteur des cellules B ; BCR : Récepteur des cellules B ; SHM : hyper-recombinaison somatique ; CSR : commutation de classe isotypique.

Les masters gènes de la différenciation lymphoïde B

PU.1 est nécessaire à la formation des PMAL et des PLC, mais son inactivation en aval de ces stades ne conduit pas à une modification notable du nombre ou de la qualité des lymphocytes B qui en découlent (Scott et al., 1994). E2A est également requis pour la différenciation des PMAL et PLC, mais est en plus nécessaire à la formation des cellules pré-pro-B, pro-B, pré-B et B immatures (Kwon et al., 2008). Outre ces implications dans les

stades précoces de l'ontogénie B, E2A apparaît jouer un rôle encore mal défini dans les cellules B activées. La perte d'*Ebf1* conduit à un blocage de la maturation entre les stades PLC et pré-pro-B (Lin and Grosschedl, 1995). La ré-expression transitoire d'*Ebf1* permet de passer ce cap et donc la formation de cellules pro-B n'exprimant plus *Ebf1*. Toutefois, ces pro-B ont des caractéristiques proches des pro-B *Pax5*^{-/-}, notamment une capacité à se différencier vers d'autres lignées. *Pax5* est requis pour la différenciation des cellules en aval du stade pro-B. Il est également indispensable au maintien de l'identité B tout au long de la lymphopoïèse, puis son expression s'éteint pour permettre la différenciation plasmocytaire (Nutt et al., 1999). Ikaros est requis pour la formation des PMAL et son absence induit une disparition du potentiel de différenciation B (Yoshida et al., 2006). L'induction d'une expression ectopique d'*Ebf1* peut rétablir la formation de cellules pro-B *Ikzf1*^{-/-} (gène codant Ikaros) (Reynaud et al., 2008), mais ces cellules garderont aussi un potentiel de différenciation vers d'autres lignées. En outre, les souris porteuses d'un allèle déficient d'*Ikzf1* présentent un défaut de la réponse à l'IL-7 entraînant un défaut de transition pro-B pré-B.

B. Les événements précoces de la différenciation B

1. La signalisation induite par les cytokines

Les cytokines sont sécrétées par les cellules du microenvironnement médullaire et conditionnent le développement de l'ensemble des lignées hématopoïétiques. Le contrôle de la nature de ces cytokines et de leurs concentrations à des échelles locales est une fonction fondamentale dans l'hématopoïèse. Les premières étapes du développement B sont intimement liées à l'activité de deux récepteurs aux cytokines : IL-7R et Flt3. Ces étapes sont aussi dépendantes de la bonne organisation d'un réseau de facteurs de transcription (master gènes) incluant PU.1, Ikaros, E2A, Ebf1 et Pax5 (Singh et al., 2005).

L'émergence des PLC à partir du compartiment PMAL est marquée par une expression croissante du récepteur à l'IL-7. Ce récepteur est composé d'un dimère associant une chaîne commune γ (IL2 γ) et une chaîne spécifique IL-7R α (IL7r). Alors que l'expression de l'IL-7R est un marqueur du stade des PLC, son activité n'est pas indispensable à la formation de ces cellules. Les souris déficientes pour l'IL-7R ou la chaîne IL-7R α présentent une diminution des deux tiers du nombre de PLC et non une disparition totale de cette population. L'effet le plus notable de l'absence de l'IL-7R est un profond défaut de capacité de formation des cellules pré-pro-B (Dias et al., 2005; Kikuchi et al., 2005). Il a été également

démontré que les souris présentant des anomalies de signal IL-7R et Flt3 conjuguées étaient totalement incapables de former des cellules de la lignée B (Sitnicka et al., 2002; Vosshenrich et al., 2003).

2. Les facteurs de transcription des stades précoces d'engagement vers la lignée B

a) Ikaros

Le gène *Ikzf1* code un facteur de transcription (Ikaros) à plusieurs motifs en doigts de zinc qui fonctionne soit comme activateur, soit comme répresseur transcriptionnel. Ce master gène apparaît indispensable à la résolution du profil d'expression multi-lignée des PMP (Yoshida et al., 2010). Les souris *Ikzf1*^{-/-} sont incapables de former des cellules de la lignée B. Un allèle hypomorphe d'*Ikzf1* a quant à lui un impact important sur la capacité des cellules à passer du stade pré-pro-B au stade pro-B et empêche les cellules pro-B de former des colonies *in vitro* sous la stimulation de l'IL-7 (Kirstetter et al., 2002). Les progéniteurs hématopoïétiques *Ikzf1*^{-/-} semblent avoir un compartiment PMAL quasiment absent. Cependant, par une expérience de traçage des cellules par la GFP sous la dépendance des éléments de régulation d'*Ikzf1*, il a été démontré que les PMAL se développent malgré sa délétion dans les souris *Ikzf1*^{-/-} (Yoshida et al., 2006). Dans ces souris, les PMAL perdent leur potentiel de différenciation vers la lignée B, phénotype associé aux baisses d'expression de l'IL-7R et de Rag1. Cette dernière observation suggère qu'Ikaros est impliqué dans les mécanismes de spécialisation B en aval des PMAL (Yoshida et al., 2006).

b) PU.1

PU.1 a un rôle majeur dans le choix de l'option de différenciation des PMAL en cellules B. Les souris *Sfp1*^{-/-} (gène codant PU.1) meurent en fin d'embryogénèse ou peu après la naissance, et n'ont ni de cellules myéloïdes, ni de lymphocytes B dans le foie, ni de cellules T dans le thymus. Ce phénotype suggère que l'absence de PU.1 bloque l'hématopoïèse au stade PMAL ou à un stade plus précoce (DeKoter et al., 2002; McKercher et al., 1996; Scott et al., 1994). D'autres travaux soulignent l'implication de PU.1 dans le développement des lymphocytes pro-B, notamment par son rôle dans la régulation de l'expression de *Il7r* et *Ebfl* (Medina et al., 2004). Cependant, il est apparu possible de dériver des lymphocytes B à partir de progéniteurs issus de foies fœtaux de souris *Sfp1*^{-/-}, mais à une fréquence plus faible et avec une cinétique plus lente que ceux produits à partir de progéniteurs de foie fœtaux de souris sauvages (Ye et al., 2005). PU.1 intervient donc dans le

choix des PMAL d'engagement dans la lignée B et dans les stades très précoces de la différenciation B.

L'hypothèse d'un rôle de PU.1 dans le devenir des PMAL est soutenue par des travaux ayant montré que son niveau d'expression détermine le choix d'engagement de ces cellules vers une différenciation en macrophages ou une différenciation lymphoïde B (DeKoter and Singh, 2000). PU.1 est en effet bien plus exprimé dans les PMAL formant les macrophages que dans ceux formant des lymphocytes B. Cette observation est en outre soulignée par deux articles relevant l'importante différence d'expression de PU.1 entre les macrophages et les lymphocytes B, pourtant issus d'une même population PMAL exprimant très fortement PU.1 (Arinobu et al., 2007; Nutt et al., 2005). L'étude de la fonction de PU.1 dans la lymphopoïèse adulte a montré que son inactivation conditionnelle perturbait profondément l'hématopoïèse, conduisant notamment à un excès de granulopoïèse (Dakic et al., 2005; Dakic et al., 2007). Les populations des PMAL et des PLC des souris adultes déficientes pour PU.1 sont incapables de participer à la lymphopoïèse dans des expériences de reconstitution compétitives avec des PMAL et PLC normaux. L'inactivation de PU.1 (par un système *Cre-Lox* où la recombinaison *Cre* est sous la dépendance du promoteur *CD19*) dans des PLC triés n'a pas d'impact sur la différenciation aux stades ultérieurs. Ces éléments réunis mettent en évidence un rôle majeur de PU.1 dans l'orientation développementale des progéniteurs vers la lignée B, mais ne lui confèrent aucun caractère essentiel dans la régulation et progression des étapes de différenciation B (Iwasaki et al., 2005; Polli et al., 2005; Ye et al., 2005).

c) E2A

E12 et E47 sont des protéines à domaines hélice-boucle-hélice (HBH) communément désignées E2A. Les protéines E2A sont essentielles à la lymphopoïèse B mais sont également requises dès les étapes de basculement des PMAL vers ce programme (Bain et al., 1997; Borghesi et al., 2005). E2A stimule l'expression de gènes du programme lymphoïde dans les PMAL et dans le même temps inhibe certains éléments spécifiques du programme myéloïde (Dias et al., 2008). Les PLC déficientes en E2A sont incapables d'initier les réarrangements du locus d'*IgH* du fait de leur incapacité à initier l'expression de *Rag1*. Ces cellules présentent des taux d'expression faibles d'*Ebfl* et de gènes B spécifiques, tels *Pax5*, *Cd79a* ou $\lambda 5$ (Zandi et al., 2008). Le développement d'un système d'inactivation conditionnelle de l'expression d'E2A a permis d'établir que son absence dans les cellules pré-pro-B, pro-B, pré-B, ou B immatures induit la disparition des populations cellulaires concernées (Kwon et al.,

2008). Ces résultats soulignent la nécessité d'analyser l'implication des facteurs de transcription tout au long de la différenciation B (Lazorchak et al., 2006). L'expression ectopique de *Pax5* dans des cellules n'exprimant pas *E2A* permet de rétablir la formation de lymphocytes pro-B, ce qui suggère que le rôle principal d'E2A en début de différenciation B est d'induire l'expression de *Pax5* (Kwon et al., 2008).

C. Les facteurs de transcription impliqués dans l'identité et la maturation B

1. Ebf1

Il apparaît évident, aux vues des éléments présentés plus tôt, que l'induction d'*Ebf1* est un événement central dans les mécanismes de spécialisation des cellules B. Les souris *Ebf1*^{-/-} ne sont capables ni d'exprimer *Cd79a*, *Cd79b*, $\lambda 5$ et *VpreB1*, ni de procéder à la recombinaison du locus *IgH* (Lin and Grosschedl, 1995), alors que sa surexpression dans des CSH les oriente vers la différenciation B (Zhang et al., 2003). Des travaux avancent qu'*Ebf1* est requis pour l'amorçage du programme d'expression B dans les PLC (Zandi et al., 2008). L'expression forcée d'*Ebf1* est également capable d'induire le réengagement dans le programme de différenciation lymphoïde B de PMP bloqués suite à la délétion de *E2A*, *IL-7R*, *Ikzf1* ou *PU.1* (Dias et al., 2005; Kikuchi et al., 2005; Medina et al., 2004; Reynaud et al., 2008; Seet et al., 2004). Ebf1 est donc un facteur indispensable à l'engagement des cellules dans la lignée B.

Différentes approches ont montré que l'expression d'*Ebf1* était dépendante de E2A et du signal induit par l'IL-7. En l'absence de signalisation associée à l'IL-7, des lymphocytes pré-pro-B sont générés mais ils expriment un faible taux d'*Ebf1* et sont incapables de conserver leur potentiel de différenciation vers des étapes B plus tardives (Kikuchi et al., 2008). *Ebf1* est régulé par deux promoteurs, un distal et un proximal. Son promoteur distal est régulé par E2A, STAT5 (facteur de transcription activé par la transduction du signal de l'IL-7R), et également par lui-même dans le cadre d'une boucle d'autorégulation. Son promoteur proximal est quant à lui allumé par Ets1, PU.1 et Pax5 (Roessler et al., 2007). L'induction de l'expression d'*Ebf1* consécutive à l'expression ectopique de *Pax5* dans des lymphocytes T démontre l'action régulatrice de Pax5 sur *Ebf1* (Fuxa et al., 2004). De plus, les cellules pro-B *Pax5*^{-/-} ont des taux d'ARNm d'*Ebf1* diminués (Pridans et al., 2008; Roessler et al., 2007; Schebesta et al., 2007). Ebf1 est aussi capable d'induire l'expression de *Pax5*. Ebf1 et Pax5 fonctionnent donc en partenariat dans une dynamique de renforcement positif de l'identité B.

2. Pax5

Pax5 a été décrit comme essentiel dans la différenciation B. Il est présent du stade pré-pro-B au stade B mature où son expression s'éteint pour permettre la différenciation terminale plasmocytaire (Fuxa and Busslinger, 2007a). En absence de *Pax5*, le développement s'arrête au stade pro-B précoce. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de certains gènes spécifiques de la lignée B et par le réarrangement D_H-J_H achevé (Nutt et al., 1998; Nutt et al., 1997). Les cellules pro-B *Pax5*^{-/-}, bien qu'incapables de poursuivre la différenciation B, peuvent être cultivées indéfiniment en présence d'IL-7 et de cellules stromales. Ces cellules ont également la propriété remarquable de pouvoir se réengager vers de multiples autres programmes de différenciation hématopoïétique (Nutt et al., 1999; Rolink et al., 1999; Schaniel et al., 2002a; Schaniel et al., 2002b). La suppression de *Pax5* dans des pro-B sauvage leur confère une plasticité de différenciation et empêche les cellules de progresser dans le programme B. La réexpression de *Pax5* dans ces lymphocytes pro-B *Pax5*^{-/-} rétabli le potentiel de maturation B et bloque à nouveau les capacités de reprogrammation vers d'autres types cellulaires (Mikkola et al., 2002) (**figure 7**).

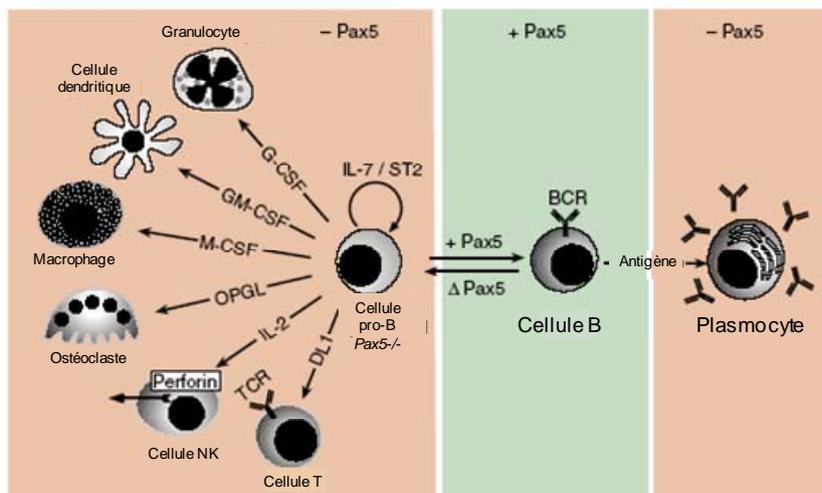


figure 7 : Illustration de l'importance de PAX5 dans la maintien de l'identité et la différenciation B. ST2 : Cellules stromales. G-CSF, GM-CSF, M-CSF, OPGL, IL-2, DL1 : cytokines nécessaires au développement des lignées associées (Cobaleda et al., 2007b).

La surexpression de *Pax5* dans des CSH n'a pas un impact aussi drastique que celle des facteurs *Ebfl* ou *Spfil* (Laios et al., 2006; Zhang et al., 2003). Sa surexpression dans les CSH *in vivo*, que ce soit par approche transgénique ou rétrovirale induit seulement un déséquilibre de production de lymphocytes B au détriment de la production de lymphocytes T (Cotta et al., 2003; Souabni et al., 2002). Sa surexpression *in vitro* dans des cellules myéloïdes

(Chiang and Monroe, 1999, 2001) ou dans des progéniteurs hématopoïétiques (Anderson et al., 2007) induit une suppression de certains récepteurs aux facteurs de croissance myéloïde et l'expression de gènes B spécifiques, mais pas de reprogrammation ou de différenciation de ces cellules vers la lignée B. Cependant, Pax5 est capable de forcer la différenciation lymphoïde de PMAL exprimant des récepteurs aux cytokines myéloïdes (Hsu et al., 2006).

Le caractère indispensable de Pax5 dans le maintien et la progression de la différenciation B est inhérent à ses propriétés régulatrices. Comme Pax5 peut à la fois activer ou réprimer ses gènes cibles (Nutt et al., 1998), il a initialement été avancé qu'il avait la fonction de réprimer les gènes spécifiques d'autres lignées et d'activer les gènes du développement B (Nutt et al., 1999). En accord avec cette théorie, les cellules *Pax5*^{-/-} expriment de nombreux gènes associés aux PMP ou à d'autres lignées hématopoïétiques (Delogu et al., 2006; Nutt et al., 1999; Pridans et al., 2008). Les gènes *M-CSF-R*, *Notch1*, respectivement facteurs spécifiques de la différenciation des macrophages et de la lignée T, sont directement réprimés par Pax5, ce qui peut expliquer la plasticité multi-lignage des lymphocytes pro-B *Pax5*^{-/-} (Souabni et al., 2002; Tagoh et al., 2006). Pax5 réprime également *Flt3*, récepteur à activité tyrosine kinase impliqué dans la physiologie des cellules précoces de l'hématopoïèse (Delogu et al., 2006; Holmes et al., 2006). Sachant que l'expression forcée de *Flt3* ou l'adjonction de Flt3 ligand au cours de l'hématopoïèse bloque totalement la différenciation B, cette répression apparaît cruciale pour permettre l'engagement du programme B (Ceredig et al., 2006; Holmes et al., 2006).

Des analyses pan transcriptomiques ont été menées pour identifier les cibles de Pax5 (Delogu et al., 2006; Pridans et al., 2008; Schebesta et al., 2007). Il est apparu que de nombreux gènes cibles régulés à la baisse par Pax5 sont normalement exprimés dans d'autres lignées. L'inactivation conditionnelle de *Pax5* à tous les stades où il est normalement exprimé conduit à la réexpression de ces gènes. Ce phénomène est partiellement observable lors de l'inhibition physiologique de l'expression de *Pax5* au cours de la différenciation plasmocytaire (Delogu et al., 2006; Kallies et al., 2007; Nera et al., 2006). Pax5 active de nombreux gènes spécifiques de la lignée B, notamment les éléments constitutifs du pré-BCR et de sa signalisation, comme *CD19*, *Blnk*, *CD79a* ou $\lambda 5$ (Cobaleda et al., 2007b). Pax5 induit également la transcription d'autres facteurs nécessaires à la maturation B, comme *Sp1B* (différenciation B tardive), *Aiolos* (inhibition de $\lambda 5$), *Lef1*, *IRF4* et *IRF8* (expression d'Ig κ) (Pridans et al., 2008; Schebesta et al., 2007). Ceci montre son rôle central dans l'orchestration du programme de différenciation B.

3. Ikaros

Des lymphocytes pro-B *Ikzf1*^{-/-}, produits suite à la surexpression ectopique d'*Ebf1*, présentent le marqueur CD19 et expriment des taux normaux de *Pax5* et d'*Ebf1*. Cependant, à l'instar des cellules pro-B *Pax5*^{-/-}, ces lymphocytes conservent la capacité de se différencier en macrophages (Reynaud et al., 2008). Ce résultat surprenant souligne que l'activité d'Ikaros est nécessaire, en association avec celles de Pax5 et d'Ebf1, pour verrouiller l'identité B.

4. Les autres facteurs de transcription importants dans la différenciation B

D'autres facteurs de transcription présentent un intérêt majeur pour la compréhension du développement B. Cependant leurs cibles ou leurs fonctions ne sont pas déterminées à ce jour. Parmi ces facteurs de transcription dits « orphelins » (Nutt and Kee, 2007), nous pouvons citer le facteur de promotion lymphoïde 1 (Lef1). Les souris *Lef1*^{-/-} présentent une diminution de moitié de la quantité de cellules pro-B. Ces cellules prolifèrent moins vite que les pro-B sauvages *in vivo* (Reya et al., 2000). Il semblerait que son activité soit dépendante de signaux extracellulaires reçus par les β -caténines, et soit liée à la transduction du signal associée à la voie Wnt (Staal and Clevers, 2005). Sox4 est aussi un facteur de transcription, de la même famille que Lef1, et est indispensable au développement embryonnaire de la lignée B (Schilham et al., 1996).

La protéine à doigt de zinc Bcl11a est importante au cours de l'ontogénie B. Des travaux de l'équipe de Neal Copeland ont montré qu'elle était capable d'interagir avec Bcl6, facteur majeur de la différenciation B tardive (Nakamura et al., 2000). Bcl11a semble aussi impliquée dans la différenciation lymphoïde précoce, bien que son importance ne soit pas encore bien établie dans l'engagement spécifique vers la lignée B (Liu et al., 2003). Il apparaît que son implication précoce puisse être plus forte dans la détermination du programme T que dans celle du programme B. En effet, des travaux récents ont montré que Bcl11b, structurellement très proche de Bcl11a, était essentielle à la progression et au maintien de l'identité lymphocytaire T (Li et al., 2010). Le facteur de transcription GABP est également critique pour la progression de la différenciation B, son défaut entraînant un blocage de maturation dès le stade pro-B (Xue et al., 2007).

D. Les mécanismes de maintien de l'identité B

Les travaux évoqués précédemment se concentrent sur les stades initiaux de l'engagement B. Le laboratoire de Meinrad Busslinger a créé une lignée de souris transgénique rendant possible la suppression de *Pax5*. L'induction de la délétion de *Pax5* dans des cellules pro-B en culture ont permis de montrer que ces cellules présentaient les mêmes caractéristiques que les lymphocytes pro-B *Pax5*^{-/-}. Ceci démontre que Pax5 exerce une pression permanente de maintien des dispositions cellulaires à la différenciation B et n'agit donc pas seulement ponctuellement pour faire maturer les cellules d'un stade à un autre (Mikkola et al., 2002). Restait à déterminer si la perte de Pax5 permet la trans-différenciation directe des cellules pro-B vers d'autres types cellulaires, ou si elle conduit les cellules à se dédifférencier en progéniteurs types PLC ou PMAL. Cette question a été résolue par des expériences d'inactivation de *Pax5* dans des lymphocytes B périphériques (Cobaleda et al., 2007a). Des lymphocytes B matures rendus *Pax5*^{-/-} (après induction de la suppression de *Pax5*) ont été injectés dans des souris *Rag1*^{-/-}, animaux présentant une absence de lymphocytes. Les cellules injectées ont été suivies et cette expérience a révélé l'apparition d'une population de lymphocytes pro-B *Pax5*^{-/-} (**figure 7**). Ce résultat suggère que des lymphocytes B matures ont subi une dédifférenciation. Sur un plan moléculaire, ces lymphocytes pro-B *Pax5*^{-/-} présentent des réarrangements aux loci *IgH* et *IgL*, ce qui lève tout doute quant à leur origine lymphocytaire B mature. Ces cellules pro-B dédifférenciées sont capables de générer des lymphocytes T et plus rarement des cellules myéloïdes chez les souris hôtes. Les lymphocytes T issus des pro-B sont fonctionnels dans la mesure où ils peuvent fournir une réponse immunitaire suite à une stimulation antigénique.

1. La différenciation terminale

Au cours du stade ultime de différenciation, le profil d'expression lymphocytaire B bascule littéralement vers un profil plasmocytaire très différent, tant sur un plan transcriptomique que phénotypique (Fairfax et al., 2008). Alors que l'expression de *Pax5* est essentielle au cours de l'ontogénie B, son expression s'éteint rapidement lors de la transition lympho-plasmocytaire. Cette extinction apparaît nécessaire dans la mesure où Pax5 réprime des gènes importants dans la physiologie des plasmocytes. Ces éléments sont par exemple les gènes *Xbp1* (Reimold et al., 1996) et la chaîne J (Rinkenberger et al., 1996), la forte expression d'*IgH*, et le master-gène du développement plasmocytaire : *Blimp1* (Nera et al., 2006). D'autres gènes réprimés par Pax5, car inappropriés au cours de la différenciation B, se

réexpriment à ce stade terminal (Delogu et al., 2006; Kallies et al., 2007) ; *CD28* et *CCR2*, semblent par exemple jouer un rôle dans le fonctionnement normal des plasmocytes. Ceci souligne à quel point l'arrêt du programme transcriptionnel de *Pax5* est essentiel à l'acquisition des fonctions plasmocytaires (Delogu et al., 2006).

E. Caractérisation phénotypique des stades de différenciation B

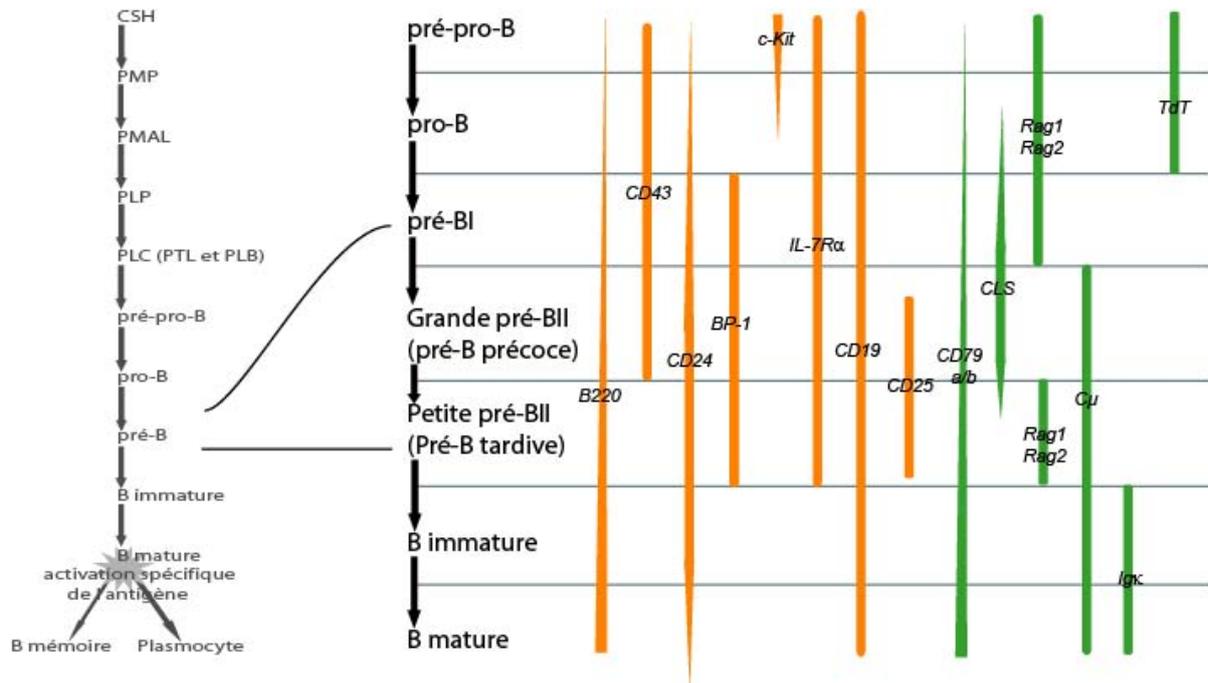


Figure 8 : Marqueurs phénotypiques de définition des stades de différenciation B. Définition des stades basée sur la classification d'Hardy (Hardy et al., 1991). En orange sont figurés les éléments reflétant l'identité B ou nécessaires à la physiologie des différents stades. En vert sont figurés les éléments associés à la mise en place du pré-BCR et du BCR. CLS : Chaines légères de substitution.

Les cellules engagées dans la lignée B, avant même qu'elles aient terminé la recombinaison du locus *IgH*, commencent à exprimer B220 (protéine transmembranaire à activité tyrosine phosphatase) et CD43 (sialophorine) (Hardy et al., 1991). Ces cellules B précoces peuvent être subdivisées sur la base de l'expression de deux marqueurs apparaissant successivement au cours de la différenciation : CD24 (HSA) et BP-1 (aminopeptidase A, metalloprotéase membranaire dépendante au zinc). Aux stades pré-B, l'expression de CD43 s'éteint progressivement et les lymphocytes peuvent être classés sur la base de l'expression ou non de la chaîne lourde (μ) et/ou de la chaîne légère (κ). Les cellules *Igκ* négatives peuvent être divisées sur le critère d'expression de *c-Kit* (CD117, récepteur membranaire au facteur de croissance des cellules souches), de la sous unité *IL-7Rα* (CD127), et de la sous unité *IL2Rα* (CD25) (Rolink et al., 1994). Les stades les plus précoces sont *c-Kit*⁺/*IL-7Rα*⁺, puis

l'expression de c-Kit disparaît progressivement et CD25 commence à s'exprimer. Le marquage de la protéine membranaire CD93, impliquée dans l'adhésion aux cellules du stroma médullaire, peut également s'avérer utile pour éviter de sélectionner des cellules non B lorsque l'on s'intéresse aux stades très précoces du développement lymphocytaire (Chevrier et al., 2009).

L'étude de la cinétique d'apparition des éléments constitutifs ou nécessaires à l'assemblage du pré-BCR et du BCR a également permis de caractériser les différents stades de l'ontogénie B. Ainsi, la désoxyribonucléotidyl-transférase terminale (TdT) est capable de modifier les segments J_H et est exprimé très précocement (Thai et al., 2002). Son rôle disparaît et son expression s'éteint lorsque les réarrangements $V_H D_H J_H$ du locus *IgH* sont terminés. Rag1 et Rag2 sont des recombinases nucléaires responsables des mécanismes de remaniement $V(D)J$, et s'expriment dès le stade PLC. Leur expression disparaît après la génération de la chaîne μ et lors du passage du point de contrôle du pré-BCR, puis elles réapparaissent plus tardivement afin d'assurer la recombinaison des fragments V_L-J_L des chaînes légères (Tonegawa, 1983). L'apparition des chaînes légères de substitution (CLS, $\lambda 5$ et VpreB, indispensables à la construction du pré-BCR) et des corécepteurs CD79a et CD79b (qui forment un hétérodimère associé au pré-BCR puis au BCR) sont d'autres éléments susceptibles d'aider à déterminer les stades des différentes cellules (Reth, 1992).

F. Les points de contrôle de la différenciation B

Comme évoqué dans le paragraphe précédent, le développement B peut être subdivisé en différentes étapes basées sur la présence de marqueurs intra et extracellulaires, et sur le profil des réarrangements *IgH* et *IgL* (*Ig κ* et *Ig λ*). Le franchissement de certains stades est conditionné par la capacité des cellules à produire des éléments fonctionnels et ne présentant aucun danger pour l'organisme. En particulier, la mise en place du pré-BCR et du BCR sont des processus critiques pour la cellule B dans la mesure où l'auto-réactivité, c'est-à-dire l'activation de ces récepteurs par des antigènes du soi, constituerait un danger majeur d'apparition de pathologies auto-immunes.

1. Le point de contrôle pré-BCR

Le pré-BCR a la structure d'un anticorps membranaire, constitué de l'assemblage de chaînes lourdes et de chaînes légères de substitution. Les chaînes légères de substitution sont $\lambda 5$ et VpreB et présentent des homologies avec les chaînes légères du BCR (Bauer et al.,

1988; Hollis et al., 1989; Kudo and Melchers, 1987; Sakaguchi and Melchers, 1986). Il est aujourd'hui bien démontré que le pré-BCR est essentiel au développement normal des cellules B, et que ses mutations peuvent être associées à l'apparition de cancers, d'immunodéficiences voire même de maladies auto-immunes (Conley and Burrows, 2010; Flemming et al., 2003; Pearl et al., 1978). La construction du pré-BCR est une étape de maturation du BCR, lequel sera un anticorps membranaire déterminant la spécificité de réponse antigénique. La diversité de reconnaissance antigénique est une fonction majeure inhérente aux lymphocytes B. Ce pré-BCR est constitué d'une paire identique de chaînes lourde et légères et présente une région constante et une région variable. Les régions variables sont composées de l'association de 3 segments dont la diversité est responsable du large éventail de reconnaissance antigénique. Cette hyper variabilité est déterminée au niveau de l'ADN par le processus de recombinaison $V(D)J$ consistant en l'assemblage des fragments *Variable* (V), *Diversity* (D) et *Joining* (J) (Tonegawa, 1983). Cet assemblage sera assuré par l'activité des recombinases Rag1 et Rag2. Rag1 reconnaît des séquences signal de recombinaison (RSS). Ces séquences sont des motifs de 7 ou 9 bases séparées par des séquences d'espacement de 12 ou 23 nucléotides. (Akira et al., 1987; Tonegawa, 1983). Rag1 va se fixer sur ces sites puis recruter Rag2 pour former le complexe à activité recombinase qui permettra d'effectuer les cassures double brins nécessaires à la juxtaposition des segments V_H , D_H et J_H (Fugmann et al., 2000) (le même processus a lieu lors des recombinaisons V_L-J_L). Le locus IgH chez la souris contient plus de 100 segments V , plus de 10 segments D , et 4 segments J , ce qui conduit (en comptant la diversité des chaînes légères qui seront produites au stade B immature) à plus de 10^{12} combinaisons possibles (Johnston et al., 2006). La région constante $C\mu$ est commune à toutes les combinaisons d'assemblage du locus IgH (**figure 9**). Les recombinases Rag1 et Rag2, à travers la reconnaissance de motifs bordant chaque segment, sont indispensables à l'association des différents segments entre eux (Oettinger et al., 1990; Schatz et al., 1989).

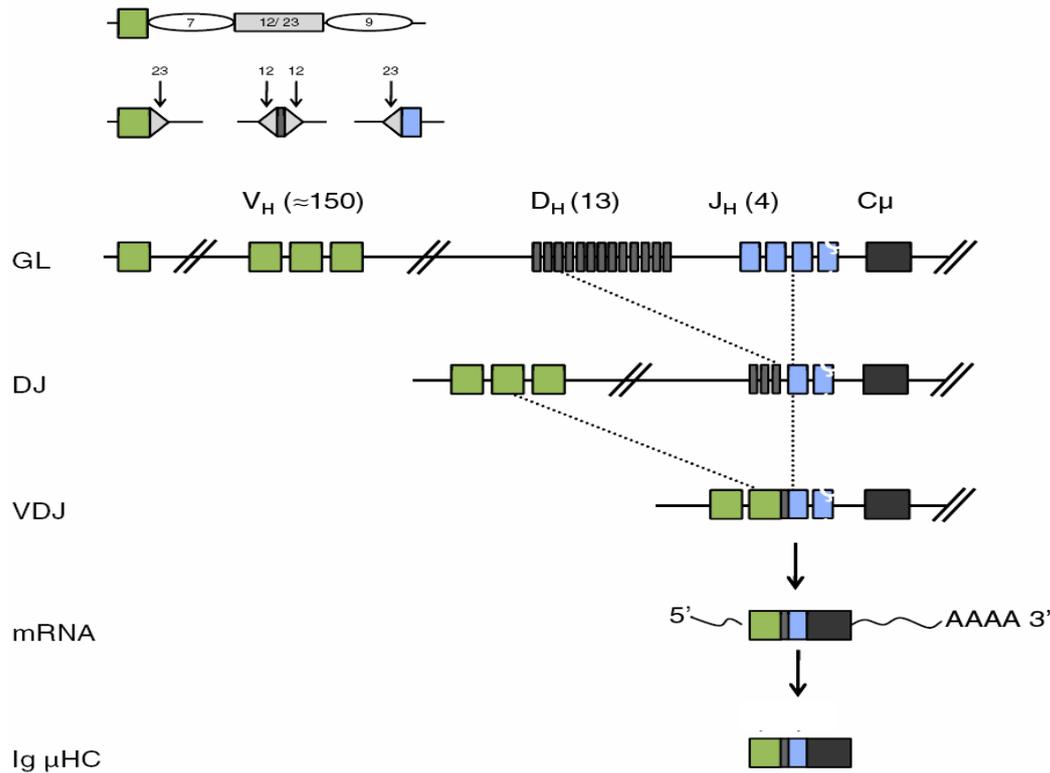


Figure 9 : Figure de principe des recombinaisons $V_H D_H J_H$. En haut, structure des séquences RSS séparant les différents segments. En vert est figuré un segment V, le 7 est la première séquence RSS de 7nt, 12/23 symbolise la séquence d'espacement, le 9 la seconde séquence RSS). Vert : segments V ; Gris : segments D ; Bleu : segments J. C_μ : Séquence constante. GL : configuration germinale, c'est-à-dire structure du locus IgH avant tout événement de recombinaison (Martensson et al., 2010). Ig μ HC : gène recombiné de la chaîne lourde μ des immunoglobulines.

Le locus IgH des cellules souches hématopoïétiques présente une configuration germinale, contrairement aux cellules pro-B qui ont accompli la recombinaison D_H-J_H . Les cellules pré-BI accomplissent la recombinaison $V_H-D_H J_H$ et expriment les chaînes lourdes et les chaînes légères de substitution, ces éléments s'associant pour former le pré-BCR qui sera exprimé à la surface des cellules (Tsubata and Reth, 1990). Au côté du pré-BCR, Cd79a et Cd79b (I α et I β) sont exprimés et contribuent à l'adressage de la chaîne μ à la membrane (DeFranco, 1993) puis à la transduction du signal du pré-BCR et du BCR par l'activation des motifs ITAM (motif d'activation à base tyrosine des immunorécepteurs) (**figure 10**). Le pré-BCR continue de s'exprimer au stade grande pré-BII où les cellules prolifèrent très rapidement. Lorsque les cellules passent au stade petite pré-BII, elles arrêtent de proliférer, les chaînes légères de substitution ne sont plus détectables et les cellules entament le processus de recombinaison du locus IgL . La synthèse d'une chaîne légère (κ ou λ) permet l'assemblage du BCR. Par analogie avec le pré-BCR, le BCR a une structure d'anticorps ancré à la membrane et est associé avec Cd79a et Cd79b, c'est le stade B immature.

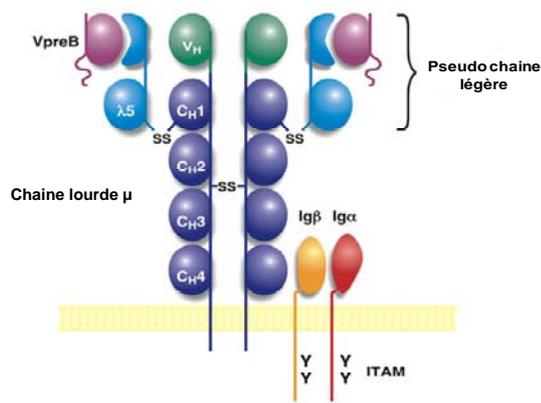


Figure 10 : Représentation schématique du pré-BCR. Chaque chaîne lourde contient 4 régions constantes (C_H1-4) et une région variable codées par l'assemblage des segments $V_H D_H J_H$. Chaque chaîne lourde est associée aux chaînes légères de substitution VpreB et $\lambda 5$ notamment grâce à un pont disulfure entre μ et $\lambda 5$. Chaque ensemble chaîne lourde+chaînes légères est associé à un ensemble identique par des ponts disulfures entre les chaînes lourdes. Ig α et Ig β sont associées en hétérodimère et assurent la transduction du signal par activation de leurs motifs ITAM (schéma de G.Galler).

Le point de contrôle pré-BCR se situe au passage des cellules entre le stade pré-BI et pré-BII. La nécessité d'un signal pour passer d'un stade à l'autre a été mise en évidence par des expériences d'inactivation des molécules transductrices du signal CD79 a et b (Ig α et β). Cette inactivation mène à l'arrêt des cellules en stade pré-BI (Pelandra et al., 2002). L'absence de la région transmembranaire codée par *IgH* conduit au même phénotype (Kitamura et al., 1991). L'absence des chaînes légères de substitution, $\lambda 5$, VpreB ou les deux ensemble, conduit également au blocage des cellules en pré-BI (Kitamura et al., 1992; Mundt et al., 2001; Shimizu et al., 2002). Cependant, dans ce dernier cas de figure le blocage n'est pas total et un nombre restreint de cellules est capable de poursuivre normalement sa spécialisation B. La capacité de passage des cellules du stade pré-BI à pré-BII est donc strictement dépendante de leur aptitude à exprimer une chaîne μH capable d'induire un signal intracellulaire (Galler et al., 2004; Su et al., 2003b).

Plusieurs mécanismes sont associés aux stades de mise en place du pré-BCR ou de ses constituants :

Le mécanisme d'exclusion allélique associé au pré-BCR permet l'expression de seulement un des deux allèles pour coder la chaîne μH . L'existence de cellules ayant subi la recombinaison $V_H D_H J_H$ sur un allèle et $D_H J_H$ sur l'autre suggère que ce mécanisme implique l'arrêt de la machinerie de recombinaison sur l'autre allèle suite à un signal dépendant de μH (Alt et al., 1984). Cependant, le pré-BCR complet ne semble pas indispensable à ce mécanisme dans la mesure où seule l'expression de μH suffit à induire une inhibition du complexe Rag1/Rag2 (Galler et al., 2004).

La sélection positive des chaînes μH est également liée à la structure du pré-BCR. Les chaînes μH sont en effet sélectionnées par leur capacité à se lier aux chaînes légères de substitution, ce qui préfigure leur capacité à se lier aux futures chaînes légères (Vettermann et

al., 2006). Cette sélection n'est cependant pas absolue, certaines chaînes légères sont capables de se lier aux chaînes lourdes pourtant incapables de se lier aux CLS. Exclure les cellules présentant des chaînes μ H incompatibles avec les CLS serait se priver d'un élargissement du répertoire antigénique. *A contrario*, la nature du domaine variable des chaînes μ H peut également être associée à des mécanismes de sélection négative (Keenan et al., 2008; Minegishi and Conley, 2001).

Lors du passage du stade pré-BI à pré-BII, le pré-BCR induit des signaux de prolifération. En dépit du fait que cette prolifération soit clonale, elle permettra d'accroître le répertoire immunitaire du fait de la production ultérieure par chaque cellule d'une chaîne légère originale. Le taux de pré-BCR à la surface semble être corrélé à la capacité de prolifération et de différenciation des cellules (Kawano et al., 2006). Le pré-BCR est capable de signalisation basale et de signalisation tonique, tonicité dépendante de son aptitude à se regrouper dans des patchs membranaires (Fuentes-Panana et al., 2004). Chez les souris déficientes en CLS, cette prolifération est sévèrement amoindrie, ce qui suggère que le pré-BCR dans son ensemble est requis pour cette étape (Martensson et al., 2007). En même temps qu'il induit la prolifération, le pré-BCR semble pouvoir induire sa propre sous-expression en abaissant le niveau d'expression des CLS par l'activation d'Aiolos (Parker et al., 2005). Ce mécanisme pourrait être associé à une sortie prévue du cycle cellulaire, étape nécessaire à la mise en place des phénomènes de recombinaison du locus *IgL* au stade B immature.

Le pré-BCR a donc un rôle essentiel dans le développement B, même s'il ne semble pas associé dans son intégrité aux phénomènes d'exclusion allélique. Il est requis pour les événements de sélections positive et négative, et apparaît indispensable au contrôle des mécanismes de prolifération associés au stade pré-B (**figure 11**).

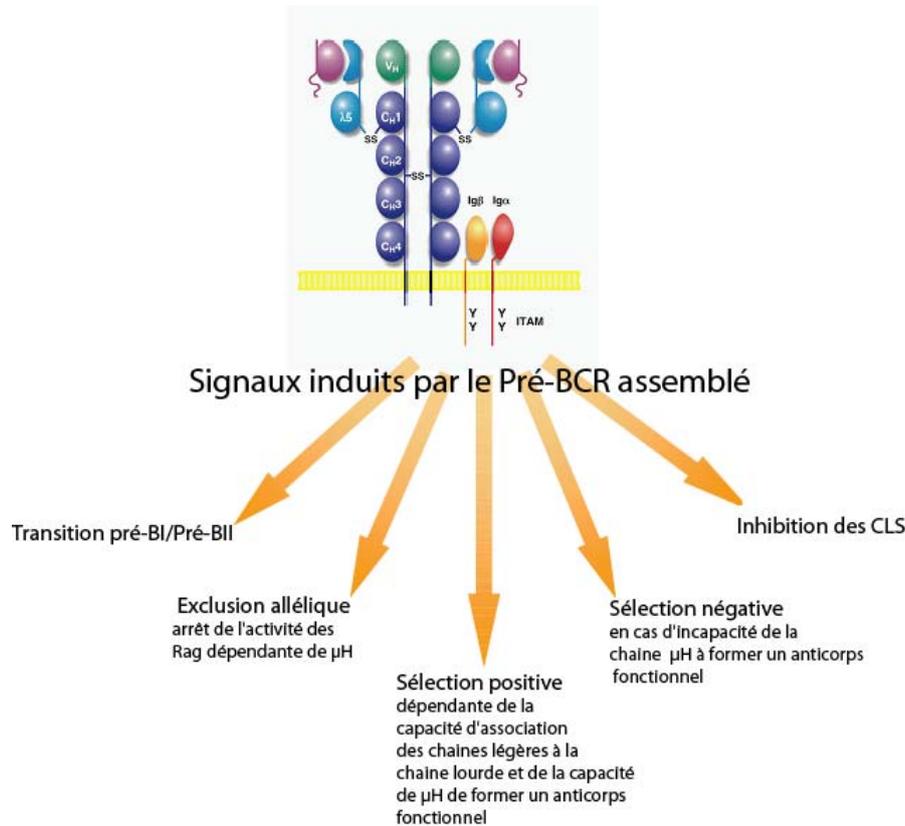


Figure 11 : Signaux essentiels au développement B associés à la structure du pré-BCR.

2. Le point de contrôle du BCR

Le point de contrôle du BCR constitue une autre étape majeure dans le développement de lymphocytes B fonctionnels. Très succinctement, au stade B immature, le BCR se constitue par association des chaînes légères réarrangées aux chaînes lourdes μ H précédemment formées. Il acquiert alors sa spécificité antigénique. Si ce BCR est auto-réactif, c'est-à-dire reconnaissant des antigènes du soi, il sera réédité par une nouvelle recombinaison du locus *Ig κ* (puis *Ig λ* si nécessaire) grâce à la réactivation des recombinaisons Rag. En cas d'échec de cette réédition à produire un BCR non auto-réactif, la cellule entrera en apoptose (Hartley et al., 1993) ou deviendra anergique (Goodnow et al., 1988). D'autres fonctionnalités du BCR sont critiques pour le passage de ce point de contrôle, comme leur capacité à fournir un signal d'intensité suffisante aux cellules (Tussiwand et al., 2009).

G. Les interactions avec les cellules stromales

Les interactions avec le microenvironnement médullaire apparaissent essentielles au développement B, notamment aux stades pré-BI et pré-BII. Comme évoqué précédemment,

l'activation du pré-BCR est un processus essentiel dans l'ontogénie B. Les cellules stromales entretiennent des interactions étroites avec les lymphocytes B en cours de développement, notamment à travers des mécanismes d'adhésions dépendants des molécules VCAM et VLA4 (Nagasawa, 2006). La signalisation du pré-BCR est à la fois constitutive et ligand induite. Des travaux du groupe de Claudine Schiff ont démontré l'existence d'une synapse de signalisation entre les cellules pré-B et les cellules stromales de la moelle osseuse. Cette synapse est dépendante de l'interaction directe GAL-1/ λ 5 et des interactions GAL-1/intégrines, éléments à la fois présents sur les cellules stromales et sur les cellules B (Espeli et al., 2009).

De plus, les cellules stromales secrètent des facteurs solubles impliqués dans le développement B, tels Flt3 ligand, IL-7, SCF ou encore SDF-1 (Roessler et al., 2007). Au cours de la différenciation, les interactions des lymphocytes B avec leur environnement varient. Les cellules engagées dans le programme B changent de niches au sein de la moelle osseuse, ce qui modifiera à la fois la nature des leurs interactions avec les cellules stromales et leur environnement cytokinique (Tokoyoda et al., 2004). Par exemple, la baisse d'expression du récepteur à l'IL-7 va entraîner l'éloignement des lymphocytes des niches stromales sécrétrices d'IL-7 (Nagasawa, 2006). La fin de la différenciation se fait lors de la migration des lymphocytes depuis la moelle osseuse vers les tissus lymphoïdes. Lors de cette migration et au sein des tissus lymphoïdes, ces cellules changeront encore radicalement d'environnement tant au niveau des cytokines rencontrées qu'au niveau des cellules stromales avec lesquelles elles entreront en contact.

III. Le gène *Pax5*

A. Les gènes de la famille *Pax*

Au cours du développement embryonnaire, les gènes de la famille *Pax* (*Paired box*), très conservés au cours de l'évolution, sont impliqués dans l'organisation des organes et dans la spécialisation de sous-types cellulaires (Stoykova and Gruss, 1994). Ces gènes continuent de s'exprimer à l'âge adulte dans des cellules souches ou progénitrices, mais également dans certaines cellules matures (Fedtsova et al., 2008; Seale et al., 2000; Shin et al., 2003; Thomas et al., 2007; Thompson et al., 2007; Thompson et al., 2008; Thompson et al., 2004). Les cellules ont, en fonction de leur localisation et de leur rôle, des profils d'expression particuliers. Les gènes *Pax*, qui codent des facteurs de transcription, semblent être au centre de l'orchestration des profils transcriptionnels de certains types cellulaires. Il a notamment été évoqué que l'ensemble des gènes *Pax*, issus d'un ancêtre commun sur un plan phylogénétique, agit selon les mêmes principes fondamentaux (Balczarek et al., 1997). Plusieurs études ont ainsi montré que les facteurs de transcription codés par les gènes *Pax* étaient au centre des mécanismes de réponse à des signaux environnementaux, contribuant notamment à la mise en place des éléments d'intégration de signaux extra-cellulaires (Bernier et al., 2001; Bouchard et al., 2005; Wang et al., 2007).

1. Dans l'embryogénèse

Les gènes *Pax* sont exprimés dans l'ensemble des tissus embryonnaires. Cependant, ils sont particulièrement impliqués dans la mise en place du SNC et du tube neural. Dans ces tissus, la réponse coordonnée des cellules à des facteurs solubles locaux est un processus essentiel au positionnement et à la différenciation des sous-types cellulaires (Chalepakakis et al., 1993; Stoykova and Gruss, 1994). L'utilisation de mutants pour évaluer l'implication développementale des différents gènes *Pax* a servi d'approche pour mettre en évidence leurs rôles régulateurs dans l'acquisition par les cellules des éléments de réponse aux facteurs locaux. Ces facteurs permettent de piloter le positionnement cellulaire lors de l'ébauche des organes, et induisent la différenciation des cellules dans les tissus appropriés. Par exemple, les embryons murins *Pax5*^{-/-} présentent des défauts sévères de formation des régions du mésencéphale et du rhombencéphale (Urbanek et al., 1997; Urbanek et al., 1994). Les souris *Pax3*^{-/-} présentent quant à elles des défauts de formation des crêtes neurales et du tube neural

(Wildhardt et al., 1996). La dynamique spatio-temporelle d'expression des gènes *Pax* semble jouer un rôle en deux phases dans le développement du SNC : d'abord ils permettent le positionnement des cellules, puis ils permettent leur différenciation dans le type cellulaire adéquat (Kawakami et al., 1997; Stoykova and Gruss, 1994).

2. Structure des protéines Paired Box

L'appartenance à la famille Pax est définie par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN de 128 AA formant six hélices alpha (Paired Box Domain, PBD), souvent associé à un homéodomaine (HD) complet ou partiel (Balczarek et al., 1997). Il existe à ce jour 9 gènes *Pax* décrits chez les vertébrés supérieurs. Ces gènes sont regroupés en quatre classes en fonction des caractéristiques structurales de leurs produits protéiques (**figure 12**).

La structure particulière du domaine de liaison à l'ADN rend difficile la caractérisation de sites de liaison consensus pour ces facteurs, le positionnement de chaque hélice influençant l'affinité de la suivante pour l'ADN (Czerny et al., 1993).

Groupe	Structure protéique			Membre de la famille	Territoires d'expression embryonnaire
	PBD	OP	Homéodomaine		
I				Pax1 Pax9	Squelette, Thymus Idem PAX9 + dents
II				Pax2 Pax5 Pax8	Rein, SNC Lymphocytes B, SNC Rein, thyroïde, SNC
III				Pax3 Pax7	Crêtes neurales, SNC, somites, muscles Idem PAX3
IV				Pax4 Pax6	Pancréas, intestins Idem PAX4 + œil, CNS

figure 12 : Classification des membres de la famille des *Paired box genes* en fonction de leurs structures protéique (d'après (Lang et al., 2007)).

3. Fonctions spécifiques des membres de la famille Pax

Classe I : *Pax1* est indispensable au développement de la colonne vertébrale. *Pax9* est exprimé dans les kératinocytes de l'œsophage et assure la formation et la maintenance de

l'épithélium stratifié squameux interne (Peters et al., 1997). Une augmentation de l'agressivité des dysplasies a été associée à une perte progressive de *Pax9* (Gerber et al., 2002).

Classe II : *Pax2* régule de la sécrétion de glucagon par les ilots pancréatiques (Ritz-Laser et al., 2000). Il est également impliqué dans la protection contre l'apoptose induite par un stress osmotique dû à une forte concentration de NaCl dans le canal collecteur du rein (Cai et al., 2005). Son absence perturbe fortement la formation du mésencéphale (Stoykova and Gruss, 1994). Il est aussi associé aux fonctions de maturation du sperme par son rôle dans le fonctionnement de l'épithélium de l'épididyme (Oefelein et al., 1996). *Pax5* est associé à la formation du mésencéphale (Stoykova and Gruss, 1994) et joue un rôle dans la spermatogenèse (Adams et al., 1992). Il est le seul représentant de la famille *Pax* retrouvé dans l'hématopoïèse. Ses fonctions dans ce tissu seront développées plus loin dans ce manuscrit. *Pax8* est exprimé dans les cellules folliculaires productrices de thyroxine et dans la thyroïde où il régule des ensembles de gènes directement impliqués dans la maturation de différents types cellulaires (Damante et al., 2001).

Classe III : *Pax3* et *Pax7* sont probablement issus d'un ancêtre commun et leurs fonctions sont redondantes (Zhou et al., 2008). A l'instar de *Pax5* dans la lymphopoïèse B, ils régulent l'entrée des cellules dans la différenciation des cellules musculaires dès les stades les plus précoces (Seale et al., 2001). Ils sont également fortement impliqués dans la formation du CNS (Shin et al., 2003; Stoykova and Gruss, 1994; Thompson et al., 2007; Thompson et al., 2008; Thompson et al., 2004)

Classe IV : *Pax4* et *Pax6* quant à eux interviennent dans le développement des cellules pancréatiques. *Pax4* est essentiel pour le contrôle de l'homéostasie des cellules bêta pancréatiques productrices d'insuline (Brun et al., 2004). *Pax6* semble associé à la modulation du fonctionnement et de l'architecture des ilots pancréatiques (Hamasaki et al., 2007).

4. Organisation du gène PAX5

Chez l'homme, le gène *PAX5* est localisé sur le bras court du chromosome 9 (9p13.2). Il recouvre une région génomique de près de 200 Mb (Stapleton et al., 1993) et se compose de 11 exons dont le premier est utilisé de manière alternative. Au cours de l'hématopoïèse, il s'exprime du stade pro-B au stade B mature et son expression s'éteint pour permettre la différenciation plasmocytaire (Nera et al., 2006) (**figure 6**). Il code la protéine BSAP (B-cell-specific activator protein, correspondant à la forme *PAX5A*; cette protéine sera appelée *PAX5* dans la suite de ce manuscrit). Les deux allèles de *Pax5* s'expriment à des niveaux équivalents

(Fuxa and Busslinger, 2007b). Il est régulé par deux promoteurs : le premier est en amont du 5'UTR et contient la *TATA*-box, il commande la transcription de l'exon 1A ; le second est en aval de l'exon 1A et ne contient pas de *TATA*-box, il permet la transcription de l'exon 1B (Busslinger et al., 1996). Chaque promoteur induit la transcription d'une région 5'UTR différente et du premier exon contigu 1A ou 1B. Chacune de ces séquences s'associe à une région codante commune (exons 2 à 10), donnant naissance à deux principales isoformes *Pax5A* et *Pax5B* (**figure 13**). L'expression de *Pax5* est également régulée par deux enhancer. L'un est en amont du gène et semble réguler son expression en particulier au cours du développement embryonnaire. Le second enhancer est situé dans l'intron 5-6 et régule l'expression de *Pax5* au cours du développement B (Decker et al., 2009). Différentes isoformes de *PAX5* sont également exprimées suite à des épissages alternatifs (Santoro et al., 2009; Zwollo et al., 1997). Le profil d'expression de ces isoforme semble finement régulé au cours de la différenciation B et est probablement associé caractère multifonctionnel de *PAX5*, voire à des implications pathologiques (Arseneau et al., 2009).

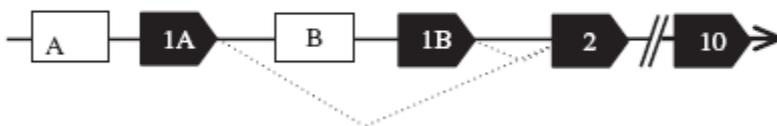


Figure 13 : Représentation de la transcription alternative des isoformes *Pax5A* et *Pax5B*. Rectangles blancs : régions promotrices ; Rectangles noirs : exons.

5. Structure de la protéine PAX5

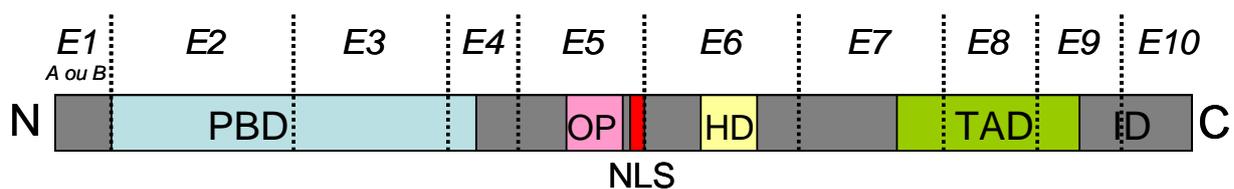


Figure 14 : Correspondance des séquences codantes avec les domaines de Pax5. (exons 1 à 10 notés E1-E10)

De la région N à C terminale, Pax5 contient :

Un domaine PBD : Ce domaine assure la liaison à l'ADN et est très conservé au sein de la famille Paired Box. Il est structuré en six hélices alpha, conduisant à la formation de deux domaines, chacun étant capable de se lier à l'ADN et d'influencer l'affinité de liaison de

l'autre à son site d'interaction (Czerny et al., 1993). Le recrutement des protéines de la famille Ets se fait au niveau de ce site de liaison à l'ADN (Fitzsimmons et al., 1996). Cette interaction altère la séquence de reconnaissance du domaine à l'ADN des facteurs Ets (Garvie et al., 2001).

Un domaine Octapeptide (OP) : Ce domaine permet le recrutement d'une protéine co-répressive de la transcription, Groucho 4 (Grg4) (Koop et al., 1996). La fixation de Grg4 sur l'OP fait baisser l'activité transcriptionnelle de Pax5 (Fisher and Caudy, 1998) ;

Un signal de localisation nucléaire (NLS) : Ce domaine permet à Pax5 d'être transporté dans le noyau après sa synthèse protéique.

Un homéodomaine (HD) : Cet homéodomaine partiel est capable de se lier aux protéines de la *TATA*-box et régule la machinerie transcriptionnelle. Dirk Eberhard et Meinrad Busslinger ont montré que les *TATA* Binding Proteines (TBP) et le gène du rétinoblastome (*Rb*, suppresseur de tumeur, inhibiteur du cycle cellulaire) interagissaient directement avec Pax5. Bien que ce domaine soit nécessaire, il n'est pas suffisant pour assurer l'interaction avec ces deux protéines. Elles se lient également à d'autres régions de Pax5, condition nécessaire à la production d'un effet physiologiquement observable (Eberhard and Busslinger, 1999).

Un domaine de transactivation et un domaine inhibiteur (TAD et ID) : Ces domaines ont été identifiés par des analyses structurales. Le domaine de transactivation de 55 acides aminés contient dans des séquences PST (proline, sérine et thréonine) riches en C-terminal. Ce domaine exerce une fonction activatrice de transcription sur les cibles de Pax5 et il est soumis à une forte régulation négative par ses 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 (HAT). Son activité est ciblée au niveau de certains promoteurs par des interactions avec des activateurs transcriptionnels (Barlev et al., 2003).

6. Les isoformes de PAX5

Des études, basées sur des transcriptions inverses suivies de PCR de haute-résolution et sur des analyses de fractions de polysomes ont montré l'expression et probablement l'existence protéique d'une large variété d'isoformes (Arseneau et al., 2009) (**figure 14**). Une

autre étude a montré que Pax5 était produit sous différentes formes, exprimées à des stades précis de la différenciation B. Ce travail montre également que la régulation des stades d'expression de ces isoformes est un processus physiologique inhérent aux mécanismes d'extinction de la fonction de PAX5 au stade B mature (Zwollo et al., 1997) (**figure 14**).

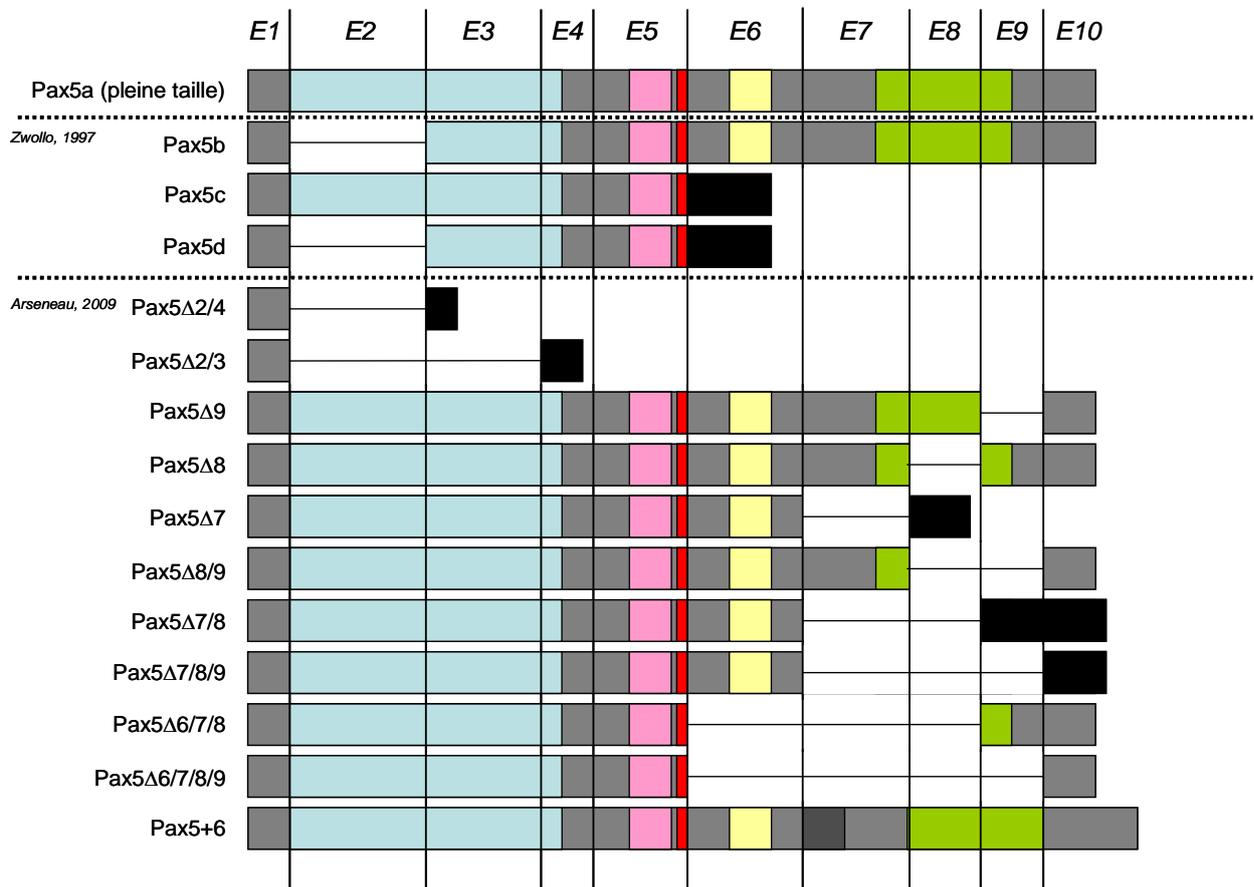


Figure 14 : Les isoformes de Pax5. Le code couleur des différents domaines est le même que celui utilisé pour la figure 13. Les lignes pleines horizontales représentent les exons épissés. Les rectangles noirs correspondent à une région codante hors du cadre de lecture, donc de composition en acides aminés différente de la séquence de Pax5 normal. La forme Pax5+6 tout en bas contient l'insertion d'un exon entre les exons 6 et 7 (les lignes verticales des limites des exons 7, 8, 9 et 10 ne correspondent pas pour cette isoforme).

En effet, l'expression de la forme tronquée *Pax5d* en fin de différenciation B est évoquée dans ces recherches. Cette forme agissant comme un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de Pax5, elle pourrait être associée au nécessaire arrêt de l'activité de Pax5 en fin de différenciation, ce qui est une étape nécessaire à la transition lympho-plasmocytaire. *Pax5b* et *Pax5e* pourraient quant à eux être impliqués dans les mécanismes de prolifération cellulaire au cours de la différenciation (Lowen et al., 2001). L'isoforme pleine taille de *Pax5* est l'espèce la plus présente dans les cellules (Robichaud et al., 2004).

7. Fonctions de Pax5 au cours de la lymphopoïèse B

a) Engagement dans la lymphopoïèse B

Comme nous l'avons évoqué précédemment, Pax5 agit de manière coordonnée avec E2A et Ebf1 pour développer le phénotype B à partir de PLC. L'absence d'un seul de ces facteurs de transcription induit une inhibition complète du développement B (Busslinger, 2004). Chez la souris adulte, les cellules *Pax5*^{-/-} sont bloquées au stade pro-B malgré l'expression de *Tcfe2a* (gène codant E2A), d'*Ebf1* et de certains gènes spécifiques du développement B (Nutt et al., 1998; Nutt et al., 1997). Cette observation montre que la transcription de certains gènes indispensables à la progression B est sous la seule dépendance de Pax5. Ces cellules pro-B *Pax5*^{-/-} conservent la capacité de proliférer sur une couche de cellules stromales en culture en présence d'IL-7. La substitution de l'IL-7 par d'autres cytokines induit une différenciation de ces cellules vers l'ensemble des lignées issues des PMAL (**figure 7**). Pax5 est donc également indispensable au verrouillage de l'identité B (Nutt, 1999). Ces propriétés sont en partie transposables *in vivo* (Rolink et al., 1999; Schaniel et al., 2002a). La réintroduction de *Pax5* dans les cellules *Pax5*^{-/-} est à ce jour la seule possibilité connue pour restaurer le potentiel de différenciation en lymphocytes B matures des cellules pro-B *Pax5*^{-/-} (Nutt et al., 1998).

L'expression ectopique constitutive de *Pax5* dans des CSH n'altère pas la différenciation myéloïde, ce qui souligne qu'il n'est pas un régulateur de l'ensemble de l'hématopoïèse (Anderson et al., 2007; Cotta et al., 2003; Souabni et al., 2002). Cependant il va être capable d'induire un biais de différenciation des lymphocytes vers la lignée B au détriment de la lignée T. Ceci conforte l'hypothèse d'une action déterminante de Pax5 restreinte à la lignée B. Ce rôle serait dépendant de l'activation d'autres facteurs de transcription qui s'expriment en amont et qui prédisposent les cellules progénitrices à s'orienter vers la différenciation lymphoïde.

La vision hiérarchique de l'activation strictement séquentielle des facteurs de transcription PU.1, Ikaros, E2A, Ebf1 et Pax5 pilotant l'engagement des cellules vers la différenciation B se heurte à plusieurs résultats expérimentaux. Plusieurs de ces facteurs sont co-exprimés à certains stades et sont capables de se réguler les uns les autres. Par exemple, les souris *Tcfe2a*^{+/-} et *Ebf1*^{+/-} expriment des taux plus faibles de *Pax5* dans les lymphocytes pro-B que les souris sauvages (O'Riordan and Grosschedl, 1999). De plus, l'expression ectopique d'*Ebf1* induit l'expression de *Pax5* dans des cellules *Tcfe2a*^{-/-} et restaure le potentiel

d'engagement et de différenciation B de ces cellules (Seet et al., 2004). Ce résultat, bien que démontrant l'importance de la chronologie d'expression des masters gènes évoqués ici, souligne un enchevêtrement des rôles de ces facteurs. Sur un plan moléculaire, la transcription de *Pax5* est reliée à la fixation des facteurs STAT5 (dont la translocation nucléaire est induite par un signal IL-7) et Ebf1 sur le promoteur 1A (Hirokawa et al., 2003; O'Riordan and Grosschedl, 1999). PU.1, NFκB, IRF-4 et IRF-8 seraient également capables de réguler *Pax5* en interagissant avec son enhancer interne (Decker et al., 2009) (**figure 15**).

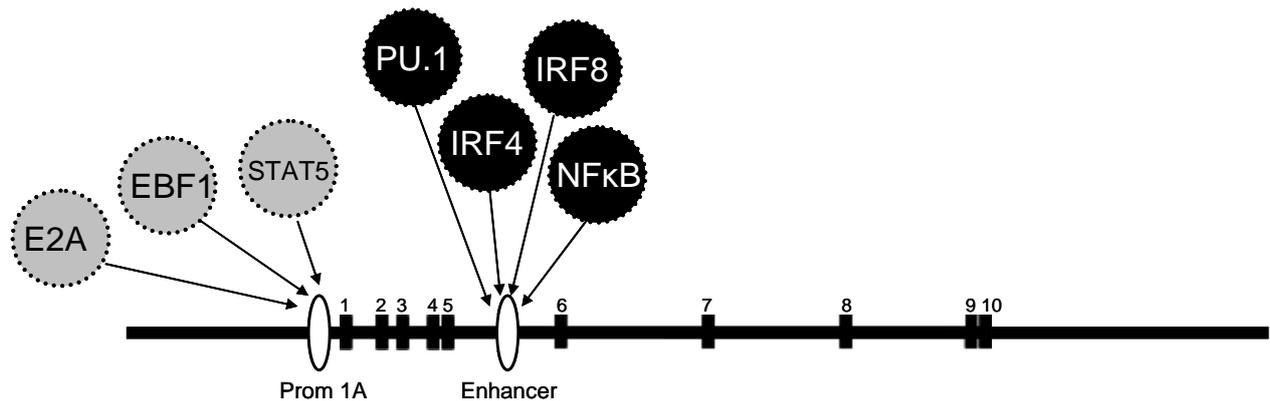


Figure 15 : Facteurs de transcription régulant l'expression de *Pax5*. E2A, Ebf1 et STAT5 sont capables d'induire son expression en se fixant sur le promoteur 1A (prom 1A). PU.1, IRF4, IRF8 et NFκB peuvent moduler son niveau d'expression en se fixant sur son enhancer interne.

Comme évoqué précédemment, *Pax5* est lui-même capable d'induire l'expression d'*Ebf1* et inversement (Roessler et al., 2007). Il est également probable que *Tcfe2a* soit régulé par *Pax5* (Pridans et al., 2008). Ces données laissent penser que non seulement la nature des facteurs de transcription exprimés, mais également leurs impacts relatifs sur les niveaux d'expression des uns et des autres, sont des éléments essentiels au développement B. L'entrée des cellules dans la lignée B et le maintien de cette identité sont des mécanismes qui sous-tendent l'activation d'un réseau de facteurs de transcription et des interactions fines entre eux.

b) Promotion de la transcription des gènes B spécifiques

Pax5 va être capable d'activer la transcription de gènes indispensables au développement B. Parmi eux, il induit l'expression de gènes nécessaires au pré-BCR tels *Cd19*, *Cd79a*, *Blnk*, *VpreB* ou $\lambda 5$ (Cobaleda et al., 2007b; Delogu et al., 2006; Pridans et al., 2008). La signalisation du pré-BCR étant un élément essentiel du développement B, le défaut d'expression de ces gènes pourrait être un des mécanismes responsable de l'incapacité des lymphocytes pro-B *Pax5*^{-/-} de poursuivre la différenciation B. Cependant, la réintroduction

d'un locus *IgH* fonctionnel et de *Cd79a* et *Cd79b* dans des cellules *Pax5*^{-/-} ne suffit pas à débloquent le phénotype pro-B (Thevenin et al., 1998). Ceci suggère que d'autres mécanismes contribuent à ce phénotype.

En effet, divers gènes permettant la différenciation B sont dépendants de l'activité de Pax5. Il en est ainsi de *SpiB*, *Aiolos*, *Lef1*, *IRF4* et *IRF8* (Nutt et al., 1998; Pridans et al., 2008; Schebesta et al., 2007).

Des gènes tels que *Cd24a* (HSA) et *Sdc4* sont également activés par Pax5 (Pridans et al., 2008). Ces gènes ont la particularité d'être associés à des mécanismes d'adhésion aux cellules stromales (Nielsen et al., 1997; Yamashita et al., 1999) (**figure 16**). Les interactions avec l'environnement stromal changent en cours de la différenciation B, les cellules pro-B étant liées à des niches stromales sécrétrices d'IL-7 alors que les cellules progénitrices non engagées en B sont dans un environnement stromal ne sécrétant pas d'IL-7 (Tokoyoda et al., 2004). Un défaut de migration ou de fixation au sein du microenvironnement stromal de développement B pourrait expliquer également ce blocage.

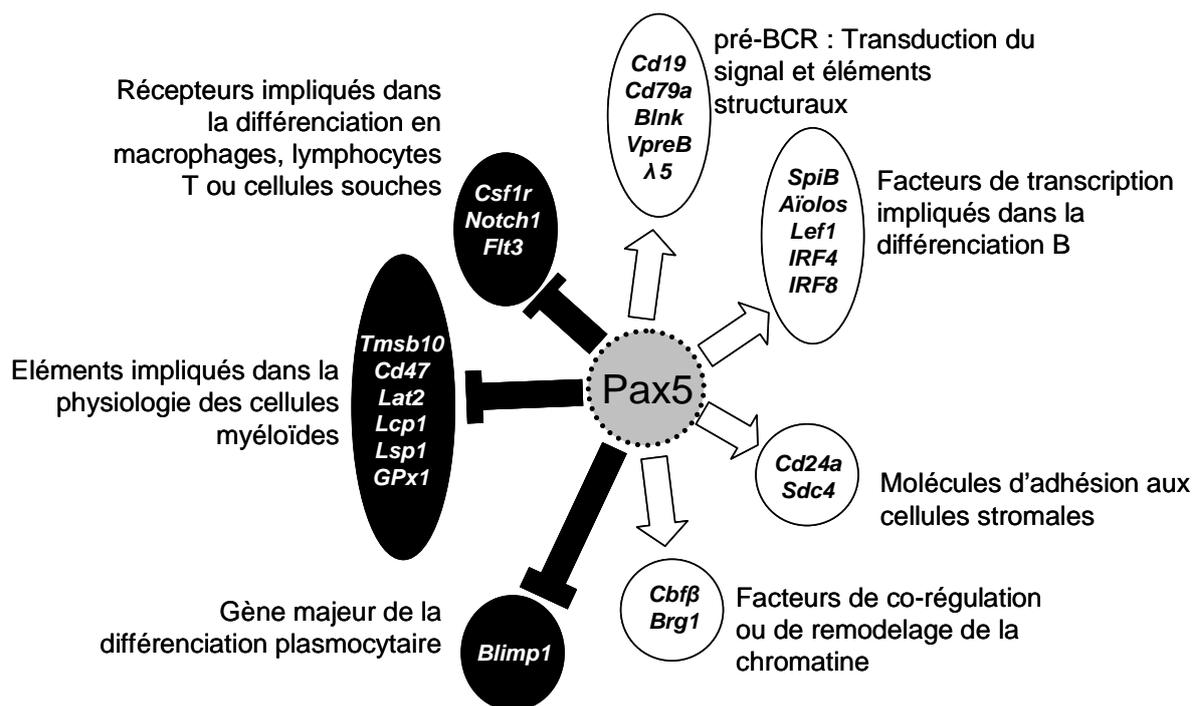


Figure 16 : Réseau de gènes régulés par Pax5. Les gènes activés sont en blanc sur fond noir et les grandes fonctions dans lesquelles ils sont impliqués sont notées en regard de chaque groupe. Les gènes écrits en blanc sur fond noir sont décrits comme réprimés par Pax5. De la même façon, leurs implications sont notées en regard.

En outre, l'expression de certains facteurs de co-régulation, comme *Cbfb*, ou de remodelage de la chromatine, comme *Brg1*, est activée par Pax5. *Cbfb* interagit avec *Runx1* qui est un facteur essentiel de la lymphopoïèse B (Ichikawa et al., 2004). Il est intéressant de

noter l'abondance de gènes nucléaires régulés par Pax5 et sa capacité de moduler l'expression d'acteurs importants de l'hématopoïèse.

c) Répression de la transcription des gènes non-B

Le blocage de l'expression de gènes inappropriés dans le développement B est un autre rôle de Pax5 (**figure 16**). Ainsi, il est capable de réprimer la transcription de *Csf1r* (récepteur du M-CSF, facteur spécifique de la différenciation des macrophages), de *Flt3* (récepteur des cellules souches) et de *Notch1* (récepteur de DL1, facteur de différenciation T) (Nutt et al., 1999; Souabni et al., 2002). D'autres gènes largement exprimés dans les lignées myéloïdes sont réprimés par Pax5 : *Tmsb10*, *Cd47*, *Lat2*. La nécessité d'une régulation précise de la localisation des lymphocytes B en développement au sein de microenvironnements adéquats dans la moelle osseuse est soulignée par la capacité de Pax5 à inhiber deux gènes impliqués dans la migration des neutrophiles : *Lcp1*, *Lsp1* (Pridans et al., 2008). Il réprime d'autres gènes impliqués dans la migration et l'adhésion cellulaire, notamment des récepteurs aux cytokines et des intégrines ou protéines associées (Delogu et al., 2006). Son rôle d'inactivation de propriétés métaboliques inappropriées est illustré par son action inhibitrice de la transcription du gène de la *glutathione peroxidase 1 (GPx1)*. Cet enzyme est impliqué dans les fonctions de dégradation de l'hydrogène peroxydé et est abondante dans les ostéoclastes et les macrophages (Lean et al., 2005). Pax5 permet aussi d'éviter la production trop précoce de plasmocytes en bloquant la transcription de *Blimp1*, facteur essentiel de la différenciation plasmocytaire. Suite à l'activation d'un lymphocyte B mature, Blimp1 inhibera à son tour *Pax5* et la cellule réexprimera des gènes qu'il inhibait jusque là ((Lin et al., 2002). Il est ainsi possible d'observer l'expression de *Flt3*, *Mef2c*, *IgJ* et *Emb* au cours de la différenciation terminale B (Delogu et al., 2006; Kallies et al., 2007).

d) Implication de Pax5 dans les réarrangements V(D)J

Une implication de Pax5 dans ces mécanismes a été suspecté suite à l'étude du statut des réarrangements $V_H D_H J_H$ dans les lymphocytes pro-B *Pax5*^{-/-} (Bassing et al., 2002). Les auteurs se sont aperçus que la recombinaison D_H-J_H n'était pas altérée alors que la recombinaison $V_H-D_H J_H$, qui survient ultérieurement (**figure 7**), était fortement biaisée. La recombinaison des segments V_H distaux (appartenant à la famille $V_H J558$) avec les segments $D_H J_H$ déjà recombinés est apparue plus de 100 fois plus rare dans les lymphocytes pro-B *Pax5*^{-/-} que dans les lymphocytes pro-B sauvages (Johnston et al., 2006; Nutt et al., 1997). En temps normal, les recombinaisons des segments V_H distaux et V_H proximaux avec les régions

proximales $D_HJ_HC_H$ sont à peu près équiprobables. Cette propriété est associée à un repliement tridimensionnel de la chromatine au niveau du locus IgH , plaçant les segments V_H distaux et les segments V_H proximaux à des distances spatiales équivalentes des segments $D_HJ_HC_H$. Ce repliement compense les déséquilibres de probabilité de recombinaison inhérents à la distance génomique entre les segments V_H distaux et proximaux. Paradoxalement, les lymphocytes $Pax5^{-/-}$ présentent également un taux de recombinaison inférieur des segments V_{H7183} proximaux par rapport aux lymphocytes sauvages (Hesslein et al., 2003). Ceci suggère que Pax5 n'est pas seulement impliqué dans la structuration de la chromatine. Dans les cellules pro-B $Pax5^{-/-}$, le locus des IgH est en conformation étendue, séparant physiquement les loci V_H distaux des segments $D_HJ_HC_H$ (Fuxa et al., 2004). Dans les cellules sauvages, Pax5 induit une contraction du locus IgH par la formation de boucles de chromatine, ce qui place les segments V_H distaux à une distance physique des segments $D_HJ_HC_H$ comparable à celle des segments V_H proximaux (**figure 17**). Le même type d'anomalie structurale a été relevée suite à un dysfonctionnement de l'histone méthyltransferase Ezh2 (Su et al., 2003a). Il est possible que Pax5 soit responsable du recrutement local du complexe PRC2, formé notamment d'Ezh2.

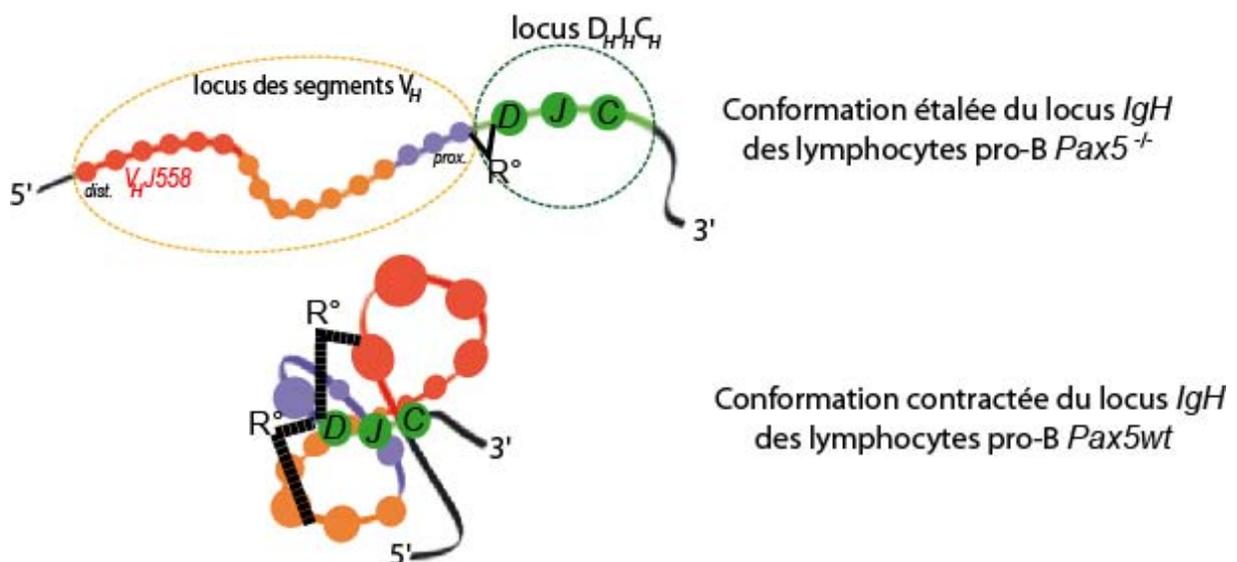


Figure 17 : Contraction du locus des IgH dépendante de Pax5. En l'absence de Pax5, le locus est en conformation étalée et les recombinaisons (R°) V_H proximaux- $D_HJ_HC_H$ sont privilégiées. En présence de Pax5, le locus est en conformation contractée et les recombinaisons des segments V_H proximaux et distaux avec $D_HJ_HC_H$ ont des probabilités comparables (d'après (Cobaleda et al., 2007b)).

Pax5 pourrait également agir en modifiant les niveaux de méthylation des histones du locus IgH . Par exemple, la diméthylation de l'histone H3 (H3K9m2) est une modification empêchant l'accessibilité de la chromatine, propriété nécessaire au déroulement de la recombinaison $V(D)J$ (Morshead et al., 2003). Il a été montré que Pax5 était nécessaire pour

supprimer cette modification post-traductionnelle (Johnson et al., 2004). Enfin, Pax5 se lie sur des séquences spécifiques au niveau des segments V_H et recrute le complexe Rag1-Rag2. Ainsi, l'efficacité de la recombinaison $V_H-D_HJ_H$ est améliorée. Ceci pourrait expliquer pourquoi la probabilité de recombinaison des segments proximaux $V_H7183-D_HJ_H$ diminue lors de son absence alors que celle de recombinaison avec des segments proximaux V_H81X n'est pas modifiée (Zhang et al., 2006).

Au sein du lymphocyte B mature, Pax5 joue également un rôle dans les mécanismes de commutation de classe isotypique des immunoglobulines (CSR) et d'hyper-mutation somatique (SHM), respectivement associés à la nature de la stimulation antigénique et à la production d'anticorps de haute affinité pour l'antigène. L'expression forcée de *Blimp1*, inhibiteur plasmocytaire de *Pax5*, bloque les mécanismes de commutation de classe isotypique en fin de différenciation B, et stimule la différenciation plasmocytaire (Knodel et al., 2001). Les mécanismes de SHM et de CSR sont associés à l'expression de la cytidine désaminase induite par activation immunitaire (*AID*) (Muramatsu et al., 2000). Pax5 est capable de se fixer au promoteur d'*AID* et son activité suffit à induire son expression (Gonda et al., 2003). Dans les lymphocytes B matures, Pax5 est associé à E2A et à leurs inhibiteurs respectifs, Blimp1 et Id2, pour réguler finement l'expression d'*AID*. De plus, Pax5 est capable de se fixer au promoteur germinale ϵ et sa surexpression induit un blocage de la commutation isotypique en IgA ainsi qu'une augmentation de celle en IgE (Qiu and Stavnezer, 1998). *Pax5* est donc impliqué dans l'ensemble des mécanismes nécessaires à l'acquisition d'un répertoire de reconnaissance antigénique varié et à la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique des cellules B.

e) Différenciation plasmocytaire

En fin de différenciation B s'effectue une transition entre le phénotype B mature et le phénotype plasmocytaire. La cellule B mature activée par l'antigène accomplit le CSR et les SHM, puis se différencie en plasmocyte. Cette cellule assurera la sécrétion des immunoglobulines identiques au BCR réactif assemblé au cours de la différenciation. Les profils transcriptomiques sont radicalement différents entre les cellules B matures et les plasmocytes (Delogu et al., 2006; Nera et al., 2006). L'expression de *Pax5*, encore nécessaire au stade B mature (comme évoqué dans le paragraphe précédent) s'éteint et lève l'inhibition de *Blimp1* qui contribuera à son tour à inhiber l'activité résiduelle de Pax5 (Lin et al., 2002; Shaffer et al., 2002). Blimp1 conduira alors le programme transcriptionnel nécessaire à

l'acquisition des fonctions spécifiques des plasmocytes (Shaffer et al., 2002). Le passage au stade plasmocytaire est accompagné d'une réexpression de gènes jusque là inhibés par Pax5 (*Flt3*, *Mef2c*, *IgJ* et *Emb* notamment) (Delogu et al., 2006; Kallies et al., 2007). Dans les cellules B matures du centre germinatif, Bcl-6 renforce le rôle de Pax5 en inhibant également l'expression de *Blimp1* (Shaffer et al., 2000).

IV. Les leucémies aiguës lymphoblastiques de type B

A. Généralités

Les hémopathies malignes sont classées en fonction du stade des cellules cancéreuses, de la localisation du foyer de prolifération et de leurs cinétiques de développement. Les hémopathies malignes chroniques évoluant sur plusieurs années sont distinguées des hémopathies malignes aiguës évoluant en quelques jours ou semaines. Les différentes pathologies chroniques sont les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC), les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et les lymphomes de bas grade. Les pathologies aiguës incluent les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et les lymphomes agressifs. Les leucémies ont un foyer principal de prolifération dans la moelle osseuse et les cellules cancéreuses se déversent dans la circulation. Les myélomes ont également un foyer médullaire mais la contamination du compartiment sanguin est limitée. Les lymphomes prolifèrent au sein des ganglions lymphatiques ou des formations lymphoïdes. Un envahissement sanguin comparable en quantité à celui retrouvé dans les leucémies peut apparaître dans le tableau clinique de certaines de ces pathologies.

1. Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)

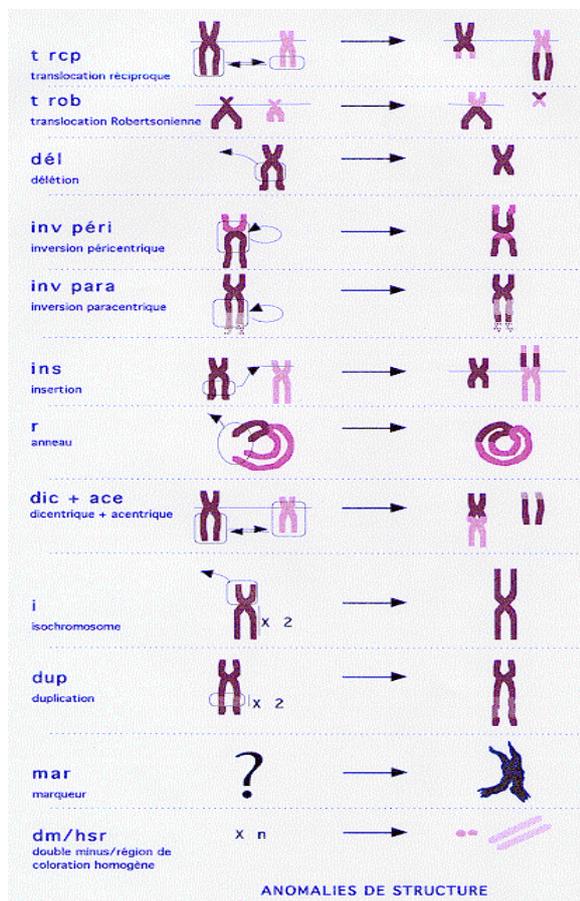
Les leucémies aiguës sont des pathologies caractérisées par une prolifération massive de cellules hématopoïétiques bloquées dans leur différenciation. Ces cellules, appelées blastes, vont proliférer de manière clonale ou oligo-clonale au sein de la moelle osseuse et envahir le compartiment sanguin. Il existe des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM), initialement classées de LAM0 à LAM7 (classification FAB ;(Bennett et al., 1976)) en fonction du type cellulaire touché et du stade de blocage de différenciation des blastes. Depuis 2008, la classification de l'OMS définit les LAM par des critères essentiellement basés sur l'étiologie de la pathologie. L'OMS distingue ainsi des LAM présentant des anomalies moléculaires identifiées (de type translocations/inversions ou de type mutations), des LAM suite à l'acutisation d'une phase myélodysplasique, des LAM thérapies-induites, des sarcomes myéloïdes, des proliférations myéloïdes liées au syndrome de Down, des leucémies à cellules dendritiques blastiques plasmocytoïdes ou enfin des LAM d'autres types. Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont classées en fonction de la lignée touchée en LAL-B ou en LAL-T. Le stade d'avancement dans la différenciation fait également partie des critères de classification. Les LAL sont les cancers les plus fréquents de l'enfant. Elles touchent 31/10⁶

enfants âgés de moins de 15 ans et $10/10^6$ adultes par an aux Etats-Unis (Spector and Ross, 2006). L'incidence des LAL est particulièrement élevée entre 2 et 5 ans et aux alentours de 50 ans. Les LAL représentent à ce jour 25% des cancers pédiatriques. Dans 88% des cas il s'agit de LAL-B (Jemal et al., 2006). L'occurrence des LAL diffère en fonction de critères ethniques, du niveau de développement et de facteurs environnementaux. Parmi les facteurs de risque au cours de la grossesse, l'exposition de la mère à certains solvants, la proximité des habitations avec les lignes électriques à haute tension et l'exposition aux pesticides sont les seuls clairement établis (Deschler and Lubbert, 2006). L'hypothèse qu'une stimulation du système immunitaire soit nécessaire à l'émergence d'une LAL-B n'est pas démontrée à ce jour.

B. Bases moléculaires et génétiques des LAL-B

Les LAL-B sont des pathologies hétérogènes. Il existe au sein de cette hémopathie maligne différentes entités caractérisées par des éléments morphologiques, cytogénétiques et moléculaires distincts. Certains de ces éléments caractéristiques peuvent être des indicateurs fiables au niveau diagnostique, pronostique et prédictif.

1. Les anomalies cytogénétiques



Les anomalies cytogénétiques peuvent être structurales comme les translocations chromosomiques équilibrées ou déséquilibrées (sans et avec perte de matériel chromosomique respectivement) (**figure 18**).

Figure 18 : Représentation schématique des différentes classes d'anomalies chromosomiques. Dans la colonne de gauche sont notées les abréviations utilisées en cytogénétique pour décrire les caryotypes. La première colonne de chromosomes représente les chromosomes en conformation normale. Les rectangles désignent les régions touchées par les anomalies. Les flèches reliant deux régions symbolisent un déplacement de matériel. Les flèches vers l'extérieur désignent les délétions. Le symbole x2 symbolise une amplification de matériel (source : (Huret et al., 2000)).

Une translocation chromosomique est un mécanisme menant à la juxtaposition de deux fragments chromosomiques normalement séparés (translocation inter chromosomique quand les deux fragments joints appartiennent à deux chromosomes distincts, intra chromosomique lorsqu'ils sont issus du même chromosome). Ces anomalies peuvent également être des créations de chromosomes à deux centromères (dicentriques), des inversions (retournement d'une séquence), des amplifications ou des délétions de tout ou partie d'un ou plusieurs chromosomes (monosomie et trisomie par exemple). Dans les LAL-B, la description des anomalies caryotypiques permet de détecter fréquemment des anomalies récurrentes, en particulier dans le cas des translocations chromosomiques. Ces anomalies révèlent le réarrangement de gènes situés au niveau des points de cassures de chacun des deux chromosomes partenaires (abréviations cytogénétiques en Annexe#7).

2. Mécanismes associés aux translocations chromosomiques

Les translocations chromosomiques sont les anomalies structurales les plus fréquemment retrouvées dans les hémopathies malignes, en particulier dans les cancers touchant la lignée B (Kuppers, 2005). Il existe plusieurs mécanismes oncogéniques associés aux translocations chromosomiques : modification de l'environnement de régulation d'un proto-oncogène (cas des translocations aux loci des *IgH*, souvent retrouvées dans les lymphomes ; Jankovic et al., 2007), création d'un gène de fusion par réunion des parties de deux gènes (Shtivelman et al., 1985), ou, plus marginalement décrits, dérégulation d'ARN non codants (Bousquet et al., 2008; Calin et al., 2004).

a) Défauts de machineries de réparation

La détermination des mécanismes impliqués dans l'occurrence de tels remaniements a fait l'objet de nombreuses investigations. L'hypothèse la plus consensuelle aujourd'hui attribue la création de translocations chromosomiques à des anomalies des systèmes de réparation des cassures double brin de l'ADN. D'un point de vue physiologique, les cassures doubles brins se produisent d'après au moins 3 mécanismes au cours du développement lymphoïde B : recombinaisons V(D)J, CSR et SHM. Les enzymes Rag1/Rag2 et AID, associés à ces étapes de développement B, peuvent avoir une activité anormale susceptible de provoquer ces événements en dehors de leurs sites d'activité habituels (Robbiani et al., 2009; Tsai et al., 2008). Les systèmes de réparation de l'ADN tels que la liaison des extrémités non-homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (HR) ont également fait l'objet de

recherches visant à caractériser leur responsabilité dans la survenue de translocations chromosomiques.

Au début de la différenciation B, il a été montré que le complexe Rag1/Rag2 était capable d'induire des cassures double brins dans le cadre des recombinaisons V(D)J en reconnaissant des séquences signal de recombinaison (RSS). Par l'étude de la translocation *IgH-myc*, différentes équipes ont clairement établi que la formation des translocations impliquant le locus *IgH* requièrent l'activité de Rag1/Rag2 (Difilippantonio et al., 2002; Zhu et al., 2002). Ce complexe est aussi capable de produire des cassures double brins accidentelles en dehors des RSS et au sein même d'oncogènes (Raghavan et al., 2004; Tsai et al., 2008).

D'autres cassures doubles brins surviennent au stade B mature suite à l'activité de CSR et de SHM dépendante d'AID (Robbiani et al., 2009). Dans ce travail, l'équipe de Thomas Eisenreich a notamment montré qu'une surexpression d'AID amène à l'apparition de plusieurs cassures double brins, touchant presque tous les chromosomes. Il apparaît intéressant de noter qu'AID peut également induire des mutations hors des gènes codant les immunoglobulines. Des mutations induites par AID ont en effet été détectée à une fréquence notable dans des oncogènes tels que *c-myc*, *Pim1*, *Pax5*, *RHOH*, *Bcl6*, *Cd79a*, *Cd79b*, et *Fas* (Muschen et al., 2000; Pasqualucci et al., 1998; Pasqualucci et al., 2001; Shen et al., 1998). Ces mutations sont corrigées grâce à les mécanismes de réparation par excision de base et de réparation des mésappariements (Liu et al., 2008). Ce sont ces mécanismes qui nécessitent la création de cassures double brins. Bien que Rag1/Rag2 et AID ne soient pas exprimés en même temps au cours du développement, la possibilité de fusion des cassures double brins générées par leur activité a été envisagée. Pour que cela soit possible, les cellules porteuses de cassures doubles brins associées à l'activité de Rag1/Rag2 doivent être capables de se différencier en lymphocytes B matures. Ceci suppose que le point de contrôle ATM soit déficient. ATM est une protéine kinase qui va être stimulée lors de ce type d'altération de l'ADN. Son activation mènera à la mise en œuvre des mécanismes de réparation de ces cassures (NHEJ ou HR ; (Shiloh, 2003)). Si ATM est déficient, les cassures double brins vont persister tout au long de la différenciation. Elles pourraient alors s'associer avec celles créées suite à l'activité d'AID, générant ainsi des translocations chromosomiques (Callen et al., 2007).

L'autre mécanisme décrit permettant la fusion de points de cassure Rag1/Rag2 et AID dépendants est la perte de *XRCC4* combinée à un défaut de p53 (Wang et al., 2008; Wang et al., 2009). Enfin, il a aussi été avancé que la faible expression d'AID en début de développement B pourrait suffire à induire des mutations ponctuelles dans certains gènes autres que dans ceux des immunoglobulines, créant ainsi des motifs RSS en dehors des sites dédiés, ce qui conduirait à une activité anormale de Rag1/Rag2 (Tsai et al., 2008).

Les mécanismes de NHEJ semblent jouer un rôle important dans la génération de translocations chromosomiques (Weinstock and Jasin, 2006). Il existe en fait au moins deux types de systèmes de réparation des cassures double brins de type NHEJ : un classique et un alternatif (C-NHEJ et A-NHEJ respectivement). Ils assument des fonctions proches mais nécessitent l'association de protéines différentes. La différence de fonction constatée entre les deux systèmes réside dans leur substrat. C-NHEJ associe des fragments à bouts francs ou ayant moins de 4 bases d'homologie, alors que A-NHEJ associe des fragments partageant de 5 à 25 bases d'homologie (Haber, 2008; Zha et al., 2009). L'absence de la machinerie de C-NHEJ fonctionnelle augmente substantiellement le nombre de translocations chromosomiques (Difilippantonio et al., 2000; Ferguson et al., 2000; Karanjawala et al., 1999). Les points de cassure double brins étant tout de même réassociés dans les translocations chromosomiques (et donc en cas de défaut de C-NHEJ), A-NHEJ est supposé être à la base des mécanismes de ressoudage des brins cassés, ce qui mène à la création de réarrangements chromosomiques aberrants. De plus, les brins réassociés présentent, dans certains modèles expérimentaux, des homologies de séquence de part et d'autre du point de cassure (Callen et al., 2007; Difilippantonio et al., 2002; Zhu et al., 2002).

b) Organisation 3D de la chromatine dans le noyau

La notion de territoires chromosomiques, et donc de proximité de certaines séquences dans le noyau interphasique (Cremer and Cremer, 2001), a également été proposée pour expliquer la récurrence de certaines translocations chromosomiques. La ségrégation spatiale des territoires chromosomiques est en partie associée à l'activité transcriptionnelle des gènes (Lieberman-Aiden et al., 2009). Par exemple, les loci de *IgH* et *c-myc* sont proches dans le noyau en interphase, en particulier dans les lymphocytes B matures avant l'activation d'AID (Osborne et al., 2007). Les gènes partageant les mêmes mécanismes de régulation sont fréquemment retrouvés proches dans le noyau, probablement afin d'optimiser la consommation des facteurs et cofacteurs transcriptionnels par la cellule (Spilianakis et al.,

2005). Dans un contexte pathologique, il est difficile d'établir un lien direct entre les translocations chromosomiques et des anomalies de l'organisation 3D de la chromatine dans le noyau dans la mesure où toutes les cassures doubles brins ne perturbent pas l'organisation dynamique des chromosomes (Kruhlak et al., 2006; Soutoglou et al., 2007). Cependant, certains facteurs responsables de la stabilité des télomères semblent impliqués dans son contrôle. Leur défaut pourrait donc conduire au rapprochement spatial de deux fragments chromosomiques normalement éloignés. Si des points de cassures se retrouvent proches l'un de l'autre, ils ont plus de probabilité de fusionner (Dimitrova et al., 2008). L'étude des mécanismes régulateurs de l'organisation tridimensionnelle du noyau est encore récente mais sera probablement riche d'enseignements pour la compréhension des translocations chromosomiques.

c) Séquences spécifiques et sélection des événements oncogéniques

La question des causes de la récurrence de certaines translocations chromosomiques ou de l'implication fréquentes de certains locus reste encore à résoudre. Les translocations chromosomiques sont-elles des événements aléatoires sur le génome ? La démonstration de l'existence de territoires fragiles dans le génome semble indiquer le contraire. Des territoires fragiles sont des régions d'ADN génomique définies statistiquement : suite à un stress réplicatif, certaines régions subissent significativement plus d'événements de cassures double brins que dans le reste du génome (Arlt et al., 2006). En outre, Rag1/Rag2 et AID semblent responsables des réarrangements impliquant le locus des immunoglobulines. En ce qui concerne la plupart des autres translocations chromosomiques menant à la fusion de deux gènes, aucune explication mécanistique ou statistique n'est satisfaisante. La théorie qui prévaut pour expliquer la configuration de ces anomalies consiste à les présenter comme des événements aléatoires. Elles seraient ensuite sélectionnées par la nature cruciale des gènes touchés et des propriétés oncogéniques des fusions générées (Rabbitts, 1991). Les lésions oncogéniques alors portées par la cellule suffiraient à contourner les mécanismes de réparation et de contrôle de l'intégrité cellulaire, menant ainsi à l'émergence d'une pathologie cancéreuse. Un des mécanismes proposé pour tromper la vigilance de la cellule quant à son intégrité génomique et transcriptomique (notamment par la machinerie nucléaire de dégradation des ARNm anormaux, NMD) est la sélection des fusions des gènes dans le cadre de lecture. Ceci revient à la création d'un gène de fusion artificiel mais de structure génétique normale (Ortiz de Mendibil et al., 2009). Cette condition n'apparaît cependant pas

indispensable à la sélection des fusions de gènes, certaines associant des gènes d'orientation opposée.

3. Anomalies fréquentes des LAL-B

Le caractère clonal du développement des LAL-B, et des cancers en général, rend l'analyse du contenu génomique indispensable à la compréhension des mécanismes oncogéniques sous-jacents. Les anomalies associées aux LAL-B peuvent être des anomalies de séquence (mutations cryptiques, c'est-à-dire invisibles au caryotype), des anomalies de structure (réarrangements observables au caryotype) ou des anomalies de nombre (perte ou gain d'un ou de plusieurs chromosomes). Ces anomalies peuvent toucher un ou plusieurs gènes et être soit à l'origine du cancer (mutation initiatrices), soit accessoires (mutation secondaires). En cohérence avec la prolifération incontrôlée de cellules immatures retrouvées dans les LAL-B, les mutations touchent en général des facteurs de transcription ou des facteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (parfois les deux). Les mutations peuvent être soit qualitatives (surexpression d'un gène normal), soit qualitatives (acquisition ou perte de propriétés d'un facteur muté). Enfin, les mutations peuvent être soit innées (transmission parentale ou acquisition *in utero*), soit acquises.

a) Anomalies de structure

Les translocations chromosomiques sont les anomalies les plus souvent retrouvées dans les LAL-B. Les anomalies récurrentes évoquées ci-après représentent 40% des cas. Il existe une disparité manifeste de la répartition de ces mutations entre les LAL-B de l'enfant et de l'adulte. Ceci pourrait être associée aux différences de développement de la pathologie, dont la cinétique et le mode d'action varient en fonction des oncogènes impliqués. La théorie de Greaves propose la nécessité d'au moins deux événements oncogéniques pour permettre l'émergence d'une LAL-B. L'étude des cartes de Guthrie a montré l'existence d'une prédisposition constitutive au développement de cette pathologie (Mori et al., 2002). Son émergence nécessiterait différents degrés de stimulation du système immunitaire pour induire d'autres mutations qui coopéreraient avec la première (théorie de Greaves ; (Greaves, 1997)).

ETV6-RUNX1/t(12;21)(p13;q22) (= TEL-AML1) est l'anomalie la plus fréquente dans les LAL-B de l'enfant, retrouvée chez 25% de ces patients (Pui et al., 2004; Romana et al., 1994). Bien que la pathogénie associée à la fusion de ces deux facteurs de transcription reste mal définie, *Etv6* (12p13 chez l'homme) a été décrit chez la souris comme un master

gène de l'hématopoïèse adulte (Hock et al., 2004). De la même façon, *Runx1* (21q22 chez l'homme) apparaît indispensable à l'hématopoïèse embryonnaire (Okuda et al., 1996). Cette translocation a été caractérisée chez des fillettes jumelles dont une seule a développé une leucémie (Ford et al., 1998). La nécessité d'au moins deux événements oncogéniques apparaît claire dans ce cas pour permettre l'émergence de la LAL-B (Greaves, 1997). L'étude des cartes de Guthrie, et donc des cellules sanguines de l'ensemble des nouveaux nés (indépendamment du fait qu'ils aient ou non développé une leucémie dans les années suivantes), a montré l'existence de cellules pré-leucémiques chez une proportion élevée d'individus. En effet, la fusion *ETV6-RUNX1* a été retrouvée dans 1% des échantillons de sang de cordons, soit une prévalence 100 fois supérieure à l'incidence des LAL-B associées à cette mutation dans la population générale (Mori et al., 2002). Le premier événement serait donc ici prénatal et produirait des clones pré-leucémiques, puis une autre mutation surviendrait et conduirait au développement de la pathologie. Cette seconde mutation pourrait être associée à une stimulation du système immunitaire au cours de la petite enfance (ce qui correspondrait au pic d'incidence à 2-5 ans de cette maladie). Cette translocation a fait l'objet d'études fonctionnelles *in vitro* visant à comprendre le mécanisme de leucémogénèse associé à la protéine chimérique. L'équipe de Greaves a montré que la protéine chimère TEL-AML1 dérégulait la voie de signalisation du TGF- β dans les pro-B. La protéine chimère se lie sur certaines cibles normalement activées par cette voie et empêche la mise en œuvre des mécanismes d'inhibition de prolifération cellulaire et d'induction de la différenciation qui lui sont associés (Ford et al., 2009). Cette mutation apparaît comme importante dans la pathologie en altérant les capacités de renouvellement et de survie des cellules pré-B (Hong et al., 2008).

BCR-ABL1/t(9;22)(q34;q11) est la mutation la plus fréquente dans les LAL-B de l'adulte, comptant pour un tiers des cas. Historiquement, c'est la première translocation identifiée. Elle se manifeste au caryotype par la présence du chromosome de Philadelphie (Nowell and Hungerford, 1960). La t(9;22) est le critère diagnostique des LMC mais est présente dans d'autres hémopathies malignes. BCR-ABL peut être générée suite à la fusion des deux gènes en différents points de cassures, menant à l'existence d'au moins 3 formes : p190 (majoritaire dans les LAL-B), p210 (majoritaire dans les LMC) et p230 (rare). BCR apporte à la protéine de fusion la propriété de dimérisation. Les homodimères BCR-ABL vont mimer une activation de la kinase ABL1, par rapprochement des domaines catalytiques et transactivation, provoquant ainsi l'allumage constitutif des voies de signalisation pro-oncogéniques en aval. L'hyperprolifération dû à la chimère BCR-ABL1 va dépendre des Rac-

GTPases, point de départ des autres cascades agissant sur la survie et la prolifération cellulaire (Thomas et al., 2008). BCR-ABL1 était associé à un très mauvais pronostic jusqu'au milieu des années 90. Un inhibiteur spécifique a été développé afin de bloquer l'activité tyrosine kinase (TK) de cet oncogène de fusion : l'imatinib mésylate (commercialisé sous le nom Glivec®) (Deininger et al., 2005). Cette molécule agit comme un inhibiteur de l'activité TK en occupant la poche catalytique d'ABL1. L'association de cet inhibiteur à la chimiothérapie améliore fortement le pronostic de la maladie.

D'autres translocations chromosomiques sont fréquemment retrouvées dans les LAL-B (les réarrangements *MLL* (11q23) et *E2A-PBX1* t(1;19)(q23;p13) notamment). Les anomalies caryotypiques les plus fréquentes sont présentées dans la **figure 19**.

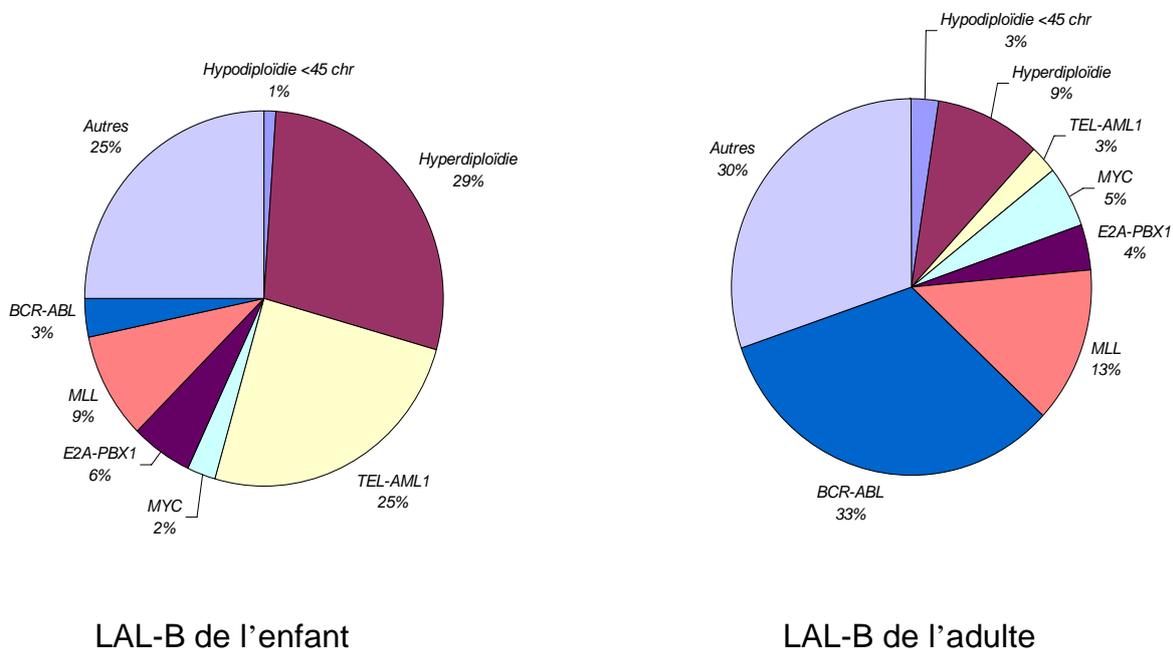


Figure 19 : Fréquences des différents profils génétiques des LAL-B de l'enfant et de l'adulte (d'après (Pui et al., 2004)).

b) Anomalies de nombre

Les anomalies de nombre touchent des chromosomes entiers, c'est-à-dire des milliers de gènes, et sont donc peu informatifs quant à la détermination des facteurs initiateurs de la leucémogénèse. Cependant, leur implication dans l'oncogénèse pourrait être associée à un défaut ou un excès de représentation allélique, ce qui modifierait l'expression de plusieurs gènes concourant aux mêmes fonctions (Andersson et al., 2005). Les outils technologiques pour étudier l'impact de ces milliards de combinaisons de dérégulation n'existent pas aujourd'hui.

Les hyperdiploïdies correspondent à un caryotype de plus de 50 chromosomes. Elles sont retrouvées chez 20 à 30% des enfants malades et chez 9% des adultes. Au même titre que les réarrangements TEL-AML1, ce type d'anomalies semble se développer *in utero* (Maia et al., 2003; Panzer-Grumayer et al., 2002). Cette anomalie ne correspond pas à un gain uniforme ou aléatoire mais à des gains préférentiels des chromosomes X, 4, 10, 14, 17, 18, et 21 (Paulsson et al., 2010). Ce caryotype est rarement associé aux translocations récurrentes productrices de gènes de fusion. Le seul profil informatif de cette classe d'anomalies est une triple trisomie 4,10 et 17 qui apparaît de bon pronostic. Des anomalies récurrentes comme les mutations ponctuelles de *FLT3*, *NRAS*, *PTPN11*, des microdélétions de *CDKN2A*, d'*ETV6*, de *PAX5*, et des anomalies structurales comme dup(1q) et i(17q) ont été associées à ces profils mais n'ont pas de valeur pronostique établie à ce jour (Paulsson and Johansson, 2009). De manière générale, les hyperdiploïdies sont de bon pronostic.

Les hypodiploïdies correspondent à un caryotype inférieur ou égal à 45 chromosomes. Ce sont des anomalies rares qui concernent moins de 5% des patients, seulement 1% si l'on considère ceux qui ont une ploïdie inférieure à 45 chromosomes (Harrison et al., 2004). Du fait de leur rareté, ces caryotypes particuliers sont moins documentés que les hyperdiploïdies. Il apparaît cependant que ce profil cytogénétique soit de mauvais pronostic (Nachman et al., 2007).

c) Anomalies de séquences

Ce groupe d'anomalies inclus les mutations ponctuelles, les délétions, et les amplifications partielles ou totales de gènes. Ces mutations sont souvent retrouvées en association avec des translocations récurrentes dans les LAL-B. De récents travaux montrent qu'elles représentent des événements notoires dans la progression de la pathologie, tant en terme d'agressivité qu'en terme de pronostic. Ces mutations incluent des délétions bialléliques de *CDKN2A* (codant pour p16^{ink4A} et p14^{arf}; (Stranks et al., 1995)), ce qui affecte les mécanismes de contrôle dépendants de p53 (Pui et al., 2004). Le groupe de James Downing a détecté des altérations de *PAX5* dans près de 40% des LAL-B de l'enfant, ce qui en fait la cible la plus touchée par les mutations somatiques dans cette pathologie (Mullighan et al., 2007). Dans ce travail fondateur, son groupe a également identifié d'autres altérations de facteurs essentiels au développement B, notamment *TCF3*, *EBF1*, *LEF1*, *IKZF1* (Ikaros) et *IKZF3* (Aiolos).

L'étude des altérations d'*IKZF1* a constitué une des avancées majeures des dernières années dans la prise en charge des LAL-B. Ce gène est délété dans près de 80% des LAL-B porteurs de la translocation *BCR-ABL* chez l'enfant (Mullighan et al., 2008), où la présence de *BCR-ABL* est de mauvais pronostic. Une autre catégorie de LAL-B à mauvais pronostic, indépendante de *BCR-ABL*, a été associée à la présence d'une délétion d'*IKZF1* (Den Boer et al., 2009; Mullighan et al., 2009a). D'autres travaux du groupe de Downing ont permis d'établir une relation entre l'altération d'*IKZF1*, des mutations activatrices des gènes des kinases *JAK1*, *JAK2* et *JAK3*, et la perte de *CDKN2A* (Mullighan et al., 2009b). L'activation de la voie JAK/STAT semble être un phénomène déterminant dans l'évolution de la pathologie et son mauvais pronostic. Pour étayer ces travaux, il a récemment été montré que le gène *CRLF2* était surexprimé suite à des translocations chromosomiques. Cette surexpression est associée à des mutations activatrices de *JAK1* et *JAK2*, ce qui conduit également à l'activation constitutive de la voie JAK/STAT (Mullighan et al., 2009b). Les LAL-B présentant ce profil ont aussi un profil évolutif plus sombre que celui de l'ensemble des LAL-B.

C. Les altérations de *PAX5* dans les LAL-B

Dans cette introduction, l'importance de *PAX5* dans l'ontogénie B a été largement évoquée. *PAX5* joue plusieurs rôles tout au long de la différenciation : répression des gènes incompatibles avec le développement B, implication dans les remaniements V(D)J et dans les mécanismes de CSR et de SHM. L'intégrité du gène *PAX5* apparaît donc essentielle au développement B et ses altérations sont en toute logique intimement liées au développement de la pathologie. De manière générale, et quelle que soit la nature de l'altération de *PAX5*, aucune corrélation pronostique n'a été établie. Les données citées dans cette partie se limitent aux travaux publiés avant 2007. Les résultats présentés dans ce manuscrit et des travaux ultérieurs ont apporté des informations importantes dans la caractérisation des altérations de *PAX5*. Ils seront discutés en fin de thèse.

1. Délétions de *PAX5*

Les délétions d'un allèle de *PAX5* sont les événements les plus fréquents parmi ses différents types d'altérations, retrouvées dans 27% des LAL-B (Mullighan et al., 2007). L'impact fonctionnel de cette altération est difficile à déterminer dans la mesure où les souris *Pax5*^{+/-} ont un phénotype normal (Urbanek et al., 1994). Cette délétion est aujourd'hui considérée comme un événement cumulatif dans le profil mutationnel, en coopérant avec

d'autres altérations. *PAX5* est notamment délété dans un tiers des LAL-B *BCR-ABL1* positives. Sachant que cette catégorie de LAL-B porte dans près de 80% des cas une altération d'*IKZF1*, il est probable que ces deux masters gènes coopèrent dans l'émergence de cette maladie. Il est par exemple évoqué que la délétion d'un allèle *PAX5* puisse favoriser l'apparition de la pathologie et que l'altération d'*IKZF1* puisse être liée au phénomène de chimiorésistance fréquemment retrouvé dans ce profil mutationnel (Mullighan, 2009).

2. Mutations ponctuelles de *PAX5*

Des mutations ponctuelles de *PAX5* ont été retrouvées chez 7% des patients et sont localisées soit dans le domaine de liaison à l'ADN, soit dans l'homéodomaine, ou dans le domaine de transactivation (Familiades et al., 2009; Mullighan et al., 2007). Ces mutations pourraient avoir une fonction dans la pathogénie en modifiant l'affinité de liaison de *PAX5* à ses cibles ou en perturbant sa capacité de recrutement des différents co-facteurs nécessaires à son activité transcriptionnelle (Mullighan, 2009; Mullighan et al., 2007) (**figure 20**).

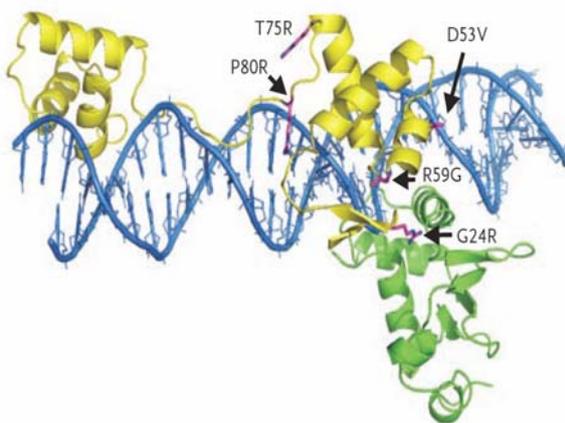


Figure 20 : Modélisation 3D de la fixation de *PAX5* à l'ADN. *PAX5* est représenté en jaune. Les 6 hélices du PBD sont figurées. Certaines mutations ponctuelles de la région N-terminale de *PAX5* (dont P80R qui est la plus fréquente) sont schématisées. Les mutations pourraient soit modifier l'affinité de liaison aux sites de fixation sur l'ADN, soit modifier l'association de *PAX5* et du facteur ETS1 (représenté en vert) (Mullighan et al., 2009a).

3. Les translocations chromosomiques impliquant *PAX5*

Les translocations chromosomiques impliquant *PAX5* (9p13) peuvent mener à sa surexpression suite à sa juxtaposition au voisinage de l'enhancer *E μ* (Busslinger et al., 1996; Iida et al., 1996). La translocation t(9;14)(p13;q32) est retrouvée dans des LDGC et correspond à un défaut d'extinction de l'expression de *PAX5*, condition nécessaire à la différenciation plasmocytaire (Nera et al., 2006).

Les réarrangements de *PAX5* peuvent également mener à la production de gènes de fusion, phénomènes associés à 2% des LAL-B (Mullighan et al., 2007). Dans les LAL-B, les

blastest sont bloqués à un stade précoce de la différenciation. Dans cette pathologie, *PAX5* est retrouvé fusionné avec *ELN* (7q11) (Bousquet et al., 2007), *ETV6* (12p13) (Cazzaniga et al., 2001), *FOXP1* (3p13) (Mullighan et al., 2007), *AUTS2* (7q11) (Kawamata et al., 2008), *PML* (15q24) (Nebral et al., 2007), *ZNF521* (18q11)(Mullighan et al., 2007), et *C20orf112* (20q11) (Kawamata et al., 2008). Dans tous les cas, la partie 5' de *PAX5* est conservée et s'associe à la partie 3' du partenaire de fusion. Les protéines chimériques *PAX5-ELN*, *PAX5-FOXP1* et *PAX5-ZNF521* sont capables d'inhiber de manière compétitive la transcription de CD19 dépendante de *PAX5*. Elles ont également la capacité de se lier aux mêmes sites de régulation (Bousquet et al., 2007; Mullighan et al., 2007).

Les deux types de translocations chromosomiques présentés ici illustrent deux des différents mécanismes clés associés à *PAX5* : son extinction pour permettre la différenciation plasmocytaire, et sa fonctionnalité pour permettre l'avancée en différenciation.

V. Expérimentation

A. Problématiques

Au cours de cette introduction, j'ai évoqué plusieurs notions essentielles associées au développement de la lignée B et des leucémies aiguës. J'ai souligné que les dosages et le panel d'expression des facteurs de transcription majeurs apparaissent déterminants dans la régulation de l'hématopoïèse normale. En toute logique, les dérégulations de ces paramètres peuvent conduire à une hématopoïèse déséquilibrée, susceptible de se manifester par l'émergence d'une leucémie. En 2007 au sein de notre laboratoire, des travaux menés par Marina Bousquet ont conduit à l'identification du gène de fusion *PAX5-ELN* (Bousquet et al., 2007). La démonstration de l'effet de compétition inhibitrice du produit de ce gène sur l'activité transcriptionnelle de *PAX5* sauvage a mis en avant un mécanisme oncogénique potentiel de ce type de mutation. L'étude pan génomique conduite en 2007 par Charles Mullighan sur une cohorte d'enfants atteints de LAL-B a permis d'identifier *PAX5* comme le gène le plus fréquemment muté dans ces pathologies (Mullighan et al., 2007). L'étude ciblée sur *PAX5* menée par Julien Familiades a permis de confirmer ce résultat chez l'adulte (Familiades et al., 2009). Lors de la définition de notre projet, 7 types de gènes de fusion l'impliquant avaient été décrits. Le nombre de patients porteurs de telles anomalies était trop faible pour en tirer quelques conclusions que ce soit quant à leur participation au phénotype leucémique. Bien évidemment, l'importance de *PAX5* dans la différenciation B précoce rend très probable la contribution des ces anomalies dans ces LAL-B. Cependant, du fait de leur rareté et de leur nouveauté, aucune caractérisation précise de l'implication des fusions de *PAX5* n'avait été menée.

Nous avons donc construit un cheminement expérimental afin de répondre à plusieurs interrogations :

- i) ***PAX5 étant situé en 9p13, dans quelles proportions est-il remanié ou délété chez ces patients ?***

D'un point de vue clinique, les délétions et les remaniements du bras court du chromosome 9 (9p) sont retrouvés dans près de 10% des LAL-B. Répondre à cette question apparaît nécessaire pour mieux cerner les mécanismes oncogéniques associés à la leucémogénèse. L'ensemble des études fonctionnelles portant sur *Pax5* au cours des 15 dernières années, mis en parallèle avec ce résultat,

procurerait des bases cliniques dans la compréhension des mécanismes liés à l'apparition des LAL-B.

ii) Les remaniements de PAX5 sont-ils associés à d'autres anomalies canoniques des LAL-B ?

En se basant sur le modèle de Greaves de cumul d'événements oncogéniques nécessaires à l'émergence de la pathologie, il s'agit de définir ici si les réarrangements de *PAX5* apparaissent comme des événements initiateurs ou comme des événements secondaires dans ces leucémies. Concrètement, si l'altération de *PAX5* est secondaire nous devrions retrouver chez ces patients des profils d'altérations chromosomiques comparables à ceux décrits dans l'ensemble des LAL-B.

iii) Quelles similitudes présentent les différents partenaires de fusion de PAX5 ?

La réponse à cette question vise à déterminer si les gènes partenaires de fusion de *PAX5* sont susceptibles d'apporter une contribution fonctionnelle particulière, par leurs structures ou leurs fonctions, à la protéine chimérique. Cette contribution pourrait potentialiser la chimère composée de *PAX5* et participer ainsi à son rôle oncogénique.

iv) Quels sont les impacts oncogéniques de l'expression des chimères de PAX5 ?

Les LAL-B se caractérisent par deux paramètres : une prolifération excessive de lymphocytes, et un blocage de leur différenciation à un stade précoce (pré-B en général). Afin de proposer un modèle de transformation leucémique associé aux fusions de *PAX5*, il apparaît crucial de déterminer les impacts inhérents à l'expression de tels mutants sur ces deux paramètres.

B. Démarches expérimentales

1. Vue d'ensemble

Grâce au concours du Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH), nous avons récupéré du matériel moléculaire pour 153 patients atteints de LAL-B et porteurs d'une anomalie caryotypique touchant le bras court du chromosome 9 (9p). Nous avons procédé à la description des profils cytogénétiques pour chaque cas, profils que nous avons ensuite mis en parallèle avec l'analyse du statut du locus de *PAX5* (intact, remanié, ou délété).

Pour les patients présentant un point de cassure au sein du gène *PAX5*, nous avons recherché l'existence d'un potentiel ARNm de fusion afin d'identifier le gène partenaire. Enfin, certaines fusions ont fait l'objet d'analyses fonctionnelles dans un système *ex vivo* de différenciation B murin inductible.

2. Mise en place des outils de biologie moléculaire

a) Techniques associées à l'ADN polymérase Phi29

L'ADN polymérase Phi29 (29) est une polymérase mésophile responsable de la réplication de l'ADN du phage phi29 *Bacillus subtilis*. Cette polymérase a été identifiée il y a plus de 25 ans (Blanco and Salas, 1984; Watabe et al., 1984) et présente des caractéristiques exceptionnelles. La 29 fonctionne de manière optimale à 30°C, est capable de déplacement de brin et de générer des fragments de plus de 100kb à partir d'une matrice d'ADN circulaire. De plus, sa très haute fidélité permet de rechercher des mutations ponctuelles sur son produit d'amplification. Brevetée en 2002, elle a été entre autres à la base des kits d'amplification d'ADN TempliPhi® et GenomiPhi® (Amersham GE). Ses propriétés remarquables nous ont servi de base pour mettre en place différentes stratégies utiles à notre projet.

(1) Production de sondes BAC

Afin de tester l'implication de différents loci par FISH sur chromosomes métaphasiques, nous avons eu besoin de produire de nombreuses sondes fluorescentes spécifiques des régions d'intérêt. Les sondes fluorescentes sont produites à partir des matrices BAC (Bacterial Artificial Chromosome ; des fosmides seront aussi utilisés dans cette étude, le principe est le même mais l'insert ne fait que de l'ordre de 20-30kb). Les BAC sont des bactéries contenant des plasmides (pBAC) de 70 à 250 kb contenant des séquences d'ADN génomique humain cartographiées sur le génome. Il existe plusieurs librairies de plasmides BAC dont les plus couramment utilisées dans nos travaux sont les RP11 et les CTD (Roswell Park 11 et Caltech-D respectivement). Ces librairies sont stockées en plaques 384 puits ; derrière le préfixe RP11 ou CTD, sont indiquées les références de stockage des BACs (ex : RP11-numéro de plaque/colonne/ligne). La définition des BACs d'intérêt se fait comme indiqué dans la **figure 21**. Les BACs dont nous avons besoin pour cette étude nous ont été fournis par Roland Heilig (Genoscope, Evry). Nous avons utilisé une technique de production de sondes basée sur l'utilisation de la 29. Schématiquement, la production de sondes pour FISH se fait en 4 étapes : amplification de la bactérie contenant le pBAC, purification de l'ADN, marquage par nick-translation et validation de la sonde sur chromosome

métaphasique. Cette technologie, détaillée dans l'article (protocole en Annexe#1), nous a permis de gagner en temps et en simplicité par rapport à l'amplification classique d'ADN pBAC par maxiprep.

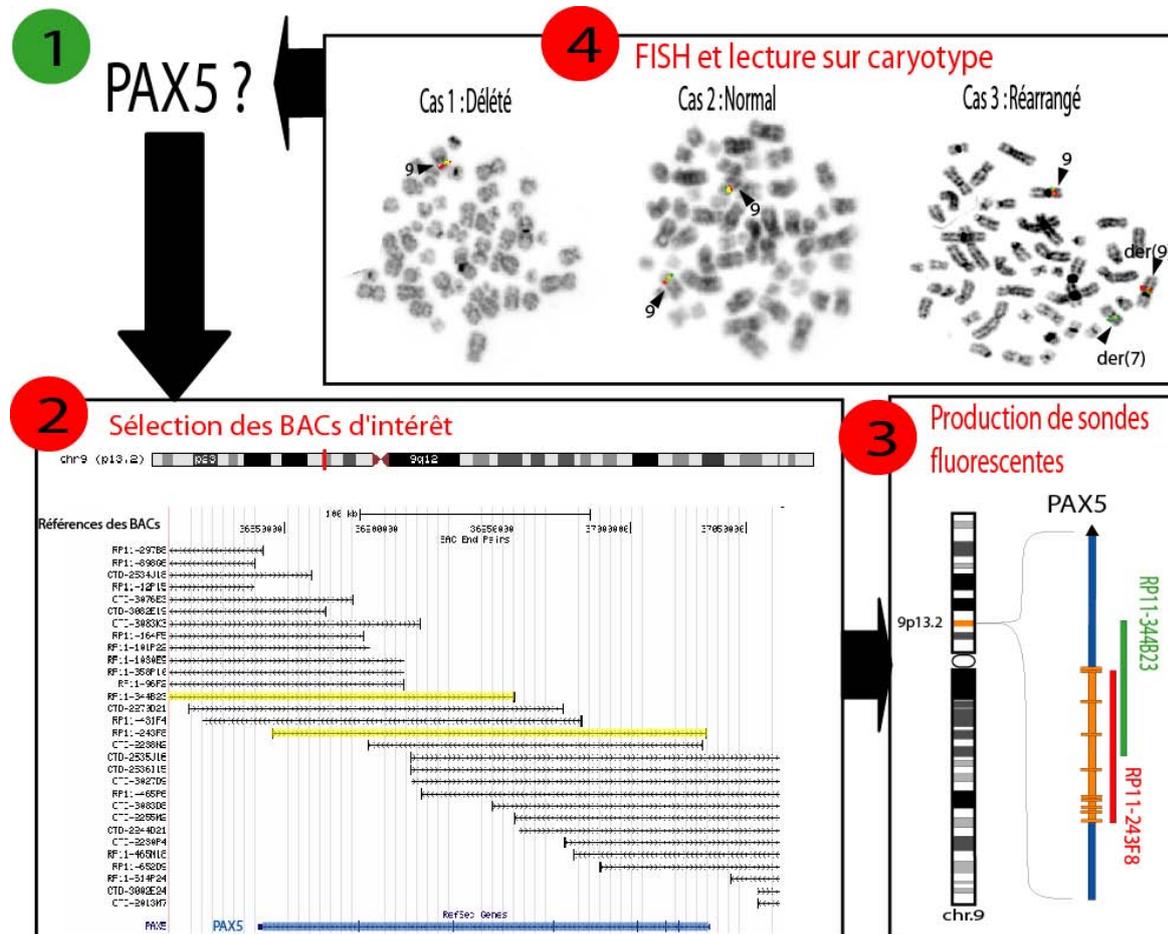


Figure 21 : Méthode de sélection de BACs spécifiques d'un gène d'intérêt : Exemple de *PAX5*. 1 : Quel est le statut du locus *PAX5* ? ; 2 : Sélection des BACs informatifs (<http://genome.ucsc.edu/>). 3 : Production des sondes fluorescentes spécifiques de *PAX5*. RP11-243F8 = sonde centromérique marquée avec des dUTP-tétraméthylrhodamine (rouge), RP11-344B23 = sonde télomérique au dUTP-fluorescéine (verte). 4 : Hybridation des sondes sur chromosomes métaphasiques de patients ; Cas 1 : Perte des signaux des deux sondes sur un chromosome = délétion d'un allèle ; Cas 2 : conservation des deux signaux de fluorescence sur les 2 allèles = locus de *PAX5* non impliqué dans le remaniement ; Cas 3 : Perte du signal vert sur un des deux chromosomes 9 = point de cassure dans le locus de *PAX5*, possibilité d'un gène de fusion.

En partant directement d'une faible quantité du stock bactérien ou de quelques nanogrammes d'ADN plasmidique purifié en miniprep, l'utilisation d'amorces aléatoires exorésistantes pour la réaction de RCA (activité de l'enzyme 29) permet de produire des quantités importantes d'ADN plasmidique. La purification de l'ADN produit par ce système n'est pas indispensable dans la mesure où elle n'améliore pas considérablement la qualité de la sonde. Cette technique permet donc de réduire le temps de production d'ADN pBAC et la logistique en ramenant le volume réactionnel à 50µl (contre 0,5-1L pour les maxipreps), ce qui autorise la production simultanée de nombreuses sondes.

(2) Réhabilitation de matériel de patient pour la recherche de mutations ponctuelles

La 29 est capable d'amplifier de l'ADN circulaire ou de l'ADN linéaire. Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés aux éventuelles mutations de l'allèle non remanié de *PAX5*, en particulier pour les patients présentant un point de cassure interne (donc une possible fusion) sur l'autre allèle. Nous avons été confrontés au défaut de matériel génomique pour effectuer ces investigations pour de nombreux patients. Nous avons donc développé un protocole de récupération de matériel cytogénétique, c'est-à-dire de chromosomes métaphasiques fixés sur lame ou de culots cytogénétiques (culots produits par choc hypotonique des cellules avec du KCl, puis repris dans un mélange de ¼ méthanol ¾ acide acétique). Brièvement, ces chromosomes sont resolubilisés par un tampon de lyse directement déposée sur lame de verre où ils sont étalés. L'ADN est resuspendu sur la nuit en milieu humide (à 37°C en conditions optimales). Puis, les chromosomes sont récupérés par grattage de la lame et précipités à l'isopropanol en présence de NaOAc de manière classique. L'ADNg ainsi récupéré sert ensuite de matrice à une réaction de RCA en suivant le même protocole que celui utilisé pour l'amplification des BACs (Annexe#1). Nous avons pu générer ainsi suffisamment de matériel de bonne qualité pour effectuer ces expériences de HRM (puis de PCR suivies de séquençages) nécessaires pour caractériser le statut mutationnel du locus non remanié (protocole détaillé dans l'article en Annexe#3, données non incluses à notre article). Nous avons également testé la possibilité d'utiliser ce mode d'amplification pour analyser ces échantillons sur puce SNP-CGH. L'amplification du génome par la 29 ou les traitements subis par les chromosomes pour l'analyse cytogénétique introduit un biais d'amplification de certaines régions, rendant impossible l'interprétation des données. La 29 permet donc de générer des quantités suffisantes d'ADNg pour mener des recherches de mutations ponctuelles à partir de chromosomes métaphasiques déshydratés hybridés sur lames de verre.

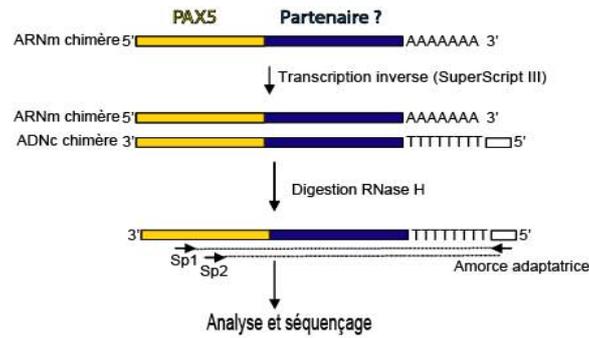
Cette technique rend donc envisageable des études rétrospectives sur de larges cohortes de patients dont on considérait que le matériel était inexploitable.

(3) Recherche de d'ARNm de fusion contenant PAX5 : RCA-RACE

L'identification de gènes de fusion nécessite la détection d'ARNm de fusion contenant une partie connue, ici *PAX5*, et un partenaire de nature inconnue. Il n'est donc pas possible d'amplifier de tels produits par technique classique de transcription inverse suivie de PCR. La technique de biologie moléculaire la plus courante pour répondre à cette problématique est la RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) (**3'RACE ; figure 22.a**). Cette approche théoriquement efficace peut produire un large éventail de produits non spécifiques, rendant très ardue en pratique l'identification du produit de fusion d'intérêt. L'amplification non spécifique associée à l'utilisation de la RACE est inhérente à l'utilisation d'une amorce adaptatrice complémentaire d'une séquence ajoutée à une extrémité de tous les ARNm présents dans les cellules. Cette amplification sera donc semi-spécifique dans la mesure où seule une amorce sera complémentaire de la séquence connue du produit de fusion. Afin de contourner ce problème, nous avons développé la technique de RCA-RACE (Polidoros et al., 2006). La RCA-RACE consiste à amplifier des produits contenant une séquence inconnue et une séquence connue avec des amorces spécifiques en sens et en anti-sens (**figure 22.b**). La RCA-RACE consiste à rétro transcrire l'ARNm à l'aide d'une amorce oligo-dT porteuse d'un groupement phosphate en 5'. Après la synthèse de l'ADNc, les ARNm seront digérés par un traitement à la RNaseH. L'ensemble des ADNc générés sera circularisé grâce à CircLigase (Epicentre). Cet enzyme a la propriété de circulariser sur elle-même des molécules d'ADN simple brin, sans nécessiter de dilution limite. Les matrices circulaires ainsi créées (autant de séquences différentes que d'ARNm présents dans les cellules) seront amplifiées grâce à la

29. Cette amplification s'effectue par l'intermédiaire d'une amorce exo-résistante (c'est-à-dire porteuse de 2 liaisons phosphorothioates entre ses 3 bases 3') de séquence complémentaire à celle du gène cible connu. La très forte processivité de la 29, associée à sa capacité de déplacement de brin, lui permet de tourner autour de cette matrice en polymérisant un brin d'ADN linéaire correspondant à la répétition de la séquence de l'ADNc circulaire ciblée par l'amorce. Le brin d'ADNc « concaténé » issu de cette amplification servira de matrice pour des réactions de PCR avec deux amorces orientées en sens opposé, spécifiques du gène connu. Cette approche nous a permis de systématiser l'identification de nouveaux partenaires de fusion de *PAX5* avec une efficacité accrue par rapport à la RACE (protocole détaillé en Annexe#2).

a. 3' RACE



b. RCA-RACE

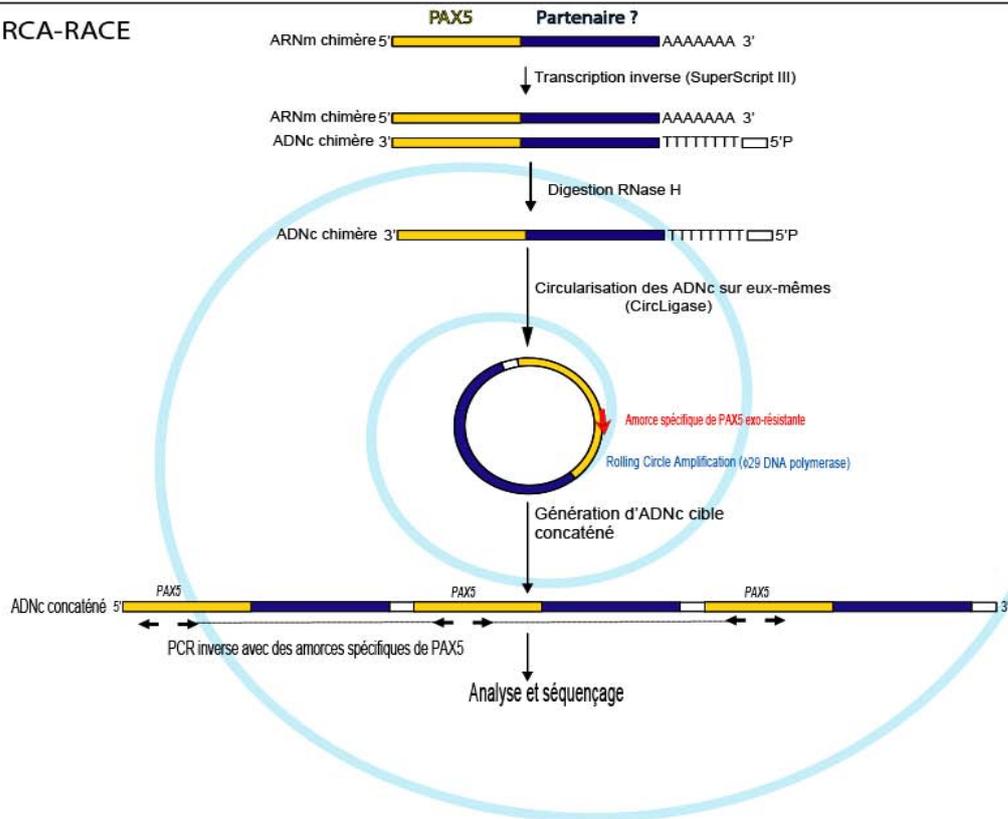


Figure 22 : Principales étapes techniques de RACE classique et de la RCA-RACE. En jaune est figurée la séquence de *PAX5*. En bleu, la séquence du partenaire inconnu. **a :** 3'RACE ; Sp1 et Sp2 symbolisent des amorces spécifiques de *PAX5*. Le rectangle blanc symbolise la séquence adaptatrice ajoutée à tous les ADNc. Les pointillés montrent les PCR réalisées, la première Sp1/amorce adaptative, et une seconde semi-nichée Sp2/amorce adaptatrice sur les produits de la première. **b :** RCA-RACE . La spirale bleue symbolise le produit de l'amplification en cercle roulant. Ce même produit est schématisé en dessous sous l'appellation d'ADNc concaténé.

3. Travaux publiés – le statut du locus *PAX5* dans les LAL-B

Dans cet article, nous répondons à plusieurs questions développées dans notre problématique. Nous avons évalué le taux d'implication de *PAX5* dans les réarrangements 9p des LAL-B. De plus, nous avons caractérisé la nature de ces implications et identifié de nouveaux partenaires de fusion. Le rapprochement du statut du locus de *PAX5* avec le profil des anomalies canoniques nous a également permis d'avancer des hypothèses quant aux impacts oncogéniques des fusions de *PAX5*. Cet article, mis en parallèle avec les travaux conduits par Julien Familiades sur l'étude des mutations de *PAX5* dans les LAL-B de l'adulte ((Familiades et al., 2009); Annexe#3), apporte un éclairage nouveau sur les associations de mutations et ouvre des pistes intéressantes vers la compréhension des mécanismes oncogéniques associés aux mutations des *PAX5*.

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 new 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 (≤ 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 fosmids G248P85962F9 (exon1) and G248P82268A1 (exon10; CHORI). Positioning of probes relative to *PAX5* is depicted in Figure 1.

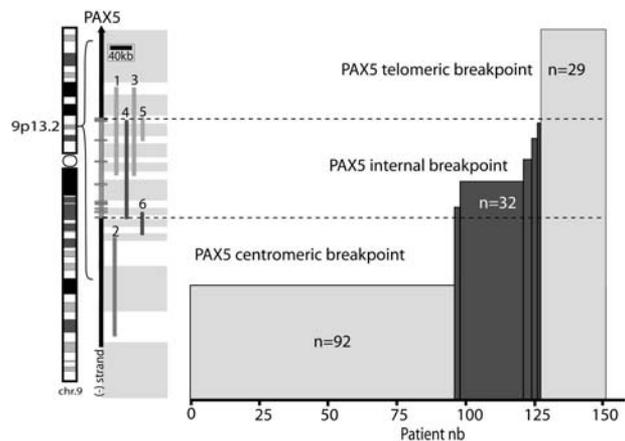


Figure 1. Repartition of breakpoints on chromosome 9p arm. Location of *PAX5* on chromosome 9 (left). A schematic of *PAX5* genomic structure (right); rectangles represent exons. (1-6) Probes used for FISH analyses: telomeric and centromeric Dako commercial probes (1,2), RP11-344B23 (3), and RP11-244F8 (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'-CCCTGTCCATTCCATCAAGTCTG-3', *DACH2-928R*: 5'-TGTTAGCAGGTGGTCTGCTGC-3', *NCoR1-7605R*: 5'-GAGATCCTCTCCTGCACCCTG-3', *GOLGA6-2134R*: 5'-ACGCAGGGTTGCTGGGCAAGC-3', *ELN-2297R*: 5'-ATGAGTCTGTGAGTCAGGGGTC-3', *JAK2-4020R*: 5'-CACATCTTGTCTGCTAGCATATG-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 CircLigase 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: *ATGGGCTCTCTGGCTATCTCAGG* 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/MLL3* 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).

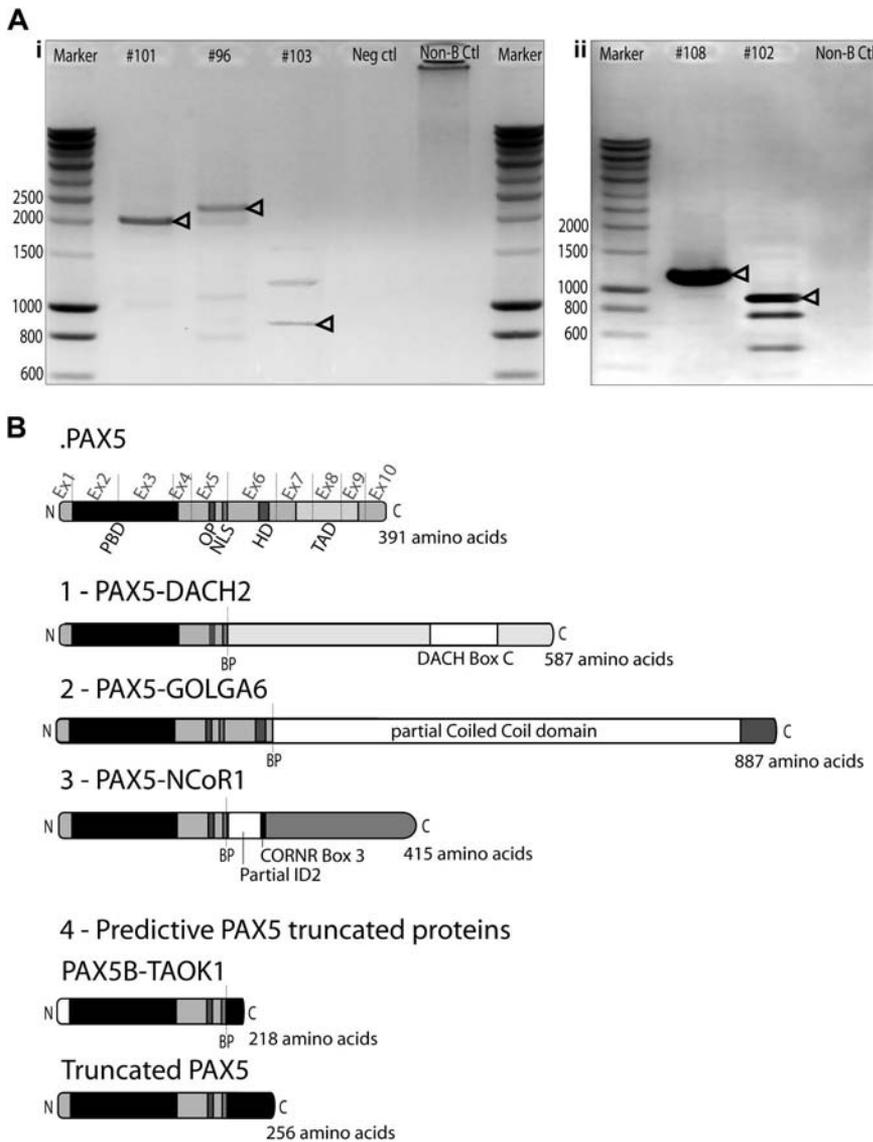


Figure 2. Cloning of novel PAX5 fusion partners by RCA-RACE. (A) RCA-RACE products were run on 1% agarose gel. Bands corresponding to amplified transcripts of fusion (i) or truncated genes (ii) are indicated by arrowheads. Additional bands correspond to amplification of fragments of wild-type PAX5 DNA. (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

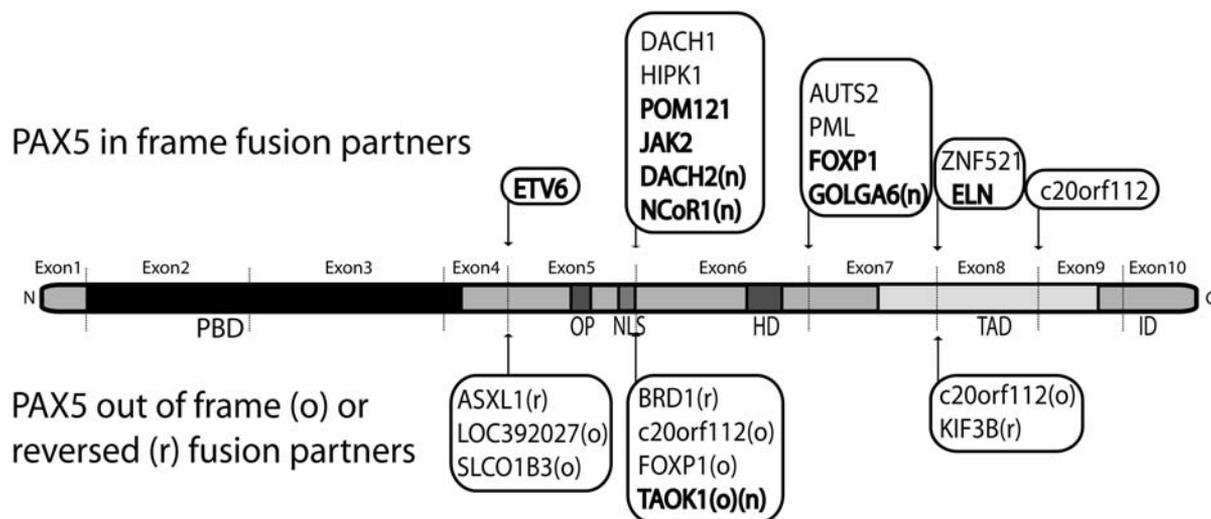


Figure 3. 3'-PAX5 fusion partners in B-ALL. Partners previously described (references in supplemental Table 5) and detected in our series are indicated in bold, new PAX5 fusion partners are highlighted with an "n." In-frame PAX5 fusions are indicated on the upper side. Fusion partners in reverse orientation (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

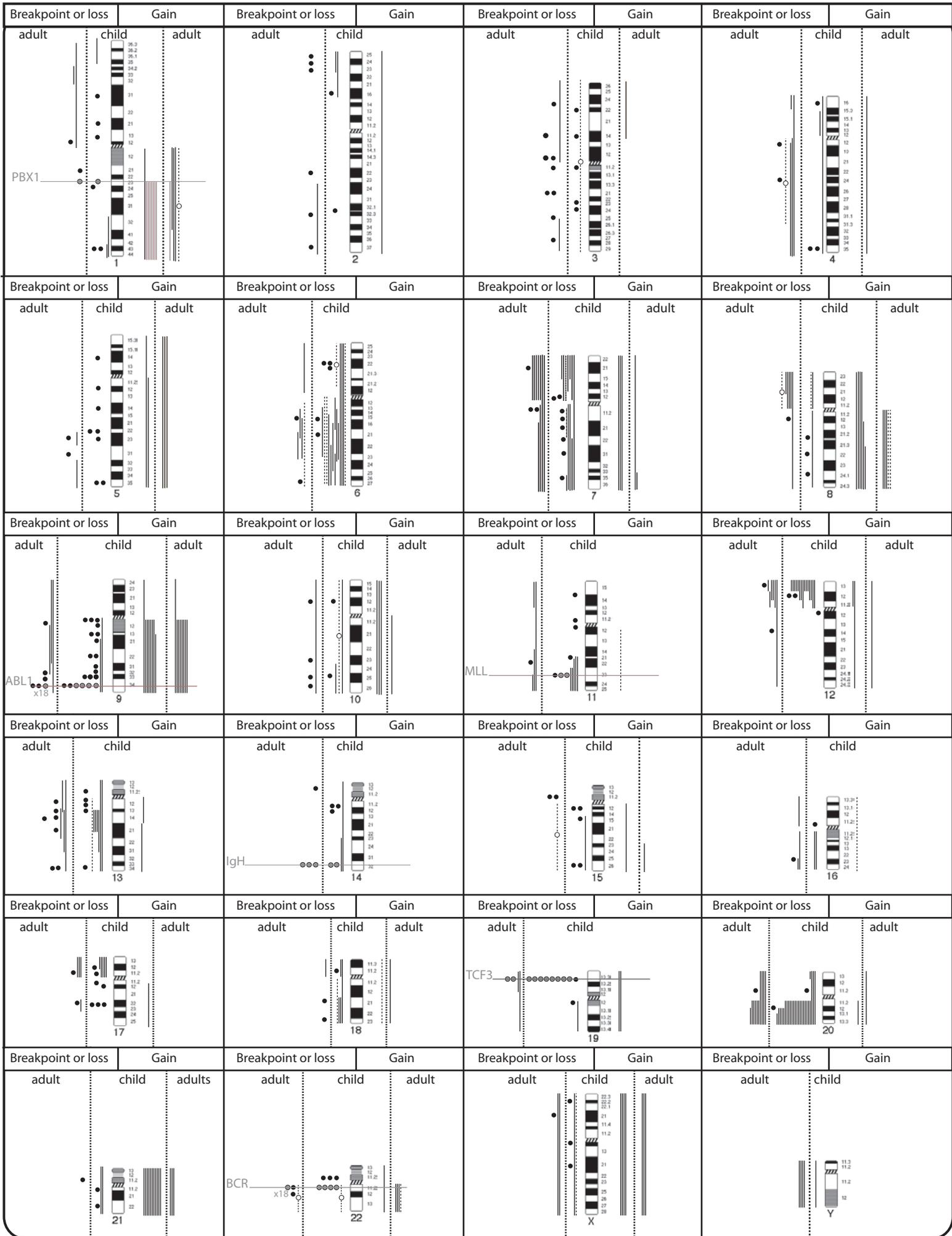
Patient ID	Age years	Gender	EGIL classification	Karyotype	molecular diagnostic	PAX5 FISH probe profile	PAX5 Molecular abnormality
				centromeric breakpoints (n=92)			
1	8	F	ALL B-II	46,XX,del(9)(p12)[15]/46,XX[4]		del	
2	12	M	ALL B-III	46,XY,del(9)(p13)[28]/46,XY[21]		del	
3	26	F	ALL B-III	46,XX,del(9)(p12)[17]/46,XX[6]		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,del,+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,del,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,del,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],del,del,del(16)(p33p37)/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,del,+21[5]/46,XY[2]		del	
33	4	F	ALL B-II	46,XX,add(12)(p13),del(19)(q12)[14]/46,del,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,del,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,del,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;q21),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,del,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)(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,del,+12[2]/46,XY[8]		del, pres	
45	44	M	ALL B-III	48,XY,-10,+3mar[cp3]/48,del,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,del,+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,del(6)(q?) [4]/46,del(1)(4:4)(q2;q2),der(16)(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)(9:13)nv(9)(p12q32),der(13)(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,del,t(17)(q10)[2]/46,del(9)(p11)2]/46,del(2,-21,+mar[2]		del	
50	3	F	ALL B-II	45,XX,der(1)(1:3)(p?:q?),der(3)(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)(?: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)(9:17)(p13;q22),-19[3]/46,XX[2]		pres	
52	2	F	ALL B-III	45,XX,del(6)(p22),der(9)(7:6)(p11;p25)t(6:17)(p22;q22)(9:17)(p1:q25),del(13)(q13q21),der(17)(7:17)(q22;q22),ins(18:7)(p11;p11q21),del(20)(q12),der(22)(7:22)(q2q13:pter)[11]/45,del,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,del,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)(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)(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;p12p11)[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)(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)(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)(2:9)(p23;p21),der(7)(2:7)(p24;p15),der(9)(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)(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,del(8)(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::9p11),der(22)t(9:22)[8]/45,del,dic(8:17)(p11;p11)[11]/46,XY[1]	BCR/ABL1	del	
73	54	M	ALL B-III	46,XY,+7,der(9)(9:22)(q34;q11),der(11:22)(?:q?),der(22)t(9:22)[7]/44,sl,der(2)(2:3)(q24;q25)del(3)(q?),-8,-9[4]/46,sl,der(7)(7:9)(p11:?) [2]/44,del(1),-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,del,-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)(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,del,+22,+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)(q15q24)[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)(q16q23),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),t(11)(p22;q23).-13,add(18)(q?),+der(7)(?:q?)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->2q32::3::9),der(3)(3:2)(?:q?),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)(?:q?)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)(q22q24),dic(9:16)(p12;q11).-14,+der(7)(?:q?)t(9:13)(p13)[9]/45.idem.del(11)[16]		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)(q22q34)[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;?:)(?:q?)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?1q2?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)(p21q34).+19,+21,+21,+2mar[17]/46.XY[3]		pres	
138	59	F	ALL B-II relapse	47.XX,t(4;9)(q24;p21),add(14)(p12).?der(18).+amin[17]/46-47.idem.-7 or del(7)(q21qter)[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)(p21q43),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	

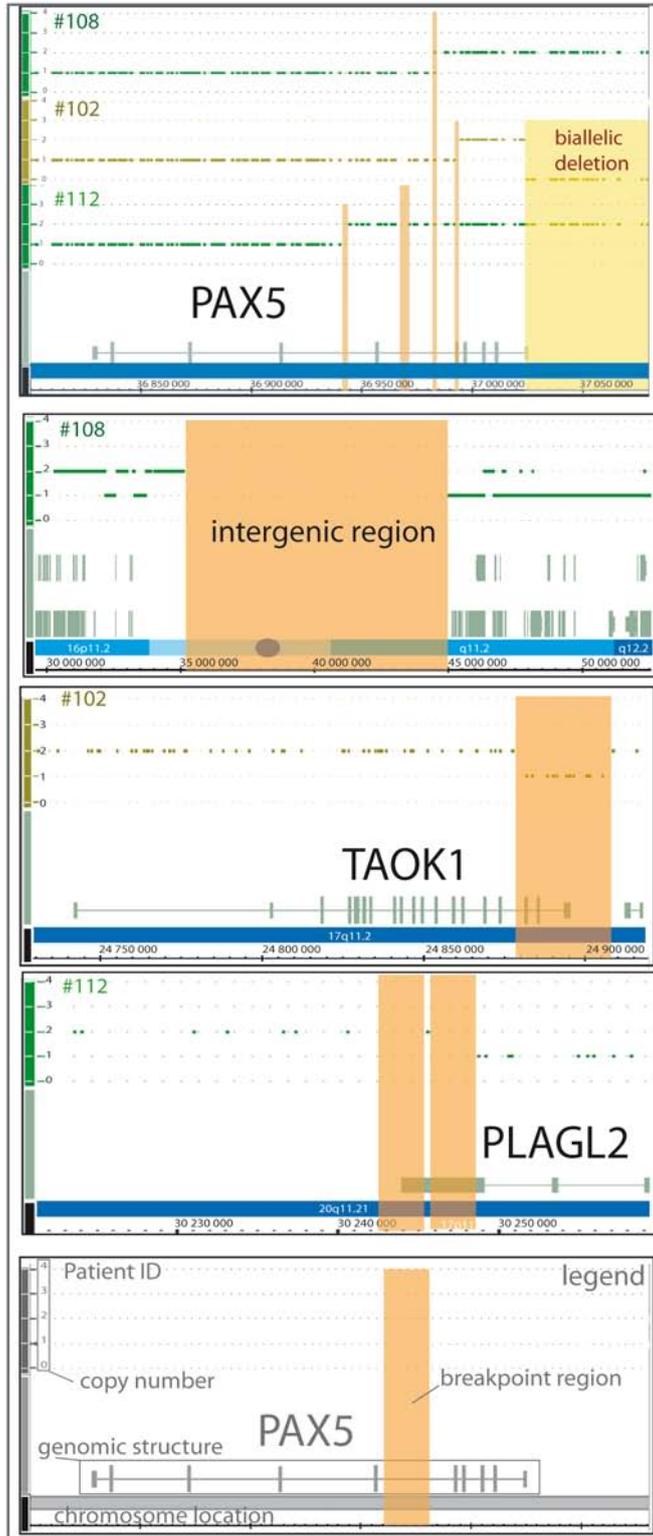
	nucleotide sequence	predictive fusion protein sequence
PAX5-DACH2	<p>...ACCCAACCAACCAGTCCCAGCTTCCAGT CACAGCATAGTGTCCACTGGCTCCGTGACG CAGGTGTCCTCGGTGAGCACGGATTCGGC CGGCTCGTCTACTCCATCAGCGGCATCCT GGGCATCACGTCCCCAGCGCCGACACCA ACAAGCGCAAGAGAGACGAAGGTATAACA GCTGCAGCGATGGCTGAGGCGATGAACTT CAGAAGATGAAGCTTATGGCTATGAACACTC TTCAGGGAAATGGAAGCCAAAATGGGACCG AATCAGAGCCTGATGATCTTAATTCTAACAC AGGTGGAAGTG...</p>	<p>MDLEKNYPTPRTSRTGHGGVNLGGVFNDRPLP DVVRQIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILG RYYETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVEKIAEYKRQN PTMFAWEIRDLLAERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKV QPPNPVPPASSHSIVSTGSVTQVSSVSTDSAGSS YSISGILGITSPSADTNKRKRDEGITAAMAAMKMLQ KMKLMAMNTLQGNQNGTESEPDDLNSNTGGSE SSWDKDKMQSPFAAPGPQHGAHAALAGQPGIGGA PTLNPLQQNHLLTNRLDLPFMMMPHLLPVSLPPAS VAMAMNQMNHLNTIANMAAAQIHSPLSRAGTSVIK ERIPESPSPAPSLEENHRPGSQTSSHTSSSVSSPS QMDHHLERMEEVPVQIPIMKSPLDKIQLTPGQALPA GFPGFIFADSLSSVETLLTNIQGLLKVALDNARIQEK QIQQEKELRLELYREREIRENLERQLAVELQSRRT MQKRLKKEKTKRKLQEALEFESKRREQVEALKQ ATTSDSGLRMLKDTGIPDIEIENNGTPHDSAAMQGG NYYCLEMAQQLYSA</p>
PAX5-NCOR1	<p>...ACCCAACCAACCAGTCCCAGCTTCCAGT CACAGCATAGTGTCCACTGGCTCCGTGACG CAGGTGTCCTCGGTGAGCACGGATTCGGC CGGCTCGTCTACTCCATCAGCGGCATCCT GGGCATCACGTCCCCAGCGCCGACACCA ACAAGCGCAAGAGAGACGAAGCAGCTGCT CAGCCAGGAAGTGGATCTTTAATCTGCCA GCAGTACTACGTCAGGCTCAGTTAGCTCTA GAGGCCATTCTTTGCTGATCCTGCCAGTAA TCTTGGGCTGGAAGACATTATCAGGAAGGC TCTCATGGGAAGCTTTGATGACAAAAGTTGAG GATCATGGAGTTGTCATGTCCCAGCCTATG GGAGTAGTGCCTGGTACTGCCAACACC...</p>	<p>MDLEKNYPTPRTSRTGHGGVNLGGVFNDRPLP DVVRQIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILG RYYETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVEKIAEYKRQN PTMFAWEIRDLLAERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKV QPPNPVPPASSHSIVSTGSVTQVSSVSTDSAGSS YSISGILGITSPSADTNKRKRDEAAAQPGTEIFNLPA VTTSGSVSSRGHSFADPASNLGLEDIIRKALMGSD DKVEDHGVVMSQPMGVVPGTANTSVVTSGETRRE EGDPSPHSGGVCKPKLISKNSNRKSKSPIPGQGYLG TERPSSVSSVHSEGDYHRQTPGWAWEDRPSSTGS TQFPYNPLTMRMLSSTPPTPIACAPSAVNQAAPHQ QNRIVEREPAPLLSAQYETLSDSD</p>
PAX5-GOLGA6	<p>...CAGGTGTCCTCGGTGAGCACGGATTCGG CCGGCTCGTCTACTCCATCAGCGGCATCC TGGGCATCACGTCCCCAGCGCCGACACC ACAAGCGCAAGAGAGACGAAGGTATTCA GGAGTCTCCGGTGCCGAACGGCCACTCGC TTCCGGCGAGAGACTTCTCCGGAAGCAG ATGCGGGGAGACTTGTTCACACAGCAGCA GCTGGAGGTGCTGGACCGCGTGTGTTGAGA GGCAGCACTACTCAGACATCTTACCACCA CAGAGCCCATCAAGCCCAGCAGAGCCAG TACCAAGAACTAGCAGTAGCCCTGGAGTCA AGCTCAGTGACAATCAGTCAACTCAATGAAA ACATAGAATCATTGAAACAGCAGAAGAAACA AGTGAACATCAGCTGGAAGAAGCAAAGAA AACAAACAATGAAATACACAAAGCACAAATG GAGCGGTTAGAGACAATCAACATCCTCACAT TGGAAAAGGCAG...</p>	<p>MDLEKNYPTPRTSRTGHGGVNLGGVFNDRPLP DVVRQIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILG RYYETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVEKIAEYKRQN PTMFAWEIRDLLAERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKV QPPNPVPPASSHSIVSTGSVTQVSSVSTDSAGSS YSISGILGITSPSADTNKRKRDEGIQESVPPNGHSLP GRDFLRKQMRGDLFTQQQLEVLDRVFERQHYSDF TTTEPIKPEQSQYQELAVALESSSVTISQLNENIESLK QQKKQVEHQLEEAKKTNNEIHKQMERLETINILTLE KADLKTTLYHTKRAARHFEEESKDLAQLQYSLQRI QELERALCAVSTQQQEEDRSSSCREAVLQRWLQ TIKERALLNAHVTVTEESLQKQVLERDEYAKHIKGER ARWQERMWKMVSVEARTLKEEKKRDIHRIQELERSL SELKNQMAEPPSLAPPVAVTVEVLEQDEAKHLRQE VEGLEGLQSQVENNQALSLLSKEQKQRLQEQEEM LREQEAQRVREQERLCEQNERLREQQKTLQEQGE RLRKQEQRLRKQEERLKEEERLQKQEKRLWDQE ERLWKKEEERLQKQEERLALSQNHKLDKQLAEPQCS FEDLNNEKKSALQLEQQVKELQEKLEDEHLEAASH QNQQLETQLSLVALPGEEDGGQHLDESEEEAPRPT PNIPEDLESREATSSFMDLPKEKADGTEQVERRELG FVQPSGVTGDMRESFTVYESQGAVPNTRHQEMED VIRLAQKEEEMKVKLELQELVPLVGNHEGHGKFLI AAQNPADPTPGAPAPQELGAAGEQDVFYEVSLDN NVEPAPGAAREGSPHDNPTVQQIVQLSPVMQDT</p>
PAX5-TAOK1	<p>...AGTGTCCACTGGCTCCGTGACGCAGGTG TCCTCGGTGAGCACGGATTCGGCCGGCTC GTCGTAATCCATCAGCGGCATCCTGGGCAT CAGTCCCCAGCGCCGACACCAACAAGC GCAAGAGAGACGAAGGAACTATAGGAAATA GAGGAAAATCTACAGGCCTATGGTCCAGA</p>	<p>MEIHCKHDPFASMHGHGGVNLGGVFNDRPLP DVVRQIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILG RYYETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVEKIAEYKRQN PTMFAWEIRDLLAERVCDNDTVPSVSSINRIIR TKVQPPNPVPPASSHSIVSTGSVTQVSSVSTDSA GSSYSISGILGITSPSADTNKRKRDEGTIGNRGI</p>

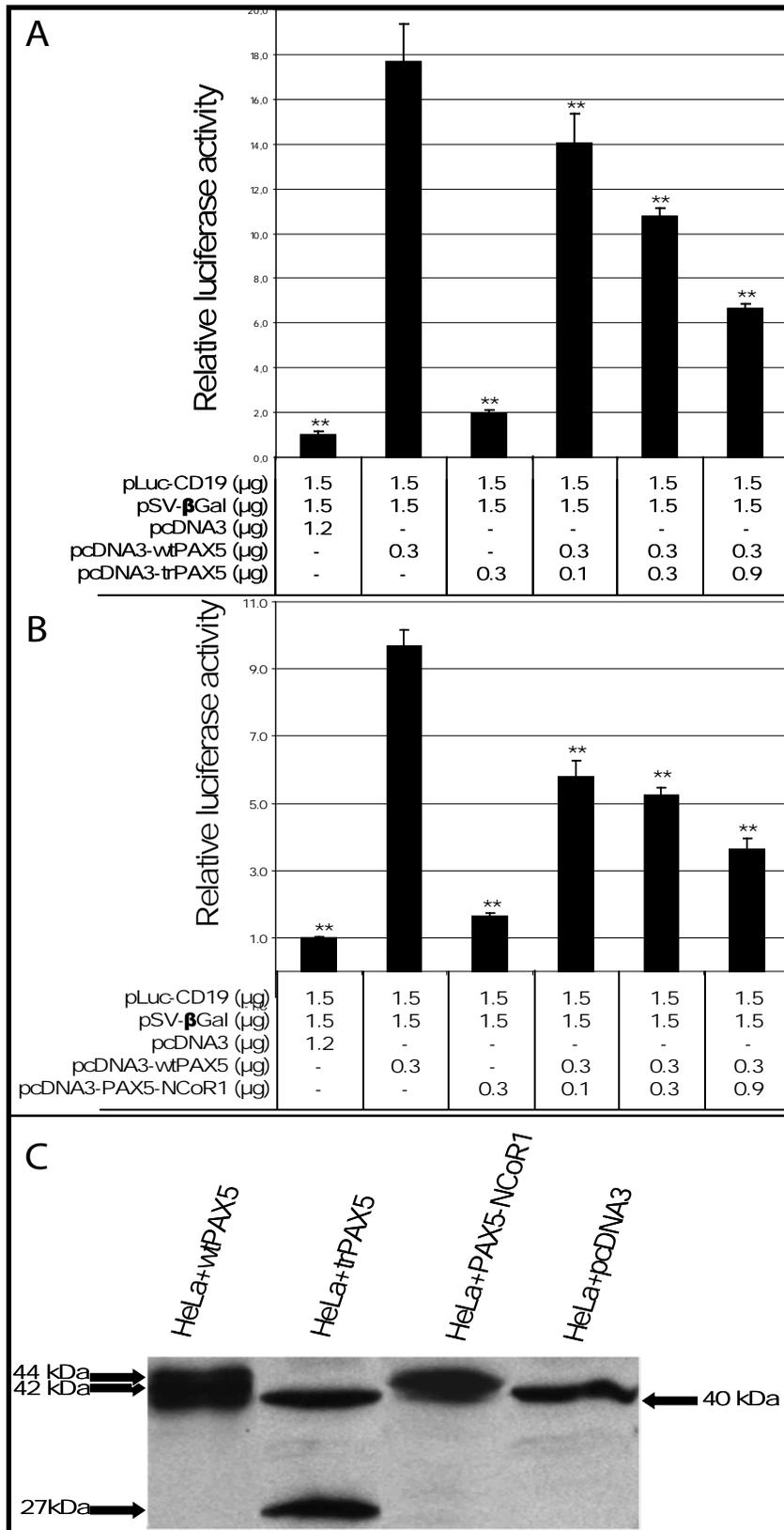
	<p>ACAATGACAACCTTTAGGAAGATCATTAGGT AAGTATTAATGCGATAACCGACGGACCTAA GACTACATCAGCTGTTGGGAATTTAAGACTC AA...</p>	<p>YRPMVQKQ</p>
<p>trPAX5 (intronic coding sequence is represented in small letters)</p>	<p>ATGGATTTAGAGAAAAATTATCCGACTCCTC GGACCAGCAGGACAGGACATGGAGGAGTG AATCAGCTTGGGGGGGTTTTGTGAATGGA CGGCCACTCCCGGATGTAGTCCGCCAGAG GATAGTGGAACCTTGCTCATCAAGGTGTCAG GCCCTGCGACATCTCCAGGCAGCTTCGGGT CAGCCATGGTTGTGTGTCAGCAAATTTCTTGGC AGGTATTATGAGACAGGAAGCATCAAGCCT GGGGTAATTGGAGGATCCAAACCAAAGGTC GCCACACCCAAAGTGGTGAAAAAATCGCT GAATATAAACGCCAAAATCCCACCATGTTTG CCTGGGAGATCAGGGACCGGCTGCTGGCA GAGCGGGTGTGTGACAATGACACCGTGCCT AGCGTCAGTTCATCAACAGGATCATCCGG ACAAAAGTACAGCAGCCACCCAACCAACCA GTCCCAGCTTCCAGTCACAGCATAGTGTCC ACTGGCTCCGTGACGCAGGTGTCCTCGGTG AGCACGGATTCGGCCGGCTCGTCTACTCC ATCAGCGGCATCCTGGGCATCACGTCCCC AGCGCCGACACCAACAAGCGCAAGAGAGAC GAA<i>G</i>taagagagggcccgcgcagccccgtcggGgatgcg ctccacggggtctgttccggcgctcggtcgcggtggcagcag aggtgcccgCgaacaccccccttacctgcagaggagcagtc ccccggcccgcacgctgtcctttctGaacacgggaaagggc tga</p>	<p>MDLEKNYPTPRTSRTGHGGVNQLGGVFNDRPLP DVVRQRIVELAHQGVRPCDISRQLRVSHGCVSKILG RYYETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVEKIAEYKRQN PTMFAWEIRDLLAERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKV QQPPNQVPASSHSIVSTGSVTQVSSVSTDSAGSS YSISGILGITSPSADTNKRKRDEGKRGPRSPVGDAL HGVCFRRSVAGGSRGAREHPPYLQRSESPGPHAV LFVNTGKG</p>
<p>PAX5-POM121 (interstitial coding sequence is represented in small italic)</p>	<p>...GTGTCCTCGGTGAGCACGGATTCGGCCG GCTCGTCTACTCCATCAGCGGCATCCTGG GCATCACGTCCCCAGCGCCGACACCAAC AAGCGCAAGAGAGACGAAG<i>ATCACCTGAAAGTATC TTGGGGACCCCTTCTTCCAACCTGGCAGGGCTCCCTGGACTACA CTTTGAAAATTTCTGCTTACCAAATCGGTTTGTAAATA ACACCTAGAAGACGCTATCCGATCCATCAG GCCAGTATTCCTGTCTGGGGTACTTCCC ACCGTGTGCTGGAATGGTTATCACAAGAAG GCTGTGCTGTCCCCTCGCAACTCCAGGATG GTGTGTAGCCCAGTGACTGTGAGGAT...</i></p>	<p>MDLEKNYPTPRTSRTGHGGVNQLGGVFNDRPLP DVVRQRIVELAHQGVRPCDISRQLRVSHGCVSKILG RYYETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVEKIAEYKRQN PTMFAWEIRDLLAERVCDNDTVPSVSSINRIIRTKV QQPPNQVPASSHSIVSTGSVTQVSSVSTDSAGSS YSISGILGITSPSADTNKRKRDE<i>DHLKVSWGPLLPTLAGLPLH FENFCLPNRFVITPRRRYPIHQAYSCGLVPTVCWNGYHKKAVLSPRNSRM VCSPTVTRVAPPDRRFRSRAIPEQIISSTLSSPSSNAP DPCAKETVLSALKEKEKRTVEEEDQIFLDGQENKR RRHDSGSGHSAFEPLVANGVPASVFPKPGSLKRG LNSQSSDDHLNKRSRSSSMSSLTGAYASGIPSSSR NAITSSSTRGISQLWKRNGPSSSPFSSPASSRSQ TPERPAKKIREEELCHHSSSTPLAADRESQGEKAA DTTPRKKQNSNSQSTPGSSGQRKRKQVLLPSRRG EQLTLPPPPQLGYSITAEDLDLEKKASLQWFNQALE DKSDAANSVTETPPITQPSFTFTLPAAAPASPPTSL LAPSTNPLLESLLKMQTPPSLPPCPESAGAAATEAL SPPKTPSLLPPLGLSQSGPPGLLPSPSFDKPPPTLL GLIPAPSMVPATDTKAPPTLQAETATKPQATSAPSP APKQSFVLTQNTSPSSPAAPAASSAPPMPFKPIFTA PPKSEKEGPTPPGPSVTATAPSSSSLPTTTSTTAPT FQPVFSSMGPPASVPLPAPFFKQTTTTPATPTTTAP LFTGLASATSAVAPITASPSSTDSASKPAFGFGINSV 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					



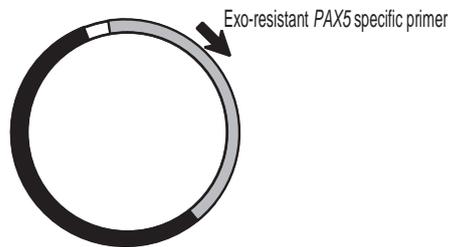


Chimeric mRNA 5'  AAAAAA 3'

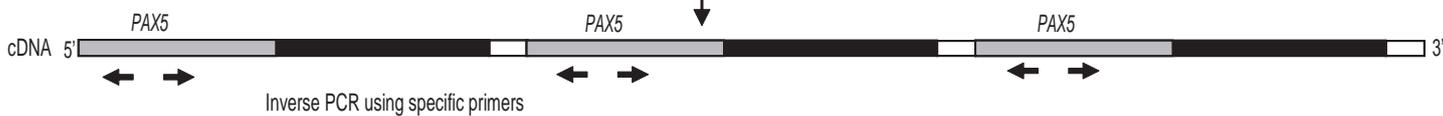
Chimeric cDNA 3'  TTTTTTTT  5'P

Reverse transcription (SuperScript III)

Self cDNA circularization (CircLigase)



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



Ces travaux apportent plusieurs réponses aux questions posées lors de la conception du projet :

PAX5 étant situé en 9p13, dans quelles proportions est-il remanié ou délété chez ces patients ?

Nous avons mis en évidence que parmi les 10% de patients porteurs d'un remaniement en 9p et atteints d'une LAL-B, près de 80% d'entre eux ont une altération du locus de *PAX5* (jusqu'à 90% pour les patients présentant un chromosome dicentrique impliquant le bras 9p). Dans $\frac{3}{4}$ des cas, il s'agit d'une délétion d'un allèle entier et dans $\frac{1}{4}$ des cas, la séquence de *PAX5* est coupée et associée à une séquence non contiguë. La configuration remaniée du locus de *PAX5* est potentiellement associée à la production d'un produit de fusion. Mis en parallèle avec l'importance démontrée de *Pax5* dans l'ontogénie B normale, les altérations structurales du locus de *PAX5* apparaissent être des événements moléculaires importants dans le développement de ces pathologies.

Les remaniements de PAX5 sont-ils associés à d'autres anomalies canoniques des LAL-B ?

Nous avons constaté dans cette étude que les patients n'ayant pas d'altérations de *PAX5* ont une distribution de profils caryotypiques classiques. Nous avons également noté que les patients présentant une délétion de *PAX5* sont porteurs de significativement plus d'anomalies canoniques que la proportion retrouvée dans les LAL-B tout venant. En particulier, ce groupe de patients, comptant pour 60% des cas de la cohorte, contient 90% des patients porteurs de remaniements *BCR-ABL* et *E2A-PBX1*. Nous avons aussi relevé que la majorité des patients ayant une délétion d'un allèle de *PAX5* ou bien ses deux allèles intacts (points de cassure centromériques ou télomériques) montrent un caryotype complexe, c'est-à-dire au moins 3 anomalies chromosomiques indépendantes. La délétion de *PAX5* apparaît donc comme un événement secondaire aux vues des profils cytogénétiques de ces patients. Le groupe de patients porteurs d'un point de cassure interne au locus de *PAX5* a des caractéristiques bien différentes. Les enfants y sont significativement plus représentés que les adultes. De plus, le remaniement de *PAX5* est très rarement associé à d'autres anomalies canoniques et les caryotypes n'ont en général que l'anomalie impliquant *PAX5*. Les différences de profils caryotypiques de ce groupe avec les deux précédents nous amènent à penser que les

remaniements touchant à l'intégrité du gène *PAX5* sont des événements initiateurs de la leucémogénèse.

Quelles sont les similitudes des différents partenaires de fusion de PAX5 ?

Cette étude nous a permis de découvrir 4 nouveaux partenaires de fusion de *PAX5*. Cependant, les comparaisons de structures ou de fonctions ne nous ont pas permis de dégager des caractéristiques communes à ces gènes partenaires, y compris en analysant rétrospectivement l'ensemble des gènes fusionnés à *PAX5* décrits dans la littérature. Cela dit, nous avons pu distinguer deux classes de fusions : celles menant à la production d'un transcrit de fusion dans le cadre de lecture, susceptible de produire une protéine de fusion conjuguant des domaines fonctionnels de *PAX5* et de son partenaire ; et celles menant à la production d'un transcrit tronqué de *PAX5*, dont le gène partenaire (ou l'absence de gène partenaire) ne conduit pas à un produit de fusion mais à une protéine *PAX5* tronquée.

Chez les patients présentant un remaniement interne du locus de *PAX5*, nous ne pouvons pas statuer sur l'hypothèse d'une contribution oncogénique du partenaire de fusion à ce stade. Cette contribution pourrait se faire par l'apport de domaines à la protéine chimère *PAX5-X* ou par l'altération d'un de ses allèles (dans le cas des fusions hors du cadre de lecture ou en sens inverse). En particulier, *ETV6*, *FOXP1* ou *JAK2* sont des facteurs ayant un rôle identifié dans l'hématopoïèse ou dans l'oncogénèse.

D'autres partenaires de *PAX5* n'ont pas de fonction déterminée à ce jour et pourraient également se révéler comme des acteurs de la transformation leucémique. L'étude des translocations chromosomiques, même rares, est une approche pouvant permettre l'identification de nouveaux acteurs de l'oncogénèse. A titre d'exemple, il se pourrait que *DACH2* soit capable d'influencer le cycle cellulaire. *DACH1*, qui présente une forte analogie avec lui, a été montré comme impliqué dans la régulation de p27^{kip1}. De plus, une translocation *PAX5-DACH1* avait été décrite par le groupe de Sabine Strehl (Nebral et al., 2009). Nous pouvons aussi souligner que *DACH2* est localisé sur le chromosome X chez un garçon, ce qui entraîne la suppression de son seul allèle sauvage lorsqu'il est associé avec *PAX5*. Bien que ce cas soit unique, cette translocation chromosomique donne une

justification à recherches ultérieures sur l'implication de *DACH2* dans les mécanismes oncogéniques.

A ce stade, nous pouvons noter la conservation systématique des domaines PBD, OP et NLS de *PAX5* (excepté le NLS dans la fusion *PAX5-ETV6* où il est apporté par *ETV6*).

En plus de ces résultats, nous avons noté des délétions particulièrement fréquentes de matériel des bras chromosomiques 20q, 12p, 6q, 7p et 17p. Cette observation nous suggère que certains gènes ou groupes de gènes présents dans ces régions participent au développement de la pathologie par un mécanisme d'haploinsuffisance. Cependant, les investigations nécessaires pour identifier de tels acteurs parmi des milliers de gènes ne sont pas techniquement envisageables pour le moment. La figure S1 (version couleur en annexe#4) nous montre quelles sont les régions impliquées en association avec les altérations 9p et reflète la complexité de procéder à une telle analyse.

Concernant le chromosome 7, nous avons remarqué que plusieurs partenaires de fusion étaient situés dans une région assez restreinte. Il s'agit de *PAX5-ELN*, *PAX5-POM121* et de *PAX5-AUTS2* (que nous décrivons comme anomalie récurrente dans le rapport de cas suivant). Ces trois partenaires ne présentent pas de caractéristiques fonctionnelles ou structurales communes. Cette observation pourrait souligner la présence en 7q11 d'un gène important coopérant avec l'altération de *PAX5* dans l'émergence de la pathologie. La redondance de l'association de l'*ELN* (3 cas) et d'*AUTS2* (2 cas) suggère que ces événements sont sélectionnés. L'altération d'un de ces deux gènes peut être un événement collaboratif à la fusion de *PAX5* dans le développement leucémique chez ces patients. L'*ELN* étant une protéine de la matrice extracellulaire faiblement sécrétée par les lymphocytes B, sa dysfonction semble délicate à relier à un phénotype leucémique. Quant à *AUTS2*, nous ne connaissons pas à ce jour ses fonctions. Au même titre que pour *DACH2*, il pourrait s'avérer intéressant de tester son potentiel oncogénique.



Letter to the Editor

PAX5-AUTS2 fusion resulting from t(7;9)(q11.2;p13.2) can now be classified as recurrent in B cell acute lymphoblastic leukemia

Paired box domain gene 5 (PAX5) is considered as the master gene of B-cell differentiation from pro-B to mature B stages [1]. *PAX5* alterations have been reported to occur in 40% of B-ALL, but rearrangements of this transcription factor result from 9p13 translocations in only 2% of B-ALL [2,3]. To date, it has been described in fusion genes with 21 partners including transcription factors (e.g. *ETV6* [4]), tyrosine kinases (e.g. *JAK2* [5]) or genes without functional description (e.g. *DACH2* [6]).

Kawamata et al. have recently reported a t(7;9)(q11.2;p13.2) in a B-ALL, leading to a *PAX5-AUTS2* (*Autism susceptibility candidate 2*) fusion transcript [7]. *AUTS2* gene encodes for a 1259 amino-acid protein of currently unknown function.

The second case of t(7;9)(q11.2;p13.2)/*PAX5-AUTS2* we report here, shows that this translocation is recurrent in B-ALL and suggests that the 7q11 region might be a hot spot of rearrangements in B cell ALLs.

A 3-year-old girl presented with hemoglobin 5.9 g/dl, platelets 105 G/L, white blood cell count 7.4 G/L with 4% neutrophils, 51.5% lymphocytes, 11% monocytes and 24.5% blasts in peripheral blood. In bone marrow, the 80% blasts tested positive for lymphoid markers CD79a+, CD19+, CD20 partial+, cyIgM+, CD10+ and negative for myeloid markers, thus establishing the diagnosis of a precursor-B-ALL. The patient had no central neurologic system involvement, was a good responder to prednisone and achieved complete remission on day 33 after induction therapy. She has been in CR for 6 months without any complications related to therapy.

At diagnosis, cytogenetic studies detected an unbalanced t(7;9). The karyotype was described as follows 45,XX,-7,der(9)t(7;9)(q11;p13),dup(16)(p11p13)[14]/46,XX[2]. FISH analyses were negative for *BCR/ABL*, *TEL/AML1* and *MLL* rearrangement (Abbott). As this case was similar to the one previously described, we tested for the presence of a fusion involving *PAX5* and *AUTS2* genes. Hybridizations with *PAX5* specific overlapping probes (BAC probes RP11-243F8 and RP11-344B23) and *AUTS2* specific flanking probes (BAC probes RP4-715F13 and RP11-409J21) revealed involvement of *PAX5* and *AUTS2* on both derivative chromosomes (Fig. 1(A)).

Reverse transcription was performed using an oligo-dT primer and Superscript III reverse transcriptase following the manufacturer's instructions (Invitrogen). Subsequent PCR experiments were carried out using PfuUltra II DNA polymerase (Stratagene), according to the manufacturer's instruc-

tions (cycle parameters: [1 min/95 °C, [20 s/95 °C, 20 s/62 °C, 1 min/72 °C]x35, [72 min/68 °C and 4 °C forever]), using *PAX5-771F* (exon 3) (5'-CCATGTTTGCCTGGGAGATCAGG-3') and *AUTS2-3002R* (exon 12) (5'-TAGGCCTGGAATGTAGACG-3') for the first amplification, and *PAX5-846F* (junction between exon 3 and 4) (5'-GTTCCATCAACAGGATCATCCGG-3') and *AUTS2-3002R* for semi-nested PCR. One product was obtained from the patient sample (Fig. 1(B)), and the sequence analysis showed a transcript encoding an in-frame fusion between exon 6 of *PAX5* and exon 6 of *AUTS2* (Ensembl database) (Fig. 2(A)). Therefore the breakpoints found in our patient differed from those observed in the previously reported case that fused the exon 6 of *PAX5* with exon 4 of *AUTS2*. Despite these different molecular breakpoints, we can assume that the corresponding predictive fusion proteins are similar. Indeed, only 22 amino acids that do not correspond to any functional domain, are depleted in our fusion, compared with the one previously reported. We also verified the presence of the reverse transcript *AUTS2-PAX5* using *AUTS2-722F* (5'-GACCCCGCGCAGCAGAAC-3') and *PAX5-1712R* (5'-TGGGCTCTCTGGCTATCTTCAGG-3'). *AUTS2-PAX5* was not found. Since *AUTS2* is not expressed in B cells, its promoter which putatively drives the *AUTS2-PAX5* reciprocal fusion transcription is non functional. This probably accounts for the absence of the reverse transcript.

In the *PAX5-AUTS2* predictive chimeric protein, a fragment of *PAX5* that contains a DNA binding domain, an octapeptide, a nuclear localization signal and a homeodomain fuses with an *AUTS2* sequence (from exon 7 to the end of *AUTS2*) that contains two proline-rich domains.

Rearrangements between 9p13 and 7q11 are recurrent events in B-ALL and can result in different fusion transcripts. To date, three recurrent partners have been associated with t(7;9)(q11;p13) chromosomal translocations: *PAX5-ELN* [6,8], *PAX5-POM121* [5,6] and *PAX5-AUTS2* [6,7]. The high gene density on the 7q11 locus strongly suggests that these partners are not randomly associated with *PAX5* (Fig. 2(B)). However, sequence alignment between the predictive sequences resulting from *ELN*, *POM121* and *AUTS2* fusion proteins did not reveal any structural similarities (multiple alignment using Expasy tools: ProDom, InterPro Scan and MotifScan). Except for their involvement in B cell ALL, these partner genes have not been associated with any other hematological cancer. Therefore, the recurrent incidence of 7q11.2 rearrangements associated with *PAX5* disruption suggests that the partner genes located in 7q11 provide particular properties to the resulting *PAX5* fusion proteins. Another assumption might be that other genes also located in 7q11.2 and involved in oncogenesis, are deleted or deregulated in such events.

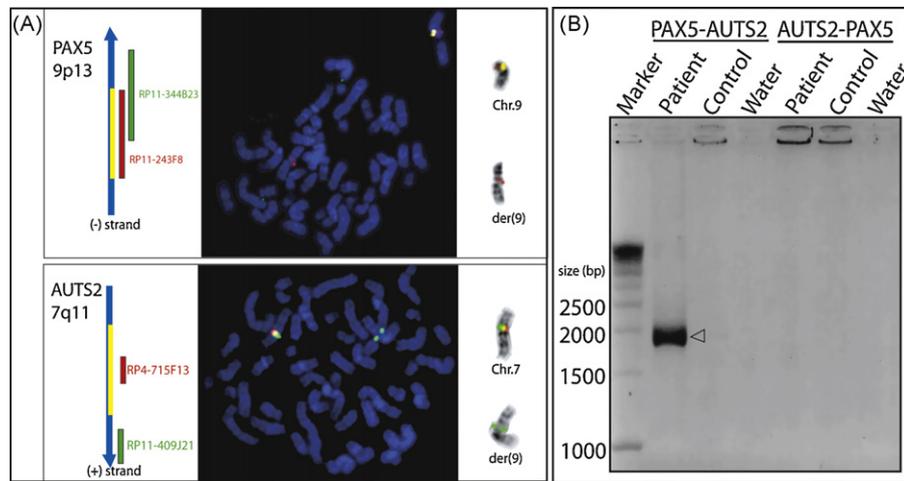


Fig. 1. (A) Fluorescent in situ hybridization of *PAX5* BAC probes (RP11-344B23 and RP11-243F8) and *AUTS2* BAC probes RP4-715F13 and RP11-409J21; (B) Electrophoretic analysis of *PAX5-AUTS2* and *AUTS2-PAX5* RT-PCR experiment. Control cDNA corresponds to a B-ALL patient without *PAX5* abnormality. Arrow depicts the 1952bp amplified product corresponding to *PAX5-AUTS2* fusion transcript.

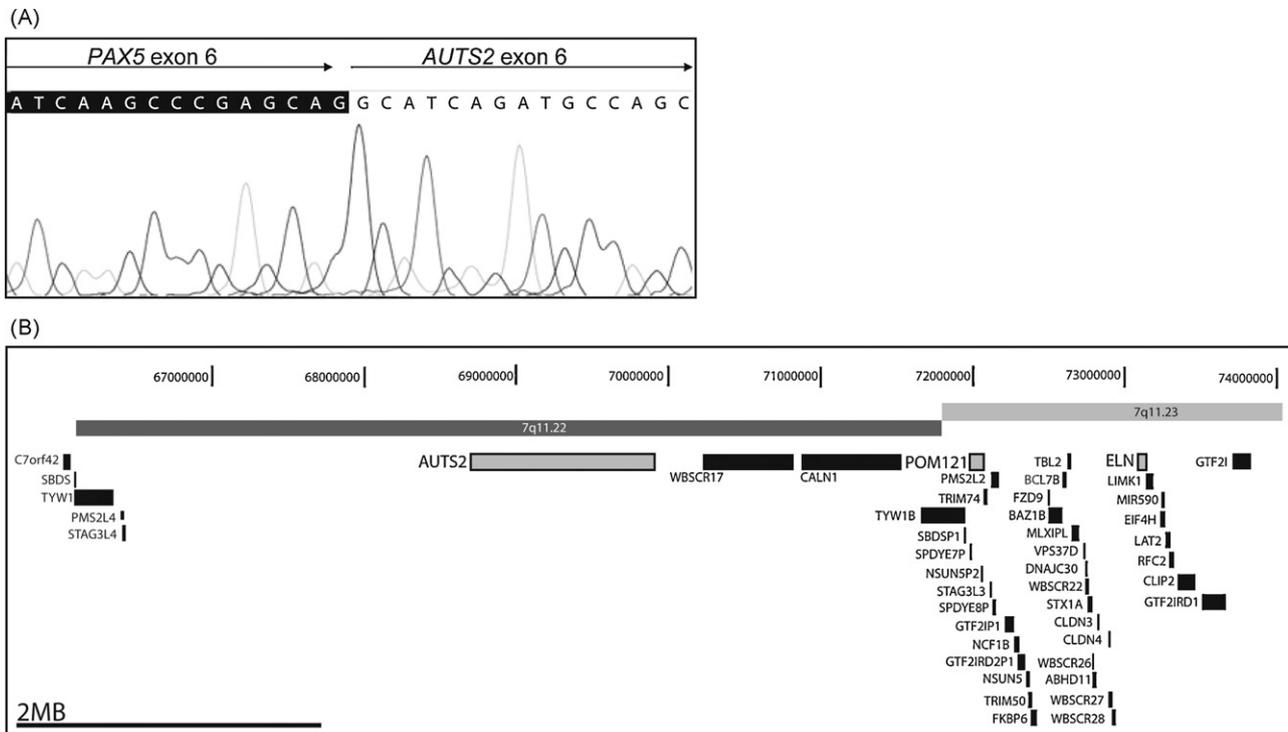


Fig. 2. (A) Chromatogram analysis of RT-PCR product, showing the junction between *PAX5* exon 6 and *AUTS2* exon 6; (B) Genomic representation of 7q11 regions. Gray rectangles represent already described *PAX5* fusion partners on 7q11.

Conflict of interest

All authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Institut National du Cancer (INCa), Laurette Fugain foundation, the Cooperación de investigación transpirenaica en la terapia innovadora de la leukemia (CITIL), the Recherche et Innovation en Thérapeutique Cancéreuse (RITC) and the Fondation de France. The authors thank Mariana Titorov for her editorial assistance.

Contributions. E.C. and S.S. contribute equally to the work. E.C., S.S., N.D. and J.B. wrote the paper. E.C., S.S. and J.B. performed

the research and analyzed the data. C.B. and P.B. gave critical suggestions.

References

- [1] Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 2007;8(May (5)):463–70.
- [2] 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(April (7137)):758–64.
- [3] Familiades J, Bousquet M, Lafage-Pochitaloff M, Béné MC, Beldjord K, De Vos J, 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(November (11)):1989–98.
- [4] 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(June (12)):4666–70.

- [5] Nebral K, Denk D, Attarbaschi A, König M, Mann G, Haas OA, et al. Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2009;23(January (1)):134–43.
- [6] Coyaud E, Struski S, Prade N, Familiades J, Eichner R, Quelen C, et al. Wide diversity of PAX5 alterations in B-ALL: a Groupe Francophone de Cytogenétique Hematologique study. *Blood* 2010;115(April (15)):3089–97.
- [7] 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(August (33)):11921–6.
- [8] 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(April (8)):3417–23.

E. Coyaud^{a,b}

^a INSERM, U563, Toulouse, France

^b Université Toulouse III Paul Sabatier, Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan, Toulouse, France

S. Struski*

N. Dastugue
Department of Hematology, Génétique des
Hémopathies, Pavillon Lefebvre, CHU Toulouse
Purpan, 31000 Toulouse, France

P. Brousset^{a,b}

^a INSERM, U563, Toulouse, France

^b Department of Hematology, Génétique des
Hémopathies, Pavillon Lefebvre, CHU Toulouse
Purpan, 31000 Toulouse, France

C. Broccardo

INSERM, U563, Toulouse, France

J. Bradtke

Onkogenetisches Labor der Universitäts-Kinderklinik
Gießen, Gießen, Germany

* Corresponding author. Tel.: +33 561779053;

fax: +33 561779115.

E-mail address: struski.s@chu-toulouse.fr

(S. Struski)

10 June 2010

Available online 17 August 2010

Sur la base de nos travaux, les translocations de *PAX5* menant à des fusions apparaissent comme les événements au plus fort potentiel oncogénique. Nous avons contrôlé l'absence de mutations ponctuelles de l'allèle non touché par la technique de HRM préalablement utilisée dans notre laboratoire (Annexe#3). Au contraire des mutations ponctuelles (Annexe#3), seul l'allèle remanié de *PAX5* est altéré. L'autre allèle de *PAX5* est normal sauf dans un cas où nous avons retrouvé une substitution *PAX5/S212L*. La fonction de cette mutation n'est pas établie dans la mesure où elle se situe hors des domaines fonctionnels de *PAX5* (données non présentées). La très rare association d'anomalies canoniques et d'autres anomalies caryotypiques aux fusions impliquant *PAX5* renforce l'hypothèse du caractère princeps de ce type d'altération.

Nous avons donc avancé la conclusion que les gènes de fusion, ou les formes tronquées de *PAX5*, étaient des anomalies initiatrices des LAL-B. Il nous restait à déterminer quelles étaient les impacts de l'expression des mutants de fusion sur les paramètres de différenciation et de prolifération des lymphocytes précoces B.

4. Travaux préliminaires – expression des fusions de *PAX5* dans la différenciation B

a) Présentation du modèle

Afin de tester notre hypothèse, nous avons utilisé le modèle murin de différenciation B *ex-vivo* inductible par privation en IL-7 (protocole détaillé en Annexe#5 ; (Rolink, 2004)). Ce système consiste à purifier des lymphocytes pro-B par un tri B220⁺/Igκ⁻/c-Kit⁺ à partir de moelle osseuse de souris C57BL/6 sauvages. Les cellules purifiées sont ensuite cultivées sur une couche de cellules stromales murines de type OP9 irradiées à 30Gy (dose sub-létale). Les cellules OP9 sont des cellules issues de souris B6C3F1 ostéopérotiques porteuses d'une mutation biallélique du gène du M-CSF (Kodama et al., 1994). *In vitro*, ces cellules fournissent les interactions cellulaires nécessaires à mimer le microenvironnement médullaire et sont ainsi capables de supporter la différenciation de multiples lignées hématopoïétiques dont la lignée B. Les lymphocytes pro-B triés sont placés en co-culture avec les cellules OP9 en présence d'IL-7. Au cours de cette culture de 3 jours, les cellules vont avancer en différenciation jusqu'au stade pré-BI, ce qui se manifeste par la perte du récepteur c-Kit. Au terme de cette période, les lymphocytes vont entrer en phase de prolifération exponentielle. C'est donc à 3 jours que nous avons choisi de procéder à la transduction rétrovirale des différents mutants clonés dans le vecteur MSCV-IRES-eGFP (MIE). Le vecteur MIE permet d'exprimer l'insert sous la dépendance du promoteur *LTR* et de l'associer à une séquence

IRES-GFP. Ceci nous permettra de suivre les cellules effectivement transduites en analysant l'expression de la GFP. Les particules virales ont été générées par transfection des différentes constructions du vecteur MIE dans des cellules d'emballage Phoenix. Les particules rétrovirales produites sont écotropes et n'infectent que les cellules en cycle. Suite à l'infection, nous conservons nos cellules 4 jours en présence d'IL-7 afin de leur permettre de proliférer. Au terme de cette phase de prolifération, nous avons effectué différentes expériences : soit nous avons poursuivi la culture en présence d'IL-7 pour évaluer la progression du phénotype au cours du temps ; soit nous avons privé les cellules en IL-7, leur permettant ainsi d'entrer en différenciation jusqu'à un stade B immature (manifesté par l'acquisition d'Igk et la perte de BP-1) (**figure 23**).

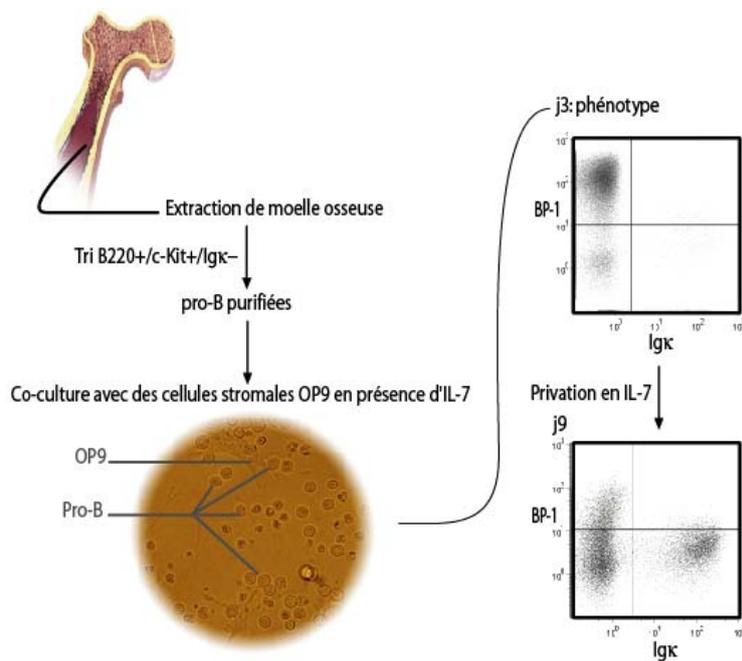


Figure 23 : Schéma récapitulatif des principales étapes du système de différenciation B inductible.

Dans l'optique de caractériser les modifications phénotypiques par cytométrie de flux, nous avons utilisé plusieurs marquages informatifs sur le stade de progression de la différenciation ou sur l'évolution des caractéristiques de prolifération des cellules. Ces différents marqueurs sont listés dans le tableau suivant (**figure 24**).

Ce modèle présente plusieurs difficultés importantes dans sa mise en place et dans son utilisation. Dans la conception même de ce protocole, la mise en différenciation s'accompagne d'une mort importante des lymphocytes. La difficulté majeure est de conserver suffisamment de cellules transduites en fin d'expérience pour produire des résultats statistiquement valables. En outre, des variations minimales des paramètres de culture ont un impact notable sur le phénotype des cellules. Par l'expérience, nous avons aussi remarqué

que l'usage de souris jeunes (4 semaines) accroissait sensiblement la quantité de lymphocytes pro-B triés. Enfin, la qualité des OP9, de l'IL-7, des cellules triées, des surnageants rétroviraux, des milieux utilisés et les durées de manipulation sont des paramètres critiques pour le succès de cette expérience.

	Type	Spécificité dans le tissu hématopoïétique	Nature
Anti-B220	Anticorps	Lignée B	Cible B220, variant de CD45, glycoprotéine de surface (Coffman, 1981)
Anti-c-Kit	Anticorps	Cellules souches et cellules progénitrices	Cible c-Kit, le récepteur transmembranaire au SCF, à activité tyrosine kinase (Chabot, 1988)
Anti-BP-1	Anticorps	Lymphocytes pré-B	Cible la protéine de surface BP-1, à activité aminopeptidase A (Wang and Cooper, 1993)
Anti-Igk	Anticorps	Lymphocytes B immatures et B matures	Cible la chaîne légère k du BCR (Hieter, 1980)
IP	Agent intercalant de l'ADN	Cellules nucléées perméables	Iodure de propidium, molécule chimique lipophile (wikipédia)
7-AAD	Agent intercalant de l'ADN	Cellules nucléées perméables	7-Aminoactinomycine D, molécule chimique lipophile (wikipédia)
Annexine V	Protéine	Cellules en apoptose	Protéine affine pour la phosphatidylsérine
Cell Trace Violet	Substrat fluorogène	Toutes les cellules	Substrat fluorescent des estérases. Capable de se fixer stablement sous forme hydrolysée aux amines intracellulaires

Figure 24 : Table des différents marquages utilisés. Les fournisseurs et références sont consultables dans le protocole détaillé (Annexe#5)

Parmi les différents mutants dont nous disposons, nous avons choisi de travailler sur (**figure 24 bis**): *PAX5 tronqué*, *PAX5-NCoR1*, *PAX5-ELN*, et *PAX5-ETV6*. Julien Familiades a mené les mêmes expériences avec des mutants ponctuels qu'il avait identifiés : *PAX5/P80R* et *PAX5/G336*. Nous avons également effectué ces expériences avec 3 conditions contrôle : **cellules non transduites**, transduites avec *MIE vide*, et transduites avec *PAX5 sauvage*.

Nous avons choisi d'étudier l'impact de l'expression d'une **forme tronquée de PAX5** car nous l'avons retrouvée chez plusieurs patients. De plus, cette forme code les protéines de fusion potentielles créées par les gènes de fusion entre *PAX5* et près de la moitié de ses partenaires en sens opposé ou hors du cadre de lecture. *PAX5 tronqué* conserve le domaine de liaison à l'ADN, l'octapeptide et le signal de localisation nucléaire. De plus, nous avons montré qu'elle était capable d'inhiber la transcription *PAX5* dépendante de CD19 dans le système rapporteur d'activité luciférase (voir article *Blood*).

La protéine **PAX5-NCoR1** est elle aussi capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de *PAX5* dans le même système rapporteur luciférase. NCoR1 (Nuclear receptor CoRepressor 1) apporte une partie de son domaine inhibiteur ID2 (incluant sa CORNR box 3) à la séquence codée par les 5 premiers exons de *PAX5*. Le motif CORNR est suffisant pour se lier à des récepteurs hormonaux nucléaires, et les séquences qui le flanquent déterminent l'affinité de ce

motif pour un récepteur nucléaire particulier (Cohen et al., 2001). *NCoR1* est un co-facteur répresseur de la transcription et est à ce jour le seul gène de cette famille fonctionnelle à être impliqué dans une translocation chromosomique. Il nous a semblé particulièrement intéressant d'étudier son impact du fait de la possible action modulatrice de la séquence qu'il apporte sur l'activité transcriptionnelle de la chimère.

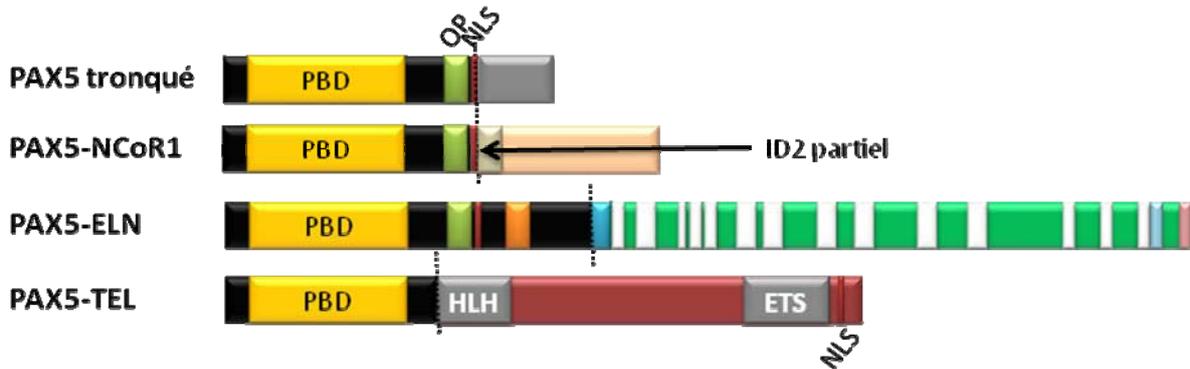


Figure 24 bis : Structure des différents mutants testés dans le système de différenciation B inducible par privation en IL-7. Les pointillés représentent le point de cassure entre la partie de PAX5 et de sa séquence de fusion. PBD : Paired Box Domain ; OP : Octapeptide ; NLS : signal de localisation nucléaire ; ID2 : Domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires ; HLH : hélice-boucle-hélice ; ETS : domaine de liaison à l'ADN de la famille Ets.

PAX5-ELN présente un autre modèle original dans la mesure où c'est le seul exemple décrit de fusion d'un facteur de transcription avec une protéine de la matrice extracellulaire. Identifiée dans notre laboratoire (Bousquet et al., 2007), elle possède les mêmes propriétés inhibitrices sur PAX5 sauvage que PAX5 tronqué et PAX5-NCoR1. De plus, elle est capable de se lier à divers sites de régulation de *PAX5*. L'ELN (Elastine) est constituée de nombreux domaines hydrophobes, ce qui permet son organisation en faisceaux dans le milieu extracellulaire (Rosenbloom et al., 1995). La protéine de fusion PAX5-ELN associe les 303 acides aminés N-terminaux de PAX5 avec les 698 C-terminaux de l'ELN. Cette structure est remarquable car le point de cassure après l'exon 7 de *PAX5* permet à la chimère de conserver l'homéodomaine et une partie du domaine de transactivation de PAX5. De plus, la taille de la séquence apportée par l'ELN est considérable et il est envisageable que cet apport cause des problèmes d'encombrement stérique à l'activité de PAX5. La présence démontrée de cette protéine de fusion dans le noyau pose aussi des questions sur la conformation qu'elle peut adopter dans cet environnement biochimique.

Enfin, nous avons choisi d'étudier l'impact de l'expression de *PAX5-ETV6* dans ce système. ETV6 (*Ets variant 6*, ou *TEL*) est un facteur de transcription impliqué dans l'hématopoïèse. Sa fréquente implication dans les leucémies suggère qu'il joue un rôle de suppresseur de tumeur en conditions physiologiques (Raimondi et al., 1997). Cette fusion est

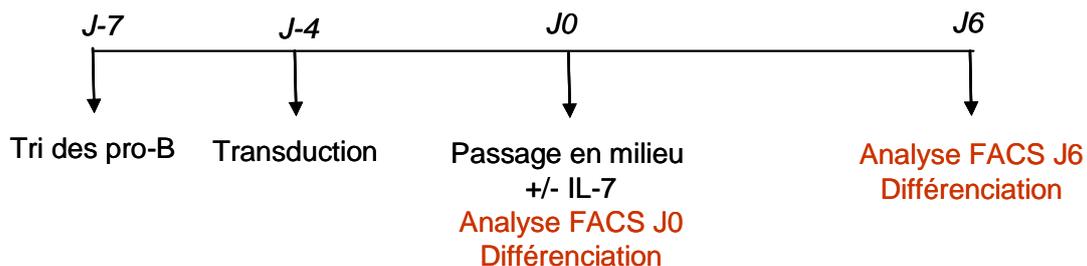
également particulière dans la mesure où elle juxtapose la séquence codée par les 4 premiers exons de *PAX5*, c'est-à-dire uniquement son domaine de liaison à l'ADN, avec la quasi-totalité d'*ETV6*. Dans la chimère, *ETV6* apporte son Pointed domain (PTN) (qui lui permet de s'homodimériser et s'hétéro-dimériser), son domaine de liaison à l'ADN situé sur sa partie C-terminale, et un signal de localisation nucléaire (Park et al., 2006). Contrairement aux autres fusions de *PAX5*, *PAX5-ETV6* ne conserve pas l'octapeptide et présente la caractéristique de posséder 2 sites différents de liaison à l'ADN. Nous avons pensé que ce profil particulier méritait des investigations plus poussées.

b) Résultats expérimentaux préliminaires

Je vais présenter ici des résultats établis et des résultats qui demandent confirmation. Les résultats non confirmés à ce jour seront traités avec réserve mais me serviront de support de réflexion pour la discussion. Pour les expériences de différenciation ou de culture à long terme, nous avons utilisé le FACS FC500 de Beckman-Coulter. Pour les expériences de prolifération et d'apoptose, nous avons utilisé le FACS LSRII de BD Biosciences du fait de la nécessité d'utiliser un laser excitant dans le violet pour l'analyse du cycle cellulaire.

(1) Différenciation à 6 jours

Plan de l'expérience :



Sélection des sous-populations quantifiées (**figure 25**):

Les cellules sont sélectionnées par rapport à leur répartition SSC/FSC. Puis les cellules vivantes sont sélectionnées par leur absence de marquage à l'IP, témoin de leur imperméabilité. Parmi cette population, les cellules B sont fenêtrées grâce à l'expression du marqueur B220. Les cellules transduites exprimant la GFP sont ensuite isolées. La fenêtre suivante sur la population cible permet d'éliminer les agrégats, événements non représentatifs.

Enfin, les populations étudiées sont déterminées en fonction de l'expression de BP-1 en ordonnée et de Igκ en abscisse.

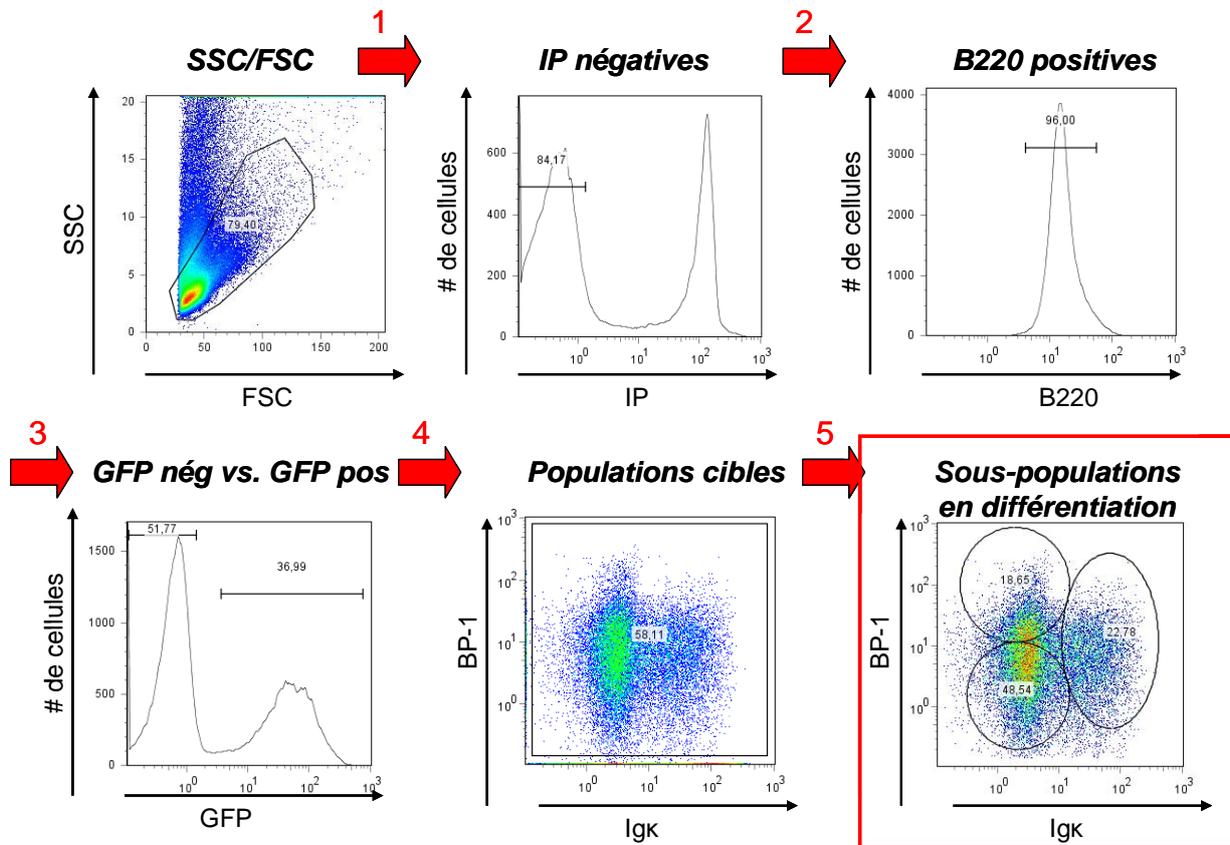


Figure 25 : Exemple de l'analyse des cellules transduites avec le vecteur vide analysées à J6 de différenciation en absence d'IL-7. Les flèches rouges symbolisent les 5 niveaux d'imbrication des sous populations. Les 3 sous populations décrites dans le rectangle rouge seront dénommées BP-1⁺/Igκ⁻ (en haut à gauche), BP-1⁻/Igκ⁻ (en bas à gauche) et BP-1⁻/Igκ⁺ (à droite)

Je présente dans la figure suivante les résultats d'une expérience représentative. Les écarts-types correspondent aux variations entre les échantillons de cellules triées à partir d'un même lot de souris, puis séparées dès J-7 en 3 puits différents par condition. Les transductions et les cultures ont été effectuées séparément tout au long de l'expérience et chaque échantillon a été analysé indépendamment des autres. Pour chaque condition présentée ici, nous comparons les différentes sous-populations aux cellules non-transduites et aux cellules transduites avec le vecteur vide (figures 26 et 26 bis).

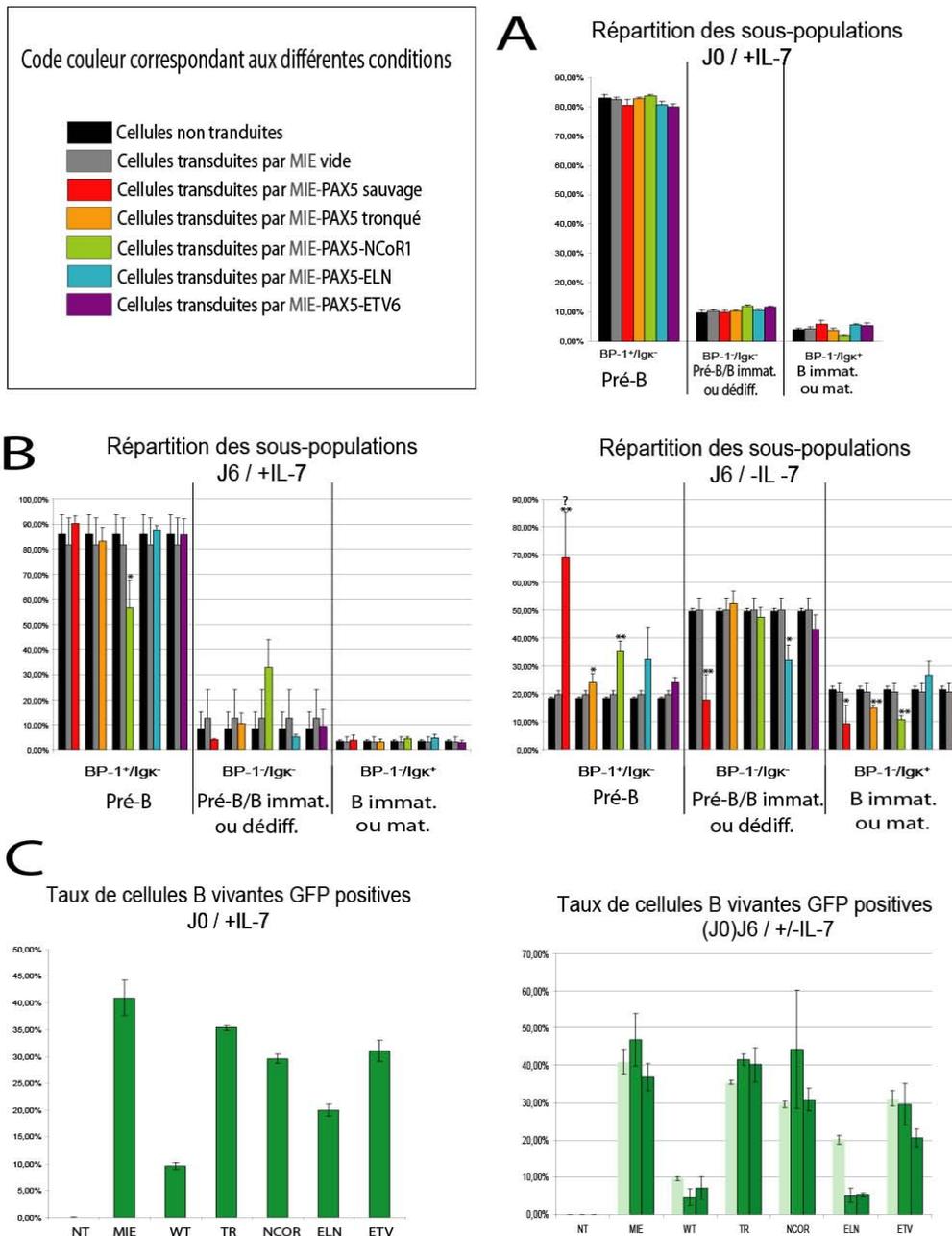


Figure 26 : Présentation des résultats de la différenciation à 6 jours. Les codes couleurs sont indiqués dans la fenêtre en haut à gauche. NT = non-transduites ; WT = MIE-PAX5 sauvage ; TR = MIE-PAX5 tronqué ; NCOR = MIE-PAX5-NCOR1 ; ELN = MIE-PAX5-ELN ; ETV = MIE-PAX5-ETV6. Pré-B : lymphocyte précurseur B ; Pré-B/B immat. ou dédiff. : lymphocyte à la transition entre les stades petite pré-B et B immature ou bien cellule à un stade pro-B ou antérieur ; B immat. ou mat. : lymphocyte B immature ou mature. **A :** l’histogramme représente la répartition des populations en fonction des différents mutants. **B :** Le premier histogramme montre la répartition des sous-populations pour chaque condition à J6 en présence d’IL-7 ; sur la gauche de la proportion de chaque condition, sont représentés les taux de cellules des conditions non-transduites et transduites avec MIE vide (barres noires et grises respectivement). Le second histogramme est construit sur le même principe. Les différences entre chaque condition et les conditions non-transduites et transduites MIE vides ont été estimées statistiquement. Les différences significatives sont figurées par * quand $p < 0,05$ et ** quand $p < 0,01$ (test de Mann-Whitney). Le « ? » surmontant le point MIE-PAX5 sauvage à J6 sans IL-7 symbolise une réserve quant à ce résultat (faible nombre de cellules lors de l’analyse). Cette réserve sera discutée plus loin. **C :** Le premier histogramme représente le taux de lymphocytes B transduits par rapport au nombre de cellules B vivantes non transduites à J0 dans chaque puits ($\%_{GFP} = \frac{N_{[IP-/B220+]/GFP+}}{N_{[IP-/B220+]}}$). Le second histogramme représente l’évolution de la proportion de cellules GFP positives pour les différentes conditions ($\%_{GFP} = \frac{N_{[IP-/B220+]/GFP+}}{N_{[IP-/B220+]}}$) ; En vert clair est rappelé les proportions de GFP+ à J0 ; en vert moyen les proportions de GFP+ à J6 en présence d’IL-7 ; en vert foncé les proportions de GFP+ à J6 en absence d’IL-7.

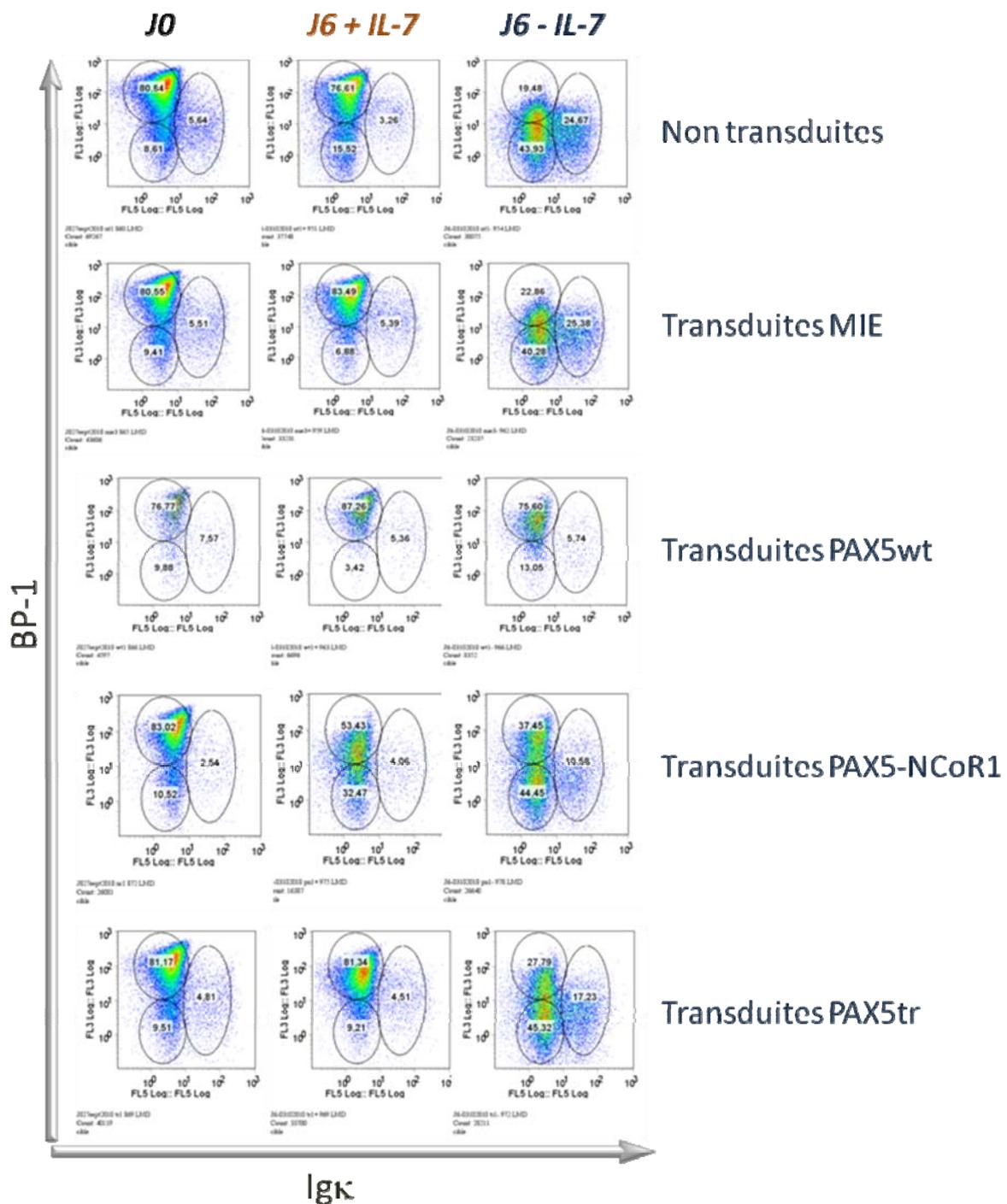


Figure 26 bis : Illustration des résultats de la figure 26. Présentation des données brutes de FACS (expériences représentatives).

Nous pouvons à ce stade faire plusieurs remarques :

A J0, il n'existe pas de différences de répartition des sous populations BP-1⁺/Igκ⁻, BP-1⁻/Igκ⁻ et BP-1⁻/Igκ⁺ entre les différentes conditions (BP-1⁺/Igκ⁻ = lymphocytes pré-B ; BP-1⁻/Igκ⁻ = lymphocytes en transition pré-B/B immature ou cellules dérivées ; BP-1⁻/Igκ⁺ = lymphocytes B immatures ou matures). Cependant nous notons des taux très différents de cellules transduites. Ces différences peuvent en partie être dues aux variations de taille des différents transgènes, en supposant que la taille de l'insert conditionne son taux d'insertion dans le génome. Les taux de transductions pondérés par un facteur calculé sur la base de la taille de l'insert sont représentés sur la figure suivante (**figure 27**).

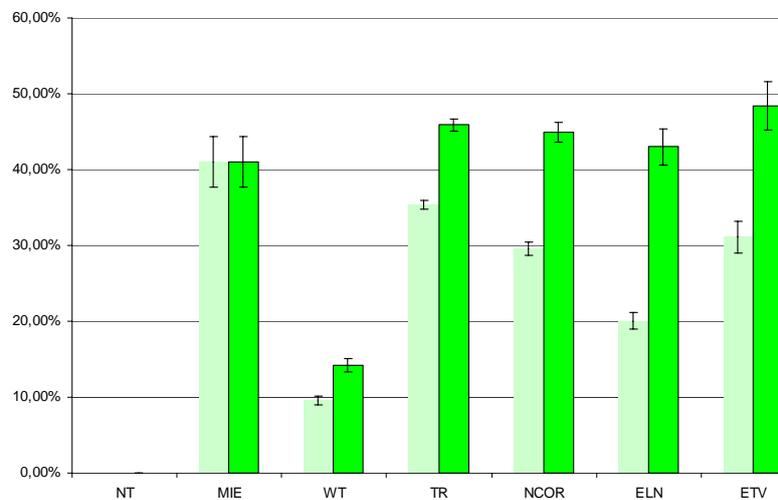


Figure 27 : Taux de cellules transduites pondérés par la taille de l'insert.. En vert clair : taux brut de cellules transduites à J0 (pour rappel); en vert moyen : taux corrigés de cellules transduites à J0. Les taux de transduction pondérés ont été calculés comme suit : $[\%_{pondéré} = \%_{brut} \times (taille\ insert\ vide + taille\ du\ transgène) / (taille\ insert\ vide)]$

Si cette hypothèse peut expliquer les différences de taux de transduction observés entre la condition *MIE* vide et les mutants *PAX5* tronqué, *PAX5-NCOR1*, *PAX5-ELN*, et *PAX5-ETV6*, elle ne peut expliquer le faible taux de cellules IP⁻/B220⁺/GFP⁺ transduites par *PAX5* sauvage. La transduction de *PAX5* sauvage initialement expérimentée dans l'optique d'être utilisée comme condition contrôle, semble avoir un impact sur la viabilité ou la prolifération cellulaire.

A J6, de nombreuses différences apparaissent entre les diverses conditions. En présence d'IL-7, le taux de cellules BP-1⁺/Igκ⁻ de la condition *PAX5-NCOR1* est significativement plus faible que ceux des autres conditions. La proportion de cellules BP-1⁻/Igκ⁻ semble également plus forte pour cette condition. Cela pourrait refléter soit un glissement en différenciation de près de 20% des cellules BP-1⁺/Igκ⁻ (vers la fin du stade pré-

BII tardif), soit une dédifférenciation vers un stade plus précoce (pro-B ou pré-pro-B) des cellules exprimant PAX5-NCOR1.

Au bout de 6 jours de privation en IL-7, les profils sont variables entre les mutants :

Condition PAX5 : De manière surprenante, les cellules présentant le blocage de différenciation le plus important sont celles transduites par la forme sauvage de PAX5. En effet, les cellules transduites par PAX5 sont bloquées en stade pré-B (3,5 fois plus que les cellules des autres conditions contrôle). Les populations BP-1⁻Igκ⁻ et BP-1⁻Igκ⁺ sont significativement sous-représentées. Cette condition correspond à une surexpression de PAX5, ou plus exactement à une co-expression de la forme humaine et de la forme murine de ce gène. Ceci n'est pas sensé avoir une signification fonctionnelle étant donné que les deux protéines PAX5 et Pax5 partagent plus de 99% d'homologie, les substitutions étant situées hors des domaines fonctionnels identifiés. Nous émettons toutefois une réserve sur ce résultat étant donné le faible nombre d'événements analysés pour ces points en FACS (entre 500 et 2000 [IP-/B220+/GFP+] ; plus de 5000 pour toutes les autres conditions, le plus souvent plus de 10000). La perturbation des paramètres de prolifération ou de viabilité par PAX5 pourrait être à l'origine du phénotype de différenciation observé. Nous avons des difficultés à reproduire ce résultat, le nombre de cellules [IP-/B220+/GFP+] restantes à J6 sans IL-7 étant le facteur limitant de cette condition.

Conditions PAX5 tronqué et PAX5-NCOR1 : Nous avons également relevé des blocages de différenciations plus modérés mais significatifs associés à l'expression des mutants PAX5 tronqué et PAX5-NCOR1 (jusqu'à respectivement 20% et 80% de plus de cellules bloquées au stade pré-B par rapport aux conditions contrôle). Ces populations de cellules bloquées se retrouvent manquantes dans les proportions de cellules différenciées pour ces deux conditions.

Conditions PAX5-ELN et PAX5-ETV6 : Concernant les cellules exprimant PAX5-ELN, nous avons également observé une tendance de blocage au stade pré-B (à la limite du seuil de significativité ; p=0,06). Nous avons noté une diminution de la proportion de lymphocytes double négatifs. Ceci peut être vu comme une confirmation de cette tendance, mais ne permet pas de distinguer un blocage strict de ces cellules ou une dérivation. Concernant les cellules transduites par PAX5-ETV6, nous n'avons noté aucune différence de représentation des différents stades par rapport aux conditions contrôle.

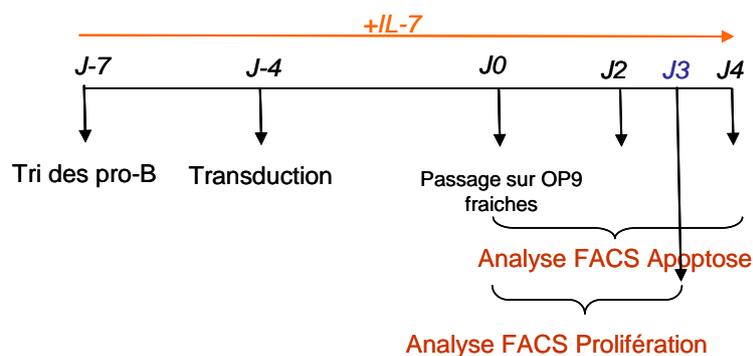
Les mutants de fusion de *PAX5* testés ici, à l'exception de *PAX5-ETV6*, ont donc une fonction inhibitrice sur la différenciation des cellules après 6 jours de privation en IL-7.

Variations de la GFP : Les taux de cellules exprimant les mutants ($N_{[IP-/B220+/GFP+]} / N_{[IP-/B220+]}$) évoluent différemment en fonction des conditions. La proportion de cellules exprimant *PAX5-ELN* chute de 75% entre J0 et J6, indépendamment de la présence ou non d'IL-7. Ceci pourrait signifier que l'expression prolongée de ce mutant provoque une mort cellulaire ou un ralentissement du cycle cellulaire. D'une manière différente, le taux de cellules exprimant *PAX5-ETV6* diminue de 30% entre les analyses à J6+IL-7 et celles à J6-IL-7, alors qu'ils ne varient pas entre J0 et J6 en présence d'IL-7. Cette observation nous suggère que ce mutant a un rôle dans la viabilité et/ou le cycle cellulaire par l'intermédiaire de la signalisation induite par l'IL-7.

(2) Evolution du cycle cellulaire et de la viabilité

Nous avons quantifié l'apoptose associée à l'expression des différents mutants par un test Annexine V-PE/7-AAD sur les cellules B220⁺/GFP⁺. Les modifications visibles de répartition des nuages de points SSC/FSC sont dues à un changement de FACS (données de différenciation sur le FC500 et données d'apoptose et de prolifération sur les LSRII).

Plan de l'expérience :



Sélection des cellules (figure 28)

Les cellules sont d'abord sélectionnées sur des critères de taille et de granulosité. Le LSRII fournit également les paramètres FSC-W et SSC-W, qui en relation avec FSC-A et SSC-A permettent d'éliminer les agrégats et les débris cellulaires. Les cellules isolées sont ensuite sélectionnées sur l'expression de B220. Puis nous avons fenêtré les cellules GFP

positives et analysé la répartition des populations en fonction des marquages Annexine V (en ordonnée) et 7-AAD (en abscisse).

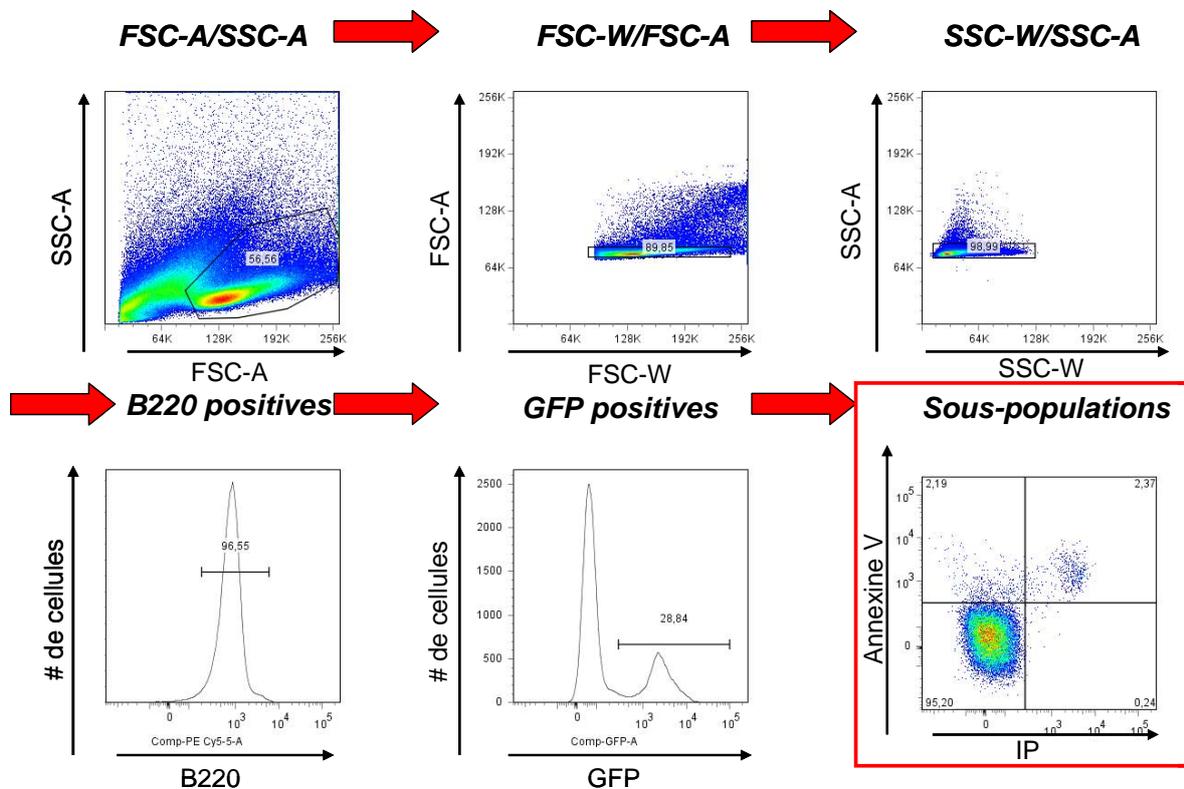


Figure 28 : Sélection de la sous-population d'étude dans les tests d'apoptose. Les flèches rouges symbolisent les 5 niveaux d'imbrication des sous populations. Les 3 sous populations décrites dans le rectangle rouge seront dénommées : cellules viables (en bas à gauche), apoptotiques (en haut à gauche), et nécrotiques (en haut à droite). La population en bas à droite est négligeable et artéfactuelle.

La figure suivante montre les taux de cellules en apoptose et en nécrose aux différents temps de l'expérience et pour l'ensemble des conditions (**figures 29 et 29 bis**). Les résultats présentés ici sont issus de cultures cellulaires effectuées dans les mêmes conditions que les échantillons cultivés en présence d'IL-7 dans l'expérience de différenciation. Pour l'ensemble des points, nous avons analysé plus de 10000 événements, excepté pour les cellules transduites avec *PAX5* sauvage où chaque point contient plus de 2500 événements et celles transduites avec *PAX5-ELN* où nous avons analysé au moins 7500 cellules GFP positives.

Proportions de cellules en apoptose et en nécrose

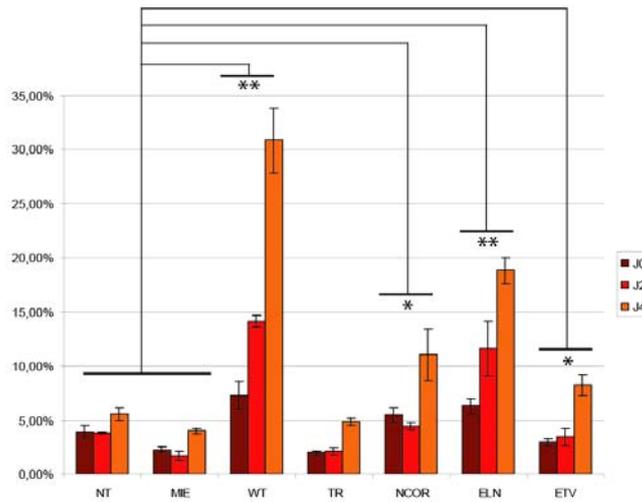


Figure 29 : Représentation de l'évolution de l'apoptose au cours du temps. Les barres montrent les taux de cellules en apoptose ou en nécrose ($GFP^+/B220^+/Annexine\ V^+/IP^+$ + $GFP^+/B220^+/Annexine\ V^+/IP^+$); J0 en bordeaux ; J2 en rouge ; J4 en orange. Les tests statistiques montrent l'existence de différences des proportions de cellules non viables à J0, J2 ou J4, de chacune des conditions par rapport aux contrôles NT et MIE (test de Mann-Whitney; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). NT = non-transduites ; WT = MIE-PAX5 sauvage ; TR = MIE-PAX5 tronqué ; NCOR = MIE-PAX5-NCOR1 ; ELN = MIE-PAX5-ELN ; ETV = MIE-PAX5-ETV6.

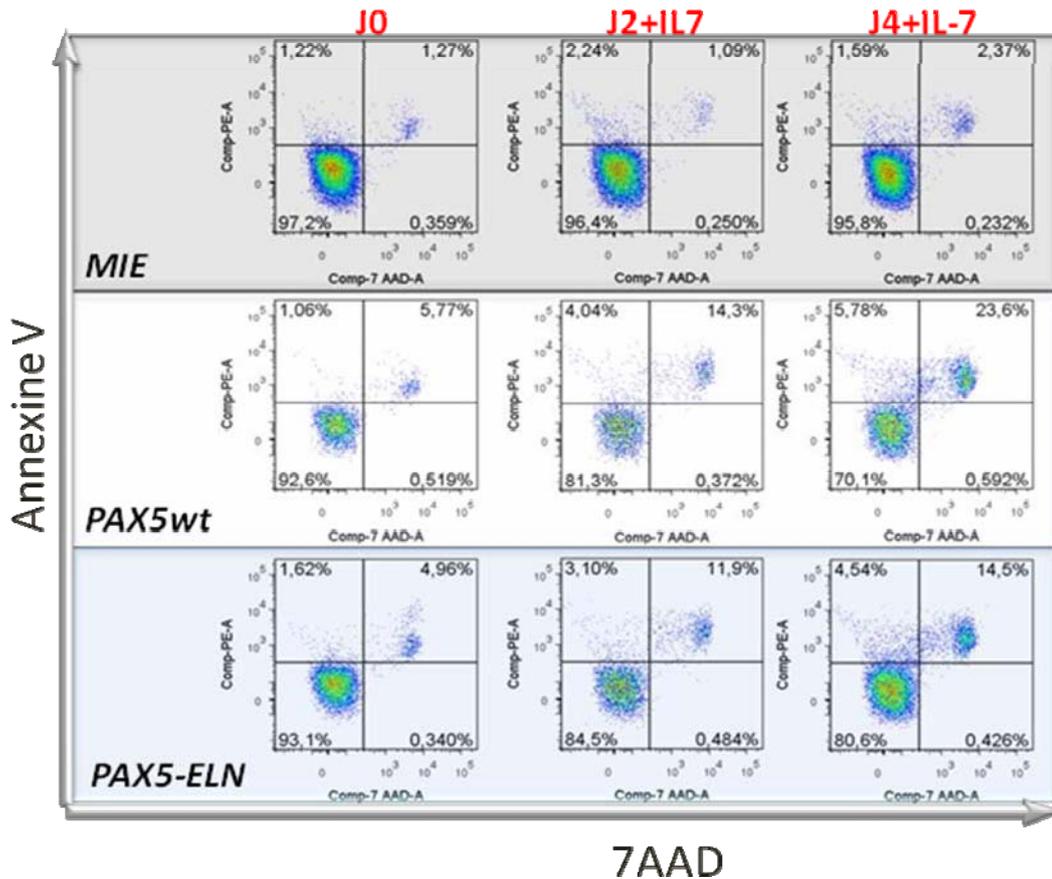


Figure 29 bis : Résultats bruts représentatifs de l'analyse de la mort cellulaire. Mutants à effets notables.

Cette expérience nous indique que les divers transgènes influencent différemment la viabilité cellulaire. Alors que les cellules transduites par *PAX5* tronqué ont des viabilités comparables aux contrôles (cellules non transduites et cellules transduites par MIE vide), l'expression ectopique de *PAX5* et de *PAX5-ELN* perturbe significativement ce paramètre. Pour ces deux conditions, les mesures effectuées à J0 sont dans le même ordre de grandeur que pour les autres conditions. Les différences relevées entre *PAX5-NCOR1* et *PAX5-ETV6* par rapport aux conditions contrôle sont moindres.

Condition PAX5 : En ce qui concerne les cellules transduites avec *PAX5*, ceci signifie que sa surexpression a probablement un effet de frein sur le cycle cellulaire dans les premiers temps (entre sa transduction à J-4 et J0). En effet, si l'ajout d'une certaine quantité de *PAX5* était immédiatement pro-apoptotique, nous l'aurions observé dans cette expérience. Le profil ascendant de la courbe de cellules nécrotiques nous renseigne sur la cinétique d'action d'une surexpression de *PAX5*. Par déduction, nous pouvons supposer qu'entre J-4 et J0, une plus forte dose de *PAX5* va bloquer le cycle cellulaire. Dans les 4 jours qui suivent (J0 à J4), nous avons observé que cette surexpression provoque l'apoptose et la mort de près de 30% des cellules transduites. Ce phénomène semblerait suffisant pour expliquer la baisse modérée de la proportion de cellules GFP⁺ observée entre J0 et J6 en présence d'IL-7 dans l'expérience de différenciation (**figure 26**).

Condition PAX5-ELN : Nous avons observé le même profil dans des proportions plus modérées pour les cellules transduites avec *PAX5-ELN*. En associant les profils observés ici aux données de taux de cellules GFP⁺ relevés dans l'expérience de différenciation, nous pouvons envisager que l'expression de *PAX5-ELN* n'a pas d'impact précoce (entre J-4 et J0) sur le cycle cellulaire ou sur la viabilité. En effet, le taux de transduction de *PAX5-ELN* pondéré par la taille de l'insert (**figure 27**) à J0 était comparable à celui des autres mutants. Cependant, nous avons observé une augmentation significative de l'apoptose entre J0 et J4 de culture en présence d'IL-7. En effet, à J4 près de 20% des cellules transduites avec ce mutant sont apoptotiques ou nécrotiques. *PAX5-ELN* semble donc toxique pour ces cellules au-delà de 4 jours après sa transduction. Ceci va dans le sens de la baisse du taux de cellules GFP⁺ observée entre J0 et J6 dans la manipulation de différenciation associée à ce mutant (**figure 26**). Cela dit, nous avons relevé une chute de 75% du taux de cellules transduites entre ces deux points. Nous ne pouvons pas dire à ce stade si la toxicité associée à l'expression de *PAX5-ELN* est le seul mécanisme responsable de cette baisse. Au regard des pentes des courbes d'apoptose et de nécrose présentées dans cette expérience, il semblerait que ce ne soit pas un mécanisme suffisant pour réduire des $\frac{3}{4}$ la proportion de cellules exprimant *PAX5-ELN*

au bout de 6 jours de culture en IL-7. A ce stade, nous ne pouvons cependant pas exclure un accroissement exponentiel de ce phénomène entre J4 et J6.

En accord avec les hypothèses avancées lors de l'expérience de différenciation, nous avons observé que tous les transgènes n'avaient pas des effets équivalents. Cette expérience nous a permis de montrer que l'apport de *PAX5* ou de *PAX5-ELN* avait un effet toxique sur les lymphocytes B.

(3) Analyse du cycle cellulaire

Dans exactement les mêmes conditions que pour l'expérience portant sur l'évaluation de l'apoptose, nous avons évalué le profil du cycle cellulaire à J3 en passant le point J0 afin de pondérer la division de fluorescence du Cell Trace Violet pour chaque échantillon (même type d'information que le CFSE que nous n'avons pas pu utiliser ici car nos cellules transduites fluorescent dans le même canal). Nous avons limité la durée de culture à 3 jours afin de conserver un signal Cell Trace Violet assez fort pour être analysable et également pour éviter que des biais de prolifération liés à la saturation des puits en cellules. Les cellules étudiées

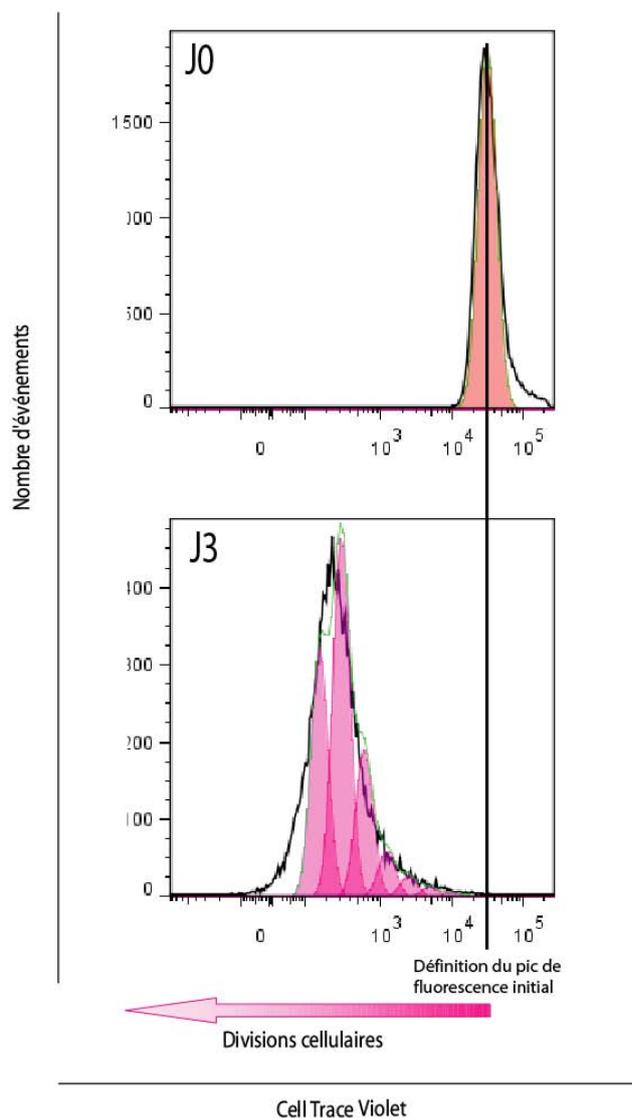


Figure 30 : Principe d'analyse de la prolifération. Le graphique du haut représente le signal Cell Trace Violet à J0 et sert d'étalon pour l'analyse à J3. Les courbes gaussiennes roses à J3 représentent graphiquement la quantification des générations effectuées sous FlowJo. Les courbes les plus à droite correspondant aux événements contenant le plus de Cell Trace Violet (premières générations de cellules). En allant vers la gauche, la fluorescence se dilue au fur et à mesure des divisions des cellules. Nous avons choisi de décrire 8 générations par échantillon, ce qui est la limite de pertinence statistique communément admise.

sont les cellules GFP^+ / $B220^+$ / $7-AAD^-$ / $Annexine V^-$, et fenêtrées sur les mêmes paramètres SSC-A/FSC-A, SSC-W/SSC-A, FSC-W/FSC-A que pour les tests d'apoptose (cela équivaut à sélectionner la population en bas à gauche de la **figure 28**). Nous avons quantifié les cellules des générations 0 à 7 et ajouté les cellules ayant subi 8 ou plus de divisions. La génération des résultats s'est faite sur le principe décrit dans la **figure 30**. Les analyses ont été effectuées avec le logiciel FlowJo v7.6.3. La définition de l'intensité du pic de fluorescence du Cell Trace Violet a été effectuée à J0 pour chaque échantillon et transposée à la condition à J3. S'agissant de la comparaison du même marqueur dans les mêmes espèces cellulaires, nous avons pu standardiser le paramètre de largeur des courbes gaussiennes défini par l'algorithme de ce logiciel. De plus, nous avons étalonné le coefficient de variation afin de pouvoir comparer les différentes conditions entre elles.

Sur la figure de résultats (**figure 31 et 31 bis**), nous avons réuni les points « Cellules non transduites » et « Cellules transduites avec le vecteur vide » afin de produire la condition contrôle (n=3). Concernant la condition PAX5 tronqué, nous n'avons pas d'écart-type à cause d'un défaut d'uniformité de marquage au Cell Trace Violet à J0 sur deux échantillons, rendant toute quantification à J3 impossible (n=1 présenté ici pour information). Pour la même raison, seulement 2 analyses des conditions PAX5 sauvage et PAX5-ETV6 sont représentées. Pour les conditions PAX5-NCoR1 et PAX5-ELN, nous avons n=3.

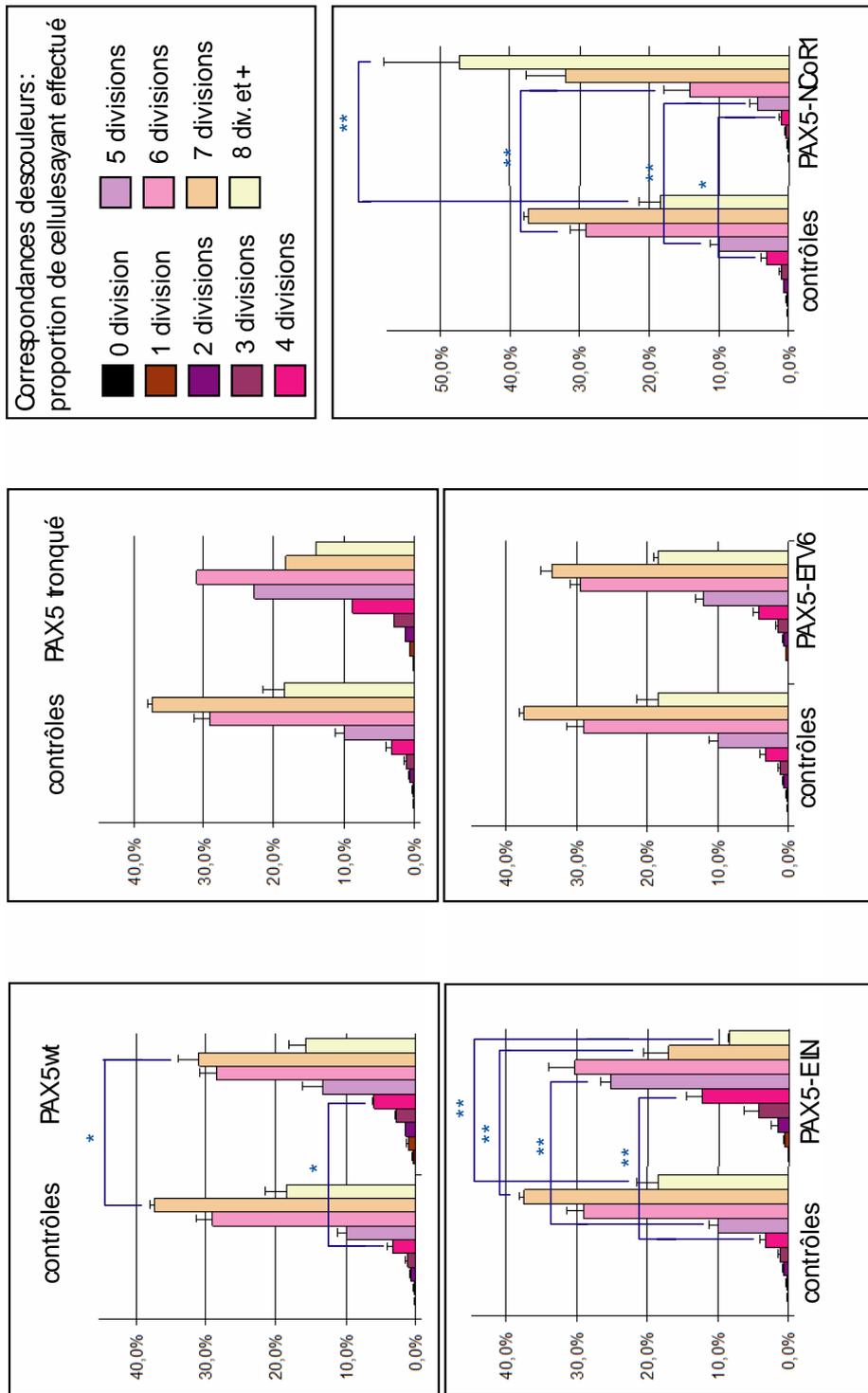


Figure 31 : Analyse de l'impact des différents mutants sur la prolifération cellulaire à J3. Le jeu de couleur symbolise la dilution de la fluorescence du Cell Trace Violet au cours de la division des cellules. Chaque mutant a été représenté dans le même rectangle, sur la droite de la condition contrôle. Les proportions de cellules ayant subi 8 divisions ou plus ont été calculées en soustrayant la somme des événements correspondants à chaque génération au nombre total d'événements analysés. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

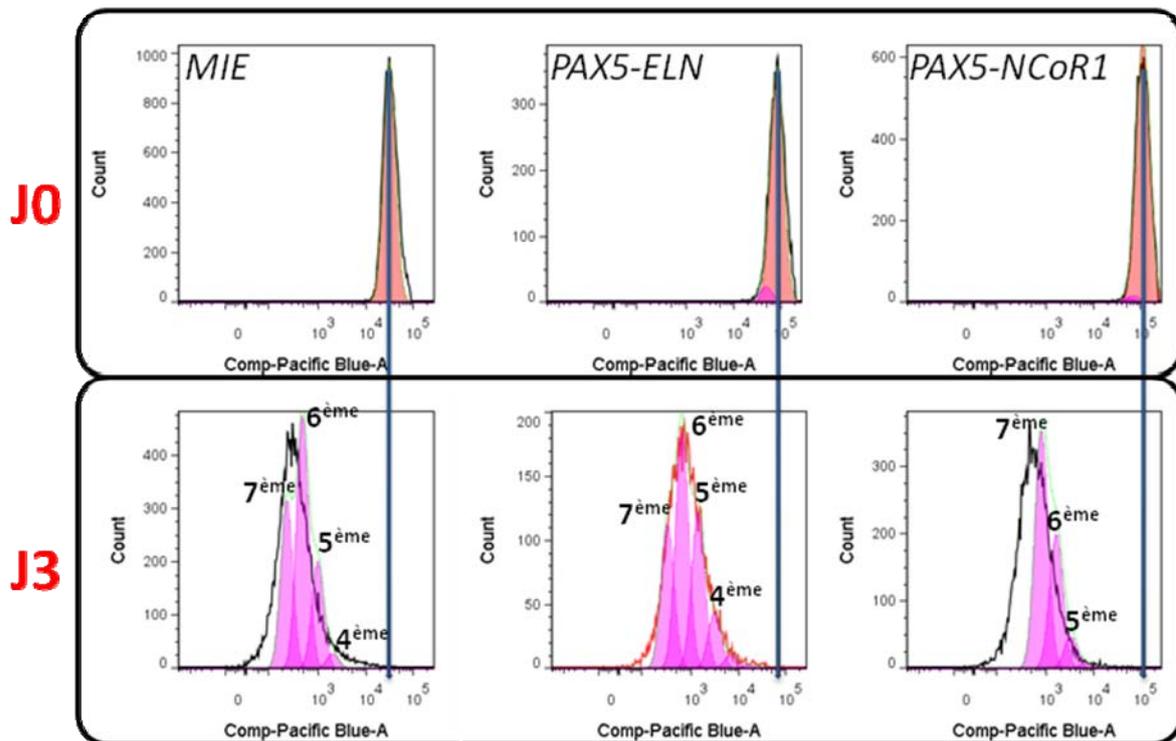


Figure 31 bis : Données brutes représentatives de l'analyse de la prolifération. Représentation de l'effet de frein de prolifération conféré par *PAX5-ELN* et de l'effet de gain de prolifération relatif à l'expression de *PAX5-NCOR1*. N^{ème} représente la population de la génération correspondante. En abscisse : intensité de fluorescence de Cell Trace Violet ; en ordonnée : nombre d'événements.

Condition PAX5 : Cette expérience nous indique que la surexpression de *PAX5* sauvage pourrait freiner légèrement la prolifération, comme nous le voyons ici par l'augmentation de la proportion de cellules de 4^{ème} génération et la diminution de la proportion de cellules de 7^{ème} génération par rapport à la condition contrôle. Les autres générations de cellules n'étant pas amplifiées ou diminuées dans cette condition, nous pouvons envisager que la surexpression de *PAX5* a un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules en culture en IL-7 à court terme. Cette hypothèse est en accord avec la baisse observée du taux de cellules transduites par *PAX5* entre J0 et J6 en présence d'IL-7 lors de l'expérience de différenciation (**figure 26**).

Condition PAX5-ELN : Nous pouvons remarquer un freinage conséquent de la prolifération associé à l'expression de *PAX5-ELN*. En effet, les 4^{ème} et 5^{ème} générations de cellules sont significativement plus représentées dans cette condition que dans la condition contrôle, alors que la 7^{ème} génération et les générations de cellules au-delà voient leurs proportions diminuer. En association avec sa toxicité relevée lors de son expression durant les tests d'apoptose, ce résultat renforce l'hypothèse que la réduction de 75% de la proportion de cellules GFP⁺ entre J0 et J6 en présence d'IL-7 (**figure 26**) est due au cumul d'un effet pro-apoptotique et d'un effet inhibiteur de prolifération de *PAX5-ELN*.

Condition PAX5-NCOR1 : Au contraire, la chimère *PAX5-NCOR1* confère aux cellules un fort caractère prolifératif. Les cellules ayant effectué 8 divisions ou plus sont significativement surreprésentées au détriment des cellules de 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} générations par rapport à la condition contrôle. Cette prolifération accrue pourrait expliquer l'augmentation de la proportion de cellules en apoptose à J4 pour cette condition. Un effet de saturation du puits pourrait expliquer ce phénotype. Cela pourrait expliquer que nous n'ayons pas pu relever de différence significative de la proportion de lymphocytes précoces *PAX5-NCOR1* positifs (GFP⁺) entre J0 et J6 avec IL7 par rapport aux cellules non-transduites des mêmes puits. Nous pouvons néanmoins penser qu'il existe une tendance à l'accroissement de cette population (**figure 26**).

Condition PAX5-ETV6 : Le mutant *PAX5-ETV6* ne semble conférer aucune propriété de prolifération particulière aux cellules B transduites, ce qui est en accord avec la stabilité de la proportion de cellules transduites par ce mutant entre J0 et J6 de culture en IL-7 (**figure 26**).

c) Discussion sur les résultats préliminaires

Ces travaux nous permettent de proposer quelques éléments de réponse aux problématiques posées dans ce projet.

iv) Quels sont les impacts oncogéniques de l'expression des chimères de PAX5 ?

Nous avons vu dans ces expériences que les différents mutants n'avaient pas des propriétés similaires. Nous allons dans ce paragraphe discuter des possibles explications des rôles observés pour chacune des conditions.

Le surdosage de PAX5 perturbe la physiologie précoce B

Nous avons observé que la surexpression de la forme sauvage de *PAX5* n'est pas anecdotique pour les cellules. L'apport de doses supplémentaires de *PAX5* induit une forte apoptose et paraît freiner la prolifération des cellules pré-B. De plus, lorsqu'elles sont privées d'IL-7 dans leur milieu, ces cellules semblent complètement incapables de conduire leur différenciation. Le bon dosage de *PAX5* apparaît donc être un paramètre central pour la conservation des propriétés d'expansion et de différenciation de ces cellules. Une première hypothèse consisterait à considérer que le phénotype hyper-prolifératif des lymphocytes pro-B *PAX5*^{-/-} soit dû à la levée d'un frein de prolifération ou à l'absence d'apoptose associée à *PAX5* (Nutt et al., 1999). Par un raisonnement logique, on peut donc penser qu'une surexpression de *PAX5* dans ces cellules pourrait engendrer un comportement contraire : défaut de prolifération et hausse du taux d'apoptose.

Dans l'introduction, nous avons vu que *PAX5* régulaient des gènes d'adhésion aux cellules stromales (*Cdc24a* et *Sdc4*) (Pridans et al., 2008). Une seconde hypothèse serait qu'une surexpression de ces facteurs, en répercussion de la surexpression de *PAX5*, pourrait modifier les paramètres d'accrochage des lymphocytes pré-B aux cellules stromales. Ayant besoin de s'affranchir de leur adhésion aux cellules du stroma pour se diviser, ces lymphocytes verraient ainsi leur capacité de prolifération diminuée.

Concernant le blocage de différenciation associé à la condition *PAX5* (si il est confirmé), nous pouvons imaginer que l'augmentation d'expression d'éléments du pré-BCR tels *Cd19*, *Cd79a*, *Blk*, *VpreB* ou $\lambda 5$ (Cobaleda et al., 2007b; Delogu et al., 2006; Schebesta et al., 2007) pourrait être à la base de ce phénotype. La régulation du pré-BCR est cruciale pour le franchissement du stade pré-BI. En particulier, son niveau d'expression à la membrane semble être un paramètre essentiel pour induire un signal suffisant pour passer ce point de contrôle de différenciation (Fuentes-Panana et al., 2004). En toute logique, la surexpression de certains de ses éléments suite à la surexpression de *PAX5* ne devrait pas faire diminuer ce niveau et ne devrait donc pas empêcher la différenciation jusqu'au stade petite pré-B. A ce stade, le pré-BCR s'auto régule négativement par l'activation d'Aïolos pour permettre la poursuite de la différenciation. En particulier, le rôle inhibiteur d'Aïolos sur la transcription des chaînes légères de substitution *VpreB* et $\lambda 5$ apparaît central (Parker et al., 2005)). Ces CLS étant des cibles directes de *PAX5*, nous pouvons envisager que les cellules arrivées à ce stade ne sont pas capables d'abaisser leurs niveaux d'expression. *PAX5* pourrait alors activer à outrance la transcription de ces cibles et inhiber ainsi l'action inhibitrice d'Aïolos. Ce mécanisme pourrait expliquer le blocage de différenciation observé dans cette condition **figure 26**. Afin de tester cette hypothèse, la répétition de cette expérience avec des marqueurs discriminants des stades pré-BI, grande pré-B et petite pré-B pourrait s'avérer informative (une combinaison anti-CD43/anti-Rag1/anti-CD25 sur cellules perméabilisées par exemple).

Les propriétés antiprolifératives et pro-apoptotiques des cellules surexprimant *PAX5* ne sont pas contradictoires avec le tableau mutationnel des LAL-B, dans la mesure où la duplication 9p est un phénomène très rare et l'amplification de *PAX5* est une altération qui n'a jamais été rapportée dans ces pathologies.

L'expression durable de *PAX5* tronqué modifie le phénotype des lymphocytes B précoces

Concernant l'impact de l'expression de la forme tronquée de *PAX5*, nous avons observé qu'elle pouvait induire un léger blocage de la différenciation. Par son action d'inhibition compétitrice sur les cibles de *PAX5*, nous pouvons envisager que les éléments

constitutifs du pré-BCR ou de sa signalisation soient sous-exprimés dans ces cellules. Comme nous l'avons évoqué, le taux d'expression à la membrane du pré-BCR est un paramètre essentiel au franchissement de ce point de contrôle (Fuentes-Panana et al., 2004). PAX5 tronqué pourrait donc bloquer la différenciation en empêchant PAX5 de transcrire suffisamment de constituants du pré-BCR. Les cellules bloquées seraient alors au stade pré-BI.

Pour ce mutant, nous avons mené d'autres expériences de culture des cellules en présence d'IL-7 sur une période plus longue. Nous avons relevé une réexpression systématique du marqueur des cellules souches et progénitrices c-Kit dans la majorité des cellules au bout de 18 jours. Ceci était accompagné d'un enrichissement des cellules GFP⁺ manifestement dû à une prolifération accentuée en association avec ce mutant (**figure 32**).

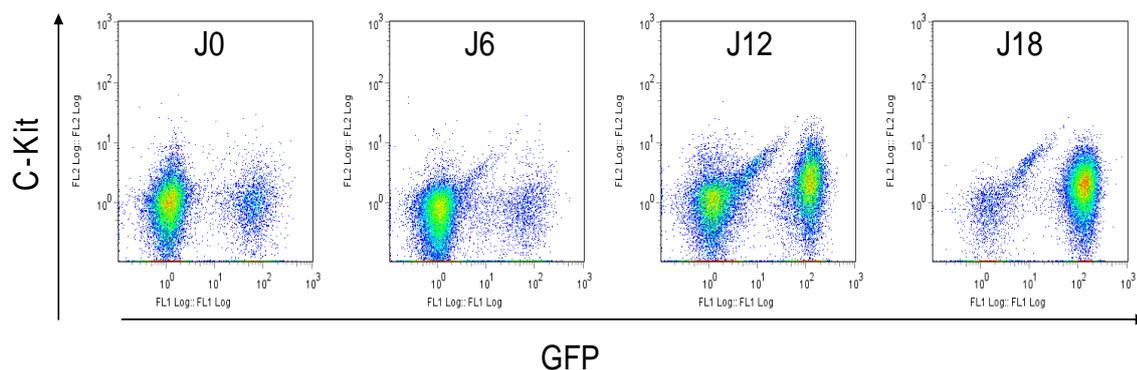


Figure 32 : Profils GFP/c-Kit des cellules transduites avec *PAX5* tronqué au cours du temps. Expérience représentative. Les cellules ont été cultivées en présence d'IL-7 et dans les mêmes conditions que décrites pour la manipulation de différenciation. Les cellules présentées ici sont sélectionnées sur les critères SSC/FSC et B220 positives (la fusée est due à l'absence de marquage exclusif de mort cellulaire à l'iodure de propidium ; nos taux de transduction étaient plus faibles à l'époque de ces expériences [mars-avril 2010]).

Cette observation pourrait être due à la nécessité d'un laps de temps pour acquérir des propriétés oncogéniques. L'augmentation manifeste de la proportion de cellules GFP⁺ à J12 et J18 manifeste soit d'une capacité de prolifération accrue pour les cellules exprimant le mutant *PAX5* tronqué, soit d'une protection contre l'apoptose de ces cellules par rapport à celles non transduites. La clé de la compréhension d'un tel délai nécessaire à l'apparition de ce phénotype particulier pourrait résider dans l'existence d'un seuil d'accumulation de *PAX5* tronqué capable d'inhiber assez fortement l'activité de *PAX5*. Nous avons montré que l'inhibition de l'activité de *PAX5* par *PAX5* tronqué est dose dépendante (voir article *Blood*). Une autre explication possible repose sur la stabilité des cibles de *PAX5* inhibées par *PAX5* tronqué. Nous pouvons envisager qu'une période soit nécessaire pour que certaines de ces cibles soient dégradées au niveau protéique. Le défaut de leur remplacement dû à l'inhibition de leur transcription par *PAX5* tronqué pourrait être le mécanisme à l'origine du phénotype observé. Des études complémentaires sont nécessaires pour répondre à ces questions.

L'acquisition du marqueur c-Kit témoigne soit d'une dédifférenciation vers le stade pro-B ou pré-pro-B, soit de l'expansion de rares cellules c-Kit positives présentes au moment de la transduction. Cet effet de l'expression prolongée de *PAX5* tronqué pourrait traduire une inhibition quasi complète de l'activité de *PAX5*, dans la mesure où il est cohérent avec le phénotype des cellules pro-B *PAX5*^{-/-}. Des expériences de différenciation de ces cellules à J18 vers la lignée T permettraient de tester cette hypothèse.

Lors des expériences entre J0 et J6 présentées ici, les cellules exprimant *PAX5* tronqué présentent des caractères oncogéniques modérés. L'expression durable (J12 et J18) de ce mutant semble suffisante à l'apparition d'une prolifération excessive et/ou d'un défaut

d'apoptose en présence d'IL-7. Son influence sur les capacités de différenciation devra être évaluée sur les cellules ayant acquis c-Kit à J18. Des reconstitutions de moelle de souris avec ces cellules seront également nécessaires pour tester ses implications dans les paramètres propres aux cellules leucémiques.

PAX5-NCOR1 est suffisant pour conférer des propriétés leucémiques aux cellules pré-B

Le mutant *PAX5-NCOR1* confère des propriétés de prolifération et de blocage de la différenciation aux lymphocytes pré-B dans lesquels il s'exprime. La cinétique d'apparition de la prolifération est bien plus rapide pour ce mutant que pour les cellules exprimant *PAX5* tronqué. Ceci signifie que le domaine apporté par *NCOR1* dans la chimère contribue à l'apparition des caractères oncogéniques dans les lymphocytes pré-B. De plus, le blocage des cellules au stade pré-B était plus important dans la condition *PAX5-NCOR1* que dans la condition *PAX5* tronqué. Le domaine conservé de *NCOR1*, fusionné avec le début de *PAX5*, semble donc avoir un impact aggravant sur les deux principaux paramètres pathologiques : le blocage de différenciation et la perte du contrôle de la prolifération. Ce caractère spécifique de *PAX5-NCOR1* pourrait être associé à la conservation de la fonction de co-répresseur transcriptionnel de la protéine *NCOR1* native dans la chimère. Ce mutant aurait ainsi un effet inhibiteur plus puissant sur les cibles de *PAX5* que la forme *PAX5* tronquée et provoquerait une émergence plus rapide du phénotype. Ce plus fort potentiel inhibiteur de *PAX5-NCOR1* par rapport à *PAX5* tronqué est d'ailleurs observable dans la figure S4 de notre publication dans *Blood*. A dose équivalente, il inhibe plus fortement la transcription de la luciférase dépendante de *PAX5*.

Pour ces deux premiers mutants, ces résultats montrent que la nature de l'altération de *PAX5* a un impact sur le développement B et que l'inhibition de l'activité de *PAX5* est associée à l'émergence de caractères oncogéniques.

PAX5-ELN a un effet antiprolifératif et pro-apoptotique à court terme sur les lymphocytes sauvages précoces

L'étude du mutant *PAX5-ELN* nous a révélé des résultats surprenants. Bien qu'il soit également capable d'inhibition compétitive sur la transcription dépendante de *PAX5* (Bousquet et al., 2007), nous lui avons associé des propriétés bien différentes de celles des précédents mutants. Nous avons observé que son expression menait à une déstabilisation de la différenciation de nature différente. Comme pour les cellules exprimant *PAX5-NCOR1* ou

PAX5 tronqué, les lymphocytes transduits par *PAX5-ELN* paraissent partiellement bloqués aux stades pré-B ($p=0.057$). Cependant, au lieu d'observer un déficit de cellules différenciées ayant acquis $Ig\kappa$, nous avons observé un défaut du taux de cellules $BP1^-/Ig\kappa^-$.

Sur le plan de la viabilité, *PAX5-ELN* semble aussi agir autrement. Il est à la fois capable de freiner la prolifération et d'induire l'apoptose des cellules dans lesquelles il s'exprime. Les caractéristiques des cellules exprimant cette chimère sont en contradiction avec celles des blastes dans la pathologie. Nous pourrions envisager qu'un événement mutationnel collaboratif soit nécessaire à l'acquisition d'un rôle oncogénique par ce mutant. Comme nous l'avons exposé dans le rapport de cas présenté dans ce manuscrit, le locus de l'*ELN* est situé dans une région chromosomique associée de manière récurrente à des translocations chromosomiques impliquant *PAX5*. L'étude des mutants de fusion *PAX5-AUTS2* et *PAX5-POM121*, eux aussi situés dans cette région 7q11, pourrait apporter un éclaircissement sur l'importance de l'altération de cette région dans la leucémogénèse. Dans le système que nous utilisons, les mutants sont introduits dans des cellules pré-B normales. En utilisant ce système, nous pourrions évaluer l'impact de l'expression de *PAX5-AUTS2* et de *PAX5-POM121*. S'ils se comportent comme *PAX5-ELN*, il sera fort probable qu'un gène présent en 7q11 soit altéré dans les LAL-B chez les patients. Cette altération serait alors une condition nécessaire à l'émergence de la pathologie.

Sur un plan structural, *PAX5-ELN* conserve les exons 6 et 7 de *PAX5*, qui sont perdus dans les autres chimères. Il se pourrait également que les régions codées par cette séquence soient associées aux propriétés pro-apoptotiques. La transduction d'une forme de *PAX5Δ8-10* pourrait permettre de tester cette hypothèse.

Enfin, la présence de cette translocation chez deux adultes (16 et 37 ans) nous suggère que des événements additionnels soient nécessaires à l'émergence de la pathologie.

Le mutant *PAX5-ETV6* agit différemment des mutants *PAX5-NCoR1* et *PAX5-ELN*

En ce qui concerne l'expression de la fusion *PAX5-ETV6*, nos expériences n'ont pas permis de l'associer à quelque caractère oncogénique que ce soit. *ETV6* étant un facteur de transcription également associé à la différenciation dans l'hématopoïèse, la perte d'un de ses allèles dans la translocation $dic(9;12)(p13;p13)$ pourrait être un événement collaboratif pour l'émergence de la pathologie (Raimondi et al., 1997; Sulong et al., 2009). *PAX5-ETV6* présente aussi la particularité d'être la seule chimère dans le cadre de lecture à perdre la région codée par l'exon 5 de *PAX5*. Ceci pourrait modifier l'impact de cette fusion sur la fonction de *PAX5* sauvage par rapport aux effets décrits pour *PAX5* tronqué et *PAX5-NCoR1*.

Cependant, des propriétés oncogéniques liées à son expression ont été montrées à des temps de culture plus tardifs et en analysant des marqueurs différents (Fazio et al., 2008). Les auteurs de ce travail ont montré que cette chimère était capable d'inhiber l'activité de PAX5, de ralentir la différenciation et de modifier les propriétés de migration des lymphocytes dans lesquels elle s'exprime. De plus, sur un fond *Pax5*^{-/-}, l'expression de ce mutant ne permet pas de rétablir le potentiel de différenciation des lymphocytes bloqués au stade pro-B.

L'ensemble de ces travaux renforce l'hypothèse que les fusions de *PAX5* peuvent être des événements initiateurs de la leucémogénèse. Nous avons pu distinguer des impacts oncogéniques différents en fonction de la nature de son partenaire. Comme nous l'avons décrit, et comme retrouvé dans la littérature, tous les mutants étudiés ici sont capables d'inhiber la transcription dépendante de *PAX5*. Cependant, tous ne présentent pas des propriétés oncogéniques, probablement du fait de la nécessité de répéter ces expériences sur des temps plus longs et de l'absence de mutations additionnelles dans le système cellulaire utilisé. En particulier, les translocations chromosomiques impliquant *PAX5* sont pour la plupart associées à la perte du reste de la région télomérique du bras 9p. Cette région chromosomique contient notamment *CDKN2A* dont l'haploinsuffisance pourrait contribuer au phénotype leucémique (Sulong et al., 2009). Cependant, nous avons observé des effets importants dans la condition *PAX5*, et dans les conditions des mutants retrouvés chez des patients ayant perdu *CDKN2A* : *PAX5* tronqué et *PAX5-NCOR1*. Ces deux derniers mutants conservent les 5 premiers exons de *PAX5*, comme la plupart des autres fusions de *PAX5* décrites, et semblent donc représentatifs. A partir des résultats préliminaires présentés ici et des données de la littérature, nous pouvons esquisser une hypothèse de travail pour expliquer les événements associés aux fusions de *PAX5* (**figure 33**).

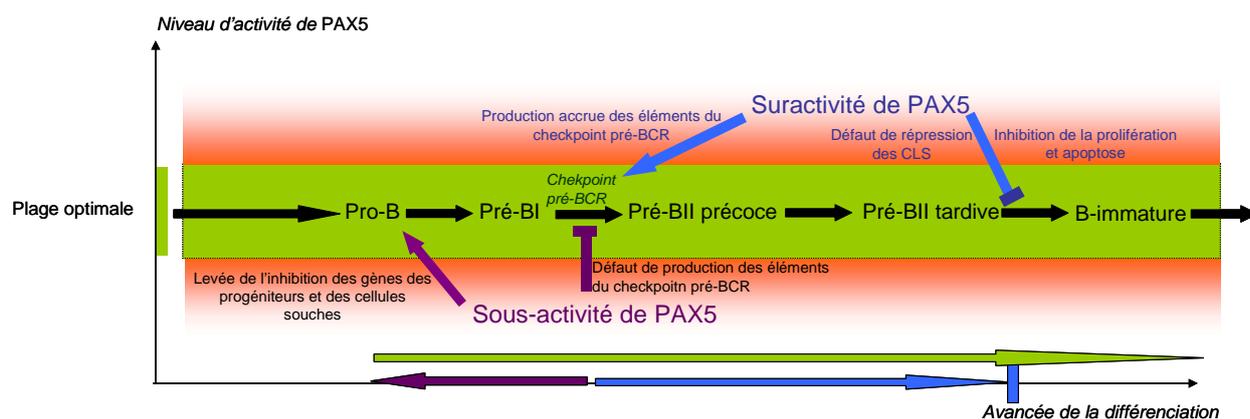


Figure 33 : Hypothèses des impacts des variations d'activité de PAX5. Ce schéma décrit les mécanismes possibles associés aux phénotypes observés dans les différentes conditions lors des stades précoces de différenciation B. Les cellules pré-B transduites : effectuent leur différenciation correctement si PAX5 a une niveau d'activité correct (code couleur vert) ; se différencient si l'activité de PAX5 est trop faible ou perdue (code couleur violet) ; sont bloquées à la transition petite pré-B/B immature si PAX5 a une activité excessive. En partant de l'hypothèse qu'une surexpression de PAX5 est associée à une suractivité de PAX5 et que l'expression des mutants de fusion de PAX5 diminue son activité, cette figure est une compilation des données de la littérature présentées en introduction et des résultats préliminaires décrits ici.

Nous supposons qu'une surexpression de PAX5 mène à une augmentation de l'activité de PAX5. Nous avons décrit qu'une coexpression des chimères de ce gène avec sa forme sauvage mène à la diminution de son activité transcriptionnelle sur certaines cibles. Le système murin utilisé pour ces analyses fonctionnelles possède deux allèles normaux de *Pax5*. Ceci signifie que les formes mutantes sont coexprimées avec la forme sauvage (comme chez les patients, mais à une dose correspondant à l'expression des deux allèles au lieu d'un). Nous avons noté un blocage de différenciation soit en cas de surexpression de PAX5, soit dans les conditions exprimant les mutants. Ces résultats suggèrent l'existence d'une fenêtre d'activité optimale de PAX5 permettant de conduire la différenciation jusqu'au stade B mature. Certains résultats présentés ici nécessitent d'être réitérés et d'autres expériences sont nécessaires. Il serait particulièrement intéressant d'effectuer des cultures à long terme en présence d'IL-7, puis des inductions tardives de différenciation. De plus, il semble important d'utiliser un panel de marqueurs discriminants les stades pro-B, pré-BI, pré-BII précoce et pré-BII tardif afin de préciser les mécanismes susceptibles d'être altérés par l'expression des différents transgènes. Enfin, des expériences de transfection de différentes cibles régulées par PAX5 dans les cellules exprimant les mutants pourraient permettre de déterminer les éléments critiques associés au blocage de différenciation, aux modifications de la prolifération, ou à l'apoptose.

VI. Discussion générale et conclusions

L'ensemble de nos travaux souligne la large diversité des gènes partenaires de fusion de *PAX5*. L'étude de la cohorte de patients du GFCH nous a permis de distinguer plusieurs profils cytogénétiques impliquant *PAX5* dans les LAL-B. Ainsi, nous avons relevé que les délétions d'un allèle de *PAX5* semblaient être des événements secondaires dans ces pathologies (potentiellement aggravants (Mullighan, 2009)). Par ailleurs, nous avons identifié un profil caryotypique simple associé aux remaniements internes du locus de *PAX5*.

Les études fonctionnelles nous ont permis de distinguer des propriétés différentes en fonction de la nature des gènes qui lui sont fusionnés. Certains mutants comme *PAX5* tronqué ou *PAX5-NCOR1* provoquent des effets assimilables au processus leucémique, c'est-à-dire un blocage de différenciation des cellules au stade pré-B et des propriétés de prolifération ou de résistance à l'apoptose accrues. Cependant, la cinétique d'apparition des caractères oncogéniques pour ces deux mutants est manifestement différente. Ceci suggère que le partenaire de fusion a une influence sur les mécanismes transformants associés aux mutants de *PAX5*.

L'étude de l'impact de *PAX5-ELN* dans ces cellules nous a montré que ce mutant était incapable de provoquer une transformation leucémique, ou même l'émergence de propriétés associées à un tel processus. Au contraire, *PAX5-ELN* semble conférer des propriétés pro-apoptotiques et antiprolifératives aux cellules qui l'expriment. Des mécanismes différents paraissent associés aux mutants *PAX5-NCOR1* et *PAX5-ELN*. Des mutations additionnelles pourraient être nécessaires à l'acquisition d'une fonction oncogénique par *PAX5-ELN* (potentiellement des altérations locales de régulation ou de structure de certains gènes au niveau du locus 7p11).

Nous avons décrit dans notre article l'ensemble des partenaires qui lui sont associés. A ce jour, plus de 20 gènes ont été identifiés comme impliqués dans ces mécanismes. Les approches actuelles reposent sur l'utilisation de techniques pan génomiques d'analyse des variations du nombre de copies par puces CGH-SNP (Kawamata et al., 2008; Mullighan et al., 2007). Cependant, ces techniques ne sont pas adaptées pour identifier les gènes impliqués dans des translocations équilibrées (comme c'est le cas pour *PAX5-ELN* par exemple). Les approches moléculaires que nous avons mises en place permettent l'identification de ces partenaires.

Les gènes fusionnés à *PAX5* peuvent être de nature très différente, codant des facteurs de transcriptions (*ETV6*, *FOXP1*), des protéines structurales (*ELN*), des protéines impliquées

dans la transduction du signal (*JAK2*), des facteurs de corégulation transcriptionnelle (*NCoR1*), ou encore des protéines de rôle inconnue (*DACH2*). L'absence d'unicité fonctionnelle ou structurale des partenaires de fusion de *PAX5* ne rend pas pour autant accessoire la caractérisation de l'impact mécanistique des différentes chimères. La comparaison des effets et des mécanismes oncogéniques associés à chacun des mutants permettrait de dégager quels sont les paramètres modifiés par la présence constante du domaine de liaison à l'ADN de *PAX5* conservé dans la chimère, et ceux modifiés en conséquence de la nature de la partie apportée par le partenaire de fusion. Dans cet esprit, les équipes de Giovanni Cazzaniga et de Tomoki Naoe ont cherché à élucider les implications fonctionnelles de l'expression de *PAX5-ETV6* et de *PAX5-PML* (Fazio et al., 2008; Kurahashi et al., 2011).

L'équipe de Giovanni Cazzaniga a ainsi montré que l'expression de *PAX5-ETV6*, dans un modèle comparable au nôtre, était capable d'induire une baisse d'expression des cibles de *PAX5* précédemment décrites. Leurs travaux montrent que cette chimère provoque aussi une diminution de l'expression de la chaîne lourde μ H. Ils ont également décrit une résistance à l'apoptose accrue des cellules transduites par *PAX5-ETV6* par rapport aux cellules transduites avec le vecteur vide lors d'un traitement au TGF β 1. Ceci pourrait être une des propriétés oncogéniques associée à *PAX5-ETV6*. Nous avons évalué l'apoptose seulement en culture en présence d'IL-7, ce qui explique pourquoi nous n'avons pas de données à comparer à leurs résultats. Nos analyses sur *PAX5-ETV6* ne sont donc pas en contradiction avec ces travaux. L'augmentation de l'apoptose liée à l'expression de ce mutant est minime (**figure 29**) et pourrait être due à la forte concentration de cellules dans ces puits. L'étude de *PAX5-ETV6* menée par cette équipe a mis en évidence d'autres propriétés de cette chimère : résistance à la mort cellulaire lors de la privation en IL-7 jusqu'à J4 (nous n'avons pas relevé de différence à J6 [**figure 26**], ce qui suggère que ces lymphocytes ne présentent que la propriété de retarder la mort associée à l'entrée en différenciation) ; capacité de recruter des cofacteurs de répression transcriptionnelle associés aux séquences d'ETV6 (comme mSin3A) (ce qui confirme que les domaines apportés à *PAX5* sont fonctionnels) ; baisse de l'expression de CD19 et de B220 qui s'accroît au cours du temps (jusqu'à J19) (ce qui soutient l'hypothèse d'une action tardive de certains mutants comme évoquée pour *PAX5* tronqué dans la discussion des résultats préliminaires) (Fazio et al., 2008). Les auteurs ne se sont cependant pas penchés sur les altérations des cibles ou des fonctions d'ETV6 dans ce modèle. ETV6 conservant la quasi-totalité de sa structure dans la chimère, son homologue sauvage codé par l'allèle normal pourrait avoir un fonctionnement altéré en sa présence. De plus, sa perte

d'hétérozygotie a été évoquée comme un événement fréquent dans les LAL (Stegmaier et al., 1995). Ceci pourrait constituer un événement supplémentaire requis pour l'acquisition de propriétés oncogéniques fortes par *PAX5-ETV6* chez les patients. Nous pouvons noter, en associant les résultats de cette étude aux nôtres, que *PAX5-ETV6* a bien des propriétés différentes de *PAX5-NCOR1*. Cette comparaison souligne encore un peu plus l'implication de la région partenaire dans les mécanismes pathologiques associés aux chimères de *PAX5*.

L'étude de *PAX5-PML* menée par l'équipe de Tomoki Naoe conforte aussi cette hypothèse (Kurahashi et al., 2011). Ils montrent que l'inhibition compétitive de *PAX5-PML* sur les cibles de *PAX5* n'est pas due à la fixation directe de la chimère sur les cibles de *PAX5* sauvage, mais à sa fixation sur *PAX5*. Lui-même étant fixé à son promoteur cible, *PAX5-PML* bloquerait son activité transcriptionnelle par cette interaction. Ils appuient notamment cette hypothèse sur des expériences de ChIP montrant que *PAX5-PML* n'a pas les mêmes capacités de liaison à l'ADN que *PAX5* et que l'action inhibitrice de *PAX5-PML* nécessite son hétérodimérisation avec *PAX5* sauvage (Kurahashi et al., 2011). Des capacités de fixation équivalentes pour certains mutants de fusion de *PAX5* avaient pourtant été montrées (Bousquet et al., 2007; Kawamata et al., 2008), ce qui suggère que toutes les chimères n'ont pas le même mécanisme inhibiteur sur la transcription *PAX5* dépendante. De plus, leurs travaux montrent que *PAX5-PML* modifie également le fonctionnement de *PML* sauvage. Ils ont ainsi démontré qu'il était capable d'inhiber la SUMOylation de *PML*. Cette action empêche la formation des concentrations nucléaires focales de *PML* (*PML bodies*), structures nécessaires à l'activation de l'apoptose dépendante de *p53*. Il a en effet été montré que la présence de ces structures nucléaires était nécessaire à l'induction des mécanismes suppresseurs de tumeurs dépendants de *p53* (Fogal et al., 2000). Les auteurs proposent donc un double mécanisme oncogénique de *PAX5-PML* : une capacité à inhiber la transcription des cibles de *PAX5*, empêchant ainsi la progression de la différenciation B ; et un rôle déstabilisateur des corps nucléaires *PML* par l'inhibition de la SUMOylation de *PML*, ce qui bloque la réponse apoptotique des cellules en réponse au stress oncogénique. Cette étude montre pour la première fois un rôle propre au partenaire de fusion de *PAX5* et souligne la nécessité de considérer chaque fusion comme un cas particulier. La poursuite de ces études avec d'autres chimères est nécessaire pour décrypter les mécanismes oncogéniques mis en jeu lors des réarrangements de *PAX5*. Elle montre également que chaque partenaire peut apporter une contribution oncogénique et renforce la pertinence de la caractérisation des mécanismes associés à l'expression des gènes de fonction inconnues fusionnés avec *PAX5*.

Nous avons observé des propriétés particulières suite à la transduction de *PAX5* sauvage dans notre modèle. A ce jour aucune donnée rapportant des résultats similaires n'a été publiée dans les lymphocytes pré-B. Cependant, des études de surexpression de *PAX5* dans des lignées de myélomes multiples ont montré qu'il pouvait induire l'apoptose de ces cellules. La baisse de la production du facteur anti-apoptotique *MCL-1* associée à cette surexpression a été avancée pour expliquer ce phénotype (Proulx et al., 2010). D'un autre coté, il a été rapporté une amplification du locus de *PAX5* dans 4 cas de lymphome anaplasique à grandes cellules de phénotype T. Les auteurs suggèrent que la surexpression de *PAX5* puisse être un mécanisme oncogénique dans ces cellules (Feldman et al., 2010). Il semble donc que l'expression ectopique ou pathologique d'un taux important de *PAX5* puisse avoir un impact anti- ou pro-oncogénique selon les types cellulaires concernés. Bien que la surexpression de *PAX5* n'ait pas été rapportée dans les LAL-B, l'étude des mécanismes de prolifération et d'apoptose dérégulés dans ce cas de figure pourrait mettre en évidence une implication de *PAX5* dans l'homéostasie du compartiment B.

Nous avons vu dans nos travaux que près de la moitié des cas de réarrangements de *PAX5* l'associaient à des séquences codantes en sens inverse, hors du cadre de lecture, ou à des séquences non-codantes. Cette observation soulève la question de la traduction ou non des protéines codées par ces gènes de fusion. Dans le cas des réarrangements avec des partenaires hors du cadre de lecture, la structure 3' du gène de fusion est normale dans la mesure où elle contient les séquences d'épissage, de signal de polyadénylation et de terminaison de transcription. Cependant, l'occurrence d'un signal de terminaison (codon stop) précoce dans la séquence codante peut activer des mécanismes de surveillance de la cellule capables de dégrader les ARNm anormaux. Par rapport à l'existence de mécanismes de contrôle de la bonne structure des ARNm au sein des cellules (et en particulier du Non-Sense Mediated Decay), nous ne pouvons affirmer que les protéines tronquées codées par ces mutants vont être traduites. Concernant le mutant *PAX5* tronqué utilisé dans nos études fonctionnelles, sa structure génomique chez les patients contient un site de polyadénylation et un signal de fin de transcription dans l'intron 5-6. Ceci devrait permettre également sa transcription et sa traduction correcte, d'autant plus que cette forme a été détectée de manière physiologique dans des lymphocytes B murins matures. Les autres mutants codant un *PAX5* tronqué ont été amplifiés avec succès par PCR après transcription inverse à l'aide d'une amorce oligo-dT. La présence d'une queue polyA dans leurs transcrits et l'épissage correct des introns révèlent qu'ils sont normalement maturés par la cellule. Il est probable que certains de ces mutants soient traduits par les cellules leucémiques. Contrairement aux mutants de fusion dans le

cadre de lecture, il est concevable que les mutants tronqués de *PAX5* aient des propriétés similaires quels que soient les gènes partenaires impliqués. Ils pourraient cependant présenter des variations d'impact en fonction des points de cassure dans *PAX5*. Par ailleurs, la perte d'hétérozygotie des gènes partenaires consécutive à ces remaniements chromosomiques pourrait constituer un événement pro-oncogénique en soi et participer ainsi à la leucémogénèse.

L'expression de *PAX5* est normalement restreinte à certains tissus mais sa réexpression a été fréquemment observée dans différents cancers non-hématologiques. Différentes études sont à considérer avec précaution dans la mesure où l'anticorps utilisé ne permet pas de distinguer *PAX2* et *PAX5* qui sont structurellement très proches (Morgenstern et al., 2010). Cependant, des études moléculaires et fonctionnelles ont permis de l'associer avec certitude à plusieurs cancers. Il apparaît avoir un rôle suppresseur de tumeur par sa capacité à activer la voie de signalisation pro-apoptotiques dépendante de p53 dans des carcinomes hépatiques (Liu et al., 2010). Un rôle de contrôle de la prolifération lui a aussi été attribué dans certains cancers du sein. En effet, des expériences *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que sa surexpression a des effets anti-prolifératif et proapoptotique dans ces cellules (Vidal et al., 2010). Ces deux études vont dans le sens des hypothèses avancées dans cette thèse, dans la mesure où la surexpression de *PAX5* est responsable de caractères anti-prolifératifs et de blocage de différenciation. Ce gène aurait donc un rôle comparable sur plusieurs types cellulaires différents, conformément à ce qui a été avancé par le groupe de Shaji Kumar (Balczarek et al., 1997). L'expression de *PAX5* a également été associée à des tumeurs d'origines neurales comme les neuroblastomes ou les cancers du poumon à petites cellules (Baumann Kubetzko et al., 2004). Contrairement aux autres études où il a un rôle inhibiteur sur la prolifération, les auteurs ont montré que son expression augmentait le potentiel de prolifération des cellules de ces types de cancer. Il a été proposé que ces fonctions soient consécutives à l'activation de la transcription du récepteur à activité tyrosine-kinase c-Met (Kanteti et al., 2009), mécanisme associé à l'augmentation de la prolifération (Maulik et al., 2002). Sa surexpression reste cependant associée à un blocage de différenciation dans ces cancers.

En conclusion, nos travaux ont permis de mettre en évidence des profils caryotypiques particuliers associés à la délétion ou aux remaniements de *PAX5*. Ces descriptions soulignent le caractère initiateur des fusions de *PAX5* dans l'oncogénèse et font apparaître les délétions

d'un allèle de *PAX5* comme un événement secondaire. Par l'utilisation de techniques de biologie moléculaire innovantes, nous avons identifié cinq nouvelles mutations conséquentes à un remaniement interne du locus de *PAX5*. Nous avons ainsi mis en relief l'hétérogénéité des fonctions et des structures de ses partenaires de fusion. Les analyses fonctionnelles préliminaires menées sur certains de ces mutants nous ont révélé qu'ils n'avaient pas des impacts oncogéniques équivalents. Nos observations suggèrent fortement que le gène fusionné à *PAX5* joue un rôle dans la détermination des paramètres leucémiques. Les expériences de transduction des lymphocytes pré-B avec *PAX5* nous ont également montré que son excès de dosage avait un impact négatif sur la prolifération et la survie cellulaire. Enfin, la réacquisition du marqueur précoce c-Kit à long terme dans les cellules transduites avec *PAX5* tronqué peut indiquer l'existence d'un effet seuil inhibiteur du mutant sur l'activité de *PAX5* sauvage. Une inhibition suffisante de *PAX5* pourrait ainsi compromettre la poursuite, voire le maintien de l'identité B. Les études présentées ici méritent d'être poursuivies afin d'être validées statistiquement dans leur totalité. Elles pourront ainsi servir de base pour la caractérisation plus fine des mécanismes impliqués dans les phénotypes observés. Nos résultats et ceux des études de *PAX5-ETV6* et de *PAX5-PML* montrent que des analyses fonctionnelles de plusieurs chimères de *PAX5* devront être conduites. Ces travaux donneront une vision globale des événements oncogéniques associés aux LAL-B présentant un remaniement de *PAX5*, et plus largement, pourront définir différentes voies d'oncogenèse activées dans ces pathologies. L'identification de nouveaux partenaires de fusion permettra d'entreprendre leur caractérisation fonctionnelle et éventuellement d'associer des gènes de fonction inconnue à des propriétés liées à la leucémogénèse.

VII. Perspectives

L'ensemble de nos travaux et des études publiées soutiennent que les mutations par remaniement chromosomique du locus de *PAX5* ont un impact déterminant dans la leucémogénèse. A ce jour, de nombreuses questions demeurent sur les modes d'action de ces mutants. Afin de mieux déterminer les mécanismes moléculaires associés à leurs propriétés oncogéniques, j'ai développé un projet de caractérisation des complexes protéiques associés à *PAX5* et à ses mutants au cours de la différenciation B. Au sein de l'équipe spécialisée en spectrométrie de masse du Dr. Brian Raught qui m'accueille en post-doctorat (Toronto, Ontario Cancer Institute), je dissèquerai les complexes protéiques contenant *PAX5*, *PAX5* tronqué, *PAX5*-NCoR1, *PAX5*-ETV6 et *PAX5*-ELN. Ces analyses seront effectuées dans des lignées cellulaires et décriront la nature des composants capables de se lier à ces protéines. Les complexes protéiques identifiés seront localisés sur le génome par des expériences de ChIPseq. Ceci permettra de proposer un schéma de dérégulation associé aux mutations de *PAX5*. Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, *PAX5* joue plusieurs rôles au cours de la différenciation B : promotion de la transcription des gènes B, inhibition de la transcription des gènes des autres lignées, régulation de la recombinaison $V(D)J$ et inhibition de la différenciation plasmocytaire. La nature des complexes comprenant *PAX5* est donc probablement variée et évolue au cours de l'avancée du programme B. Ainsi, j'ai également prévu de caractériser la nature de ces complexes protéiques aux différents stades de la différenciation B. Pour cela, j'utiliserai le modèle de différenciation B *ex-vivo* présenté ici pour les stades précoces, et purifierai directement les cellules des stades plus matures à partir de moelle osseuse et de rates de souris. Ces travaux visent à proposer une description dynamique des fonctions de *PAX5* au cours du programme de développement B. Ils apporteront aussi des réponses sur l'origine mécanistique des altérations du développement B induites par les mutants de *PAX5*.

VIII. Références bibliographiques

- 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.
- Adolfsson, J., Borge, O.J., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Astrand-Grundstrom, I., Sitnicka, E., Sasaki, Y., and Jacobsen, S.E. (2001). Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 15, 659-669.
- Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., *et al.* (2005). Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121, 295-306.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Akira, S., Okazaki, K., and Sakano, H. (1987). Two pairs of recombination signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining. *Science* 238, 1134-1138.
- Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., and Bhandoola, A. (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat Immunol* 4, 168-174.
- 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.
- 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.
- Andersson, A., Olofsson, T., Lindgren, D., Nilsson, B., Ritz, C., Eden, P., Lassen, C., Rade, J., Fontes, M., Morse, H., *et al.* (2005). Molecular signatures in childhood acute leukemia and their correlations to expression patterns in normal hematopoietic subpopulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19069-19074.
- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118, 149-161.
- Arai, F., and Suda, T. (2007). Regulation of hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Adv Exp Med Biol* 602, 61-67.
- Arinobu, Y., Mizuno, S., Chong, Y., Shigematsu, H., Iino, T., Iwasaki, H., Graf, T., Mayfield, R., Chan, S., Kastner, P., and Akashi, K. (2007). Reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 marks initial specification of hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages. *Cell Stem Cell* 1, 416-427.
- Arlt, M.F., Durkin, S.G., Ragland, R.L., and Glover, T.W. (2006). Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA Repair (Amst)* 5, 1126-1135.
- Arseneau, J.R., Laflamme, M., Lewis, S.M., Maicas, E., and Ouellette, R.J. (2009). Multiple isoforms of PAX5 are expressed in both lymphomas and normal B-cells. *Br J Haematol* 147, 328-338.
- Bain, G., Robanus Maandag, E.C., te Riele, H.P., Feeney, A.J., Sheehy, A., Schlissel, M., Shinton, S.A., Hardy, R.R., and Murre, C. (1997). Both E12 and E47 allow commitment to the B cell lineage. *Immunity* 6, 145-154.
- Balciunaite, G., Ceredig, R., Massa, S., and Rolink, A.G. (2005). A B220+ CD117+ CD19- hematopoietic progenitor with potent lymphoid and myeloid developmental potential. *Eur J Immunol* 35, 2019-2030.

- Balczarek, K.A., Lai, Z.C., and Kumar, S. (1997). Evolution of functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains. *Mol Biol Evol* 14, 829-842.
- 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., and Berger, S.L. (2003). A novel human Ada2 homologue functions with Gcn5 or Brg1 to coactivate transcription. *Mol Cell Biol* 23, 6944-6957.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- 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.
- Bauer, S.R., Huebner, K., Budarf, M., Finan, J., Erikson, J., Emanuel, B.S., Nowell, P.C., Croce, C.M., and Melchers, F. (1988). The human Vpre B gene is located on chromosome 22 near a cluster of V lambda gene segments. *Immunogenetics* 28, 328-333.
- Baumann Kubetzko, F.B., Di Paolo, C., Maag, C., Meier, R., Schafer, B.W., Betts, D.R., Stahel, R.A., and Himmelmann, A. (2004). The PAX5 oncogene is expressed in N-type neuroblastoma cells and increases tumorigenicity of a S-type cell line. *Carcinogenesis* 25, 1839-1846.
- Bell, J.J., and Bhandoola, A. (2008). The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* 452, 764-767.
- 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.
- Bernier, G., Vukovich, W., Neidhardt, L., Herrmann, B.G., and Gruss, P. (2001). Isolation and characterization of a downstream target of Pax6 in the mammalian retinal primordium. *Development* 128, 3987-3994.
- Blanco, L., and Salas, M. (1984). Characterization and purification of a phage phi 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5325-5329.
- Borghesi, L., Aites, J., Nelson, S., Lefterov, P., James, P., and Gerstein, R. (2005). E47 is required for V(D)J recombinase activity in common lymphoid progenitors. *J Exp Med* 202, 1669-1677.
- Bouchard, M., Grote, D., Craven, S.E., Sun, Q., Steinlein, P., and Busslinger, M. (2005). Identification of Pax2-regulated genes by expression profiling of the mid-hindbrain organizer region. *Development* 132, 2633-2643.
- 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.
- Bousquet, M., Quelen, C., Rosati, R., Mansat-De Mas, V., La Starza, R., Bastard, C., Lippert, E., Talmant, P., Lafage-Pochitaloff, M., Leroux, D., *et al.* (2008). Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2;11)(p21;q23) translocation. *J Exp Med* 205, 2499-2506.
- Brown, G., Hughes, P., Michell, R.H., and Ceredig, R. (2010). The versatility of haematopoietic stem cells: implications for leukaemia. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 47, 171-180.
- Brun, T., Franklin, I., St-Onge, L., Biason-Lauber, A., Schoenle, E.J., Wollheim, C.B., and Gauthier, B.R. (2004). The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes {beta}-cell proliferation and survival in rat and human islets. *J Cell Biol* 167, 1123-1135.
- 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). Dereglulation 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.

- Cai, Q., Dmitrieva, N.I., Ferraris, J.D., Brooks, H.L., van Balkom, B.W., and Burg, M. (2005). Pax2 expression occurs in renal medullary epithelial cells in vivo and in cell culture, is osmoregulated, and promotes osmotic tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 503-508.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C.M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 2999-3004.
- Callen, E., Jankovic, M., Difilippantonio, S., Daniel, J.A., Chen, H.T., Celeste, A., Pellegrini, M., McBride, K., Wangsa, D., Bredemeyer, A.L., *et al.* (2007). ATM prevents the persistence and propagation of chromosome breaks in lymphocytes. *Cell* *130*, 63-75.
- Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., *et al.* (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* *425*, 841-846.
- 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.
- Ceredig, R., Rauch, M., Balciunaite, G., and Rolink, A.G. (2006). Increasing Flt3L availability alters composition of a novel bone marrow lymphoid progenitor compartment. *Blood* *108*, 1216-1222.
- Chabot, B., Stephenson, D.A., Chapman, V.M., Besmer, P., and Bernstein, A. (1988). The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* *335*, 88-89.
- Chalepakis, G., Stoykova, A., Wijnholds, J., Tremblay, P., and Gruss, P. (1993). Pax: gene regulators in the developing nervous system. *J Neurobiol* *24*, 1367-1384.
- Chevrier, S., Genton, C., Kallies, A., Karnowski, A., Otten, L.A., Malissen, B., Malissen, M., Botto, M., Corcoran, L.M., Nutt, S.L., and Acha-Orbea, H. (2009). CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 3895-3900.
- Chiang, M.Y., and Monroe, J.G. (1999). BSAP/Pax5A expression blocks survival and expansion of early myeloid cells implicating its involvement in maintaining commitment to the B-lymphocyte lineage. *Blood* *94*, 3621-3632.
- Chiang, M.Y., and Monroe, J.G. (2001). Role for transcription Pax5A factor in maintaining commitment to the B cell lineage by selective inhibition of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression. *J Immunol* *166*, 6091-6098.
- 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.
- Coffman, R.L., and Weissman, I.L. (1981). B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature* *289*, 681-683.
- Cohen, R.N., Brzostek, S., Kim, B., Chorev, M., Wondisford, F.E., and Hollenberg, A.N. (2001). The specificity of interactions between nuclear hormone receptors and corepressors is mediated by distinct amino acid sequences within the interacting domains. *Mol Endocrinol* *15*, 1049-1061.
- Conley, M.E., and Burrows, P.D. (2010). Plugging the leaky pre-B cell receptor. *J Immunol* *184*, 1127-1129.
- 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.

Cremer, T., and Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2, 292-301.

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.

Dahl, R., Walsh, J.C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S.R., Singh, H., and Simon, M.C. (2003). Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* 4, 1029-1036.

Dakic, A., Metcalf, D., Di Rago, L., Mifsud, S., Wu, L., and Nutt, S.L. (2005). PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *J Exp Med* 201, 1487-1502.

Dakic, A., Wu, L., and Nutt, S.L. (2007). Is PU.1 a dosage-sensitive regulator of haemopoietic lineage commitment and leukaemogenesis? *Trends Immunol* 28, 108-114.

Damante, G., Tell, G., and Di Lauro, R. (2001). A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66, 307-356.

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.

DeKoter, R.P., and Singh, H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439-1441.

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.

Den Boer, M.L., van Slegtenhorst, M., De Menezes, R.X., Cheok, M.H., Buijs-Gladdines, J.G., Peters, S.T., Van Zutven, L.J., Beverloo, H.B., Van der Spek, P.J., Escherich, G., *et al.* (2009). A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 10, 125-134.

Deschler, B., and Lubbert, M. (2006). Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* 107, 2099-2107.

Dias, S., Mansson, R., Gurbuxani, S., Sigvardsson, M., and Kee, B.L. (2008). E2A proteins promote development of lymphoid-primed multipotent progenitors. *Immunity* 29, 217-227.

Dias, S., Silva, H., Jr., Cumano, A., and Vieira, P. (2005). Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J Exp Med* 201, 971-979.

Difilippantonio, M.J., Petersen, S., Chen, H.T., Johnson, R., Jasin, M., Kanaar, R., Ried, T., and Nussenzweig, A. (2002). Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification. *J Exp Med* 196, 469-480.

Difilippantonio, M.J., Zhu, J., Chen, H.T., Meffre, E., Nussenzweig, M.C., Max, E.E., Ried, T., and Nussenzweig, A. (2000). DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature* 404, 510-514.

Dimitrova, N., Chen, Y.C., Spector, D.L., and de Lange, T. (2008). 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* 456, 524-528.

Ding, V., and Chandirakumaran, R. (2005). Les réactions immunitaires et le temps.

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.

Espeli, M., Mancini, S.J., Breton, C., Poirier, F., and Schiff, C. (2009). Impaired B-cell development at the pre-BII-cell stage in galectin-1-deficient mice due to inefficient pre-BII/stromal cell interactions. *Blood* 113, 5878-5886.

Fairfax, K.A., Kallies, A., Nutt, S.L., and Tarlinton, D.M. (2008). Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Semin Immunol* 20, 49-58.

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.

Fazi, F., and Nervi, C. (2008). MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. *Cardiovasc Res* 79, 553-561.

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.

Fedtsova, N., Quina, L.A., Wang, S., and Turner, E.E. (2008). Regulation of the development of tectal neurons and their projections by transcription factors Brn3a and Pax7. *Dev Biol* 316, 6-20.

Feldman, A.L., Law, M.E., Inwards, D.J., Dogan, A., McClure, R.F., and Macon, W.R. (2010). PAX5-positive T-cell anaplastic large cell lymphomas associated with extra copies of the PAX5 gene locus. *Mod Pathol* 23, 593-602.

Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli, V., Morsilli, O., Santoro, S., *et al.* (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18081-18086.

Ferguson, D.O., Sekiguchi, J.M., Chang, S., Frank, K.M., Gao, Y., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2000). The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6630-6633.

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., Wasyluk, 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.

Flemming, A., Brummer, T., Reth, M., and Jumaa, H. (2003). The adaptor protein SLP-65 acts as a tumor suppressor that limits pre-B cell expansion. *Nat Immunol* 4, 38-43.

- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P.P., Will, H., Schneider, C., and Del Sal, G. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J* *19*, 6185-6195.
- Fontana, L., Pelosi, E., Greco, P., Racanicchi, S., Testa, U., Liuzzi, F., Croce, C.M., Brunetti, E., Grignani, F., and Peschle, C. (2007). MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol* *9*, 775-787.
- 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.
- Forsberg, E.C., Serwold, T., Kogan, S., Weissman, I.L., and Passegue, E. (2006). New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt3+ multipotent hematopoietic progenitors. *Cell* *126*, 415-426.
- Fuentes-Panana, E.M., Bannish, G., and Monroe, J.G. (2004). Basal B-cell receptor signaling in B lymphocytes: mechanisms of regulation and role in positive selection, differentiation, and peripheral survival. *Immunol Rev* *197*, 26-40.
- Fugmann, S.D., Lee, A.I., Shockett, P.E., Villy, I.J., and Schatz, D.G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol* *18*, 495-527.
- Fuxa, M., and Busslinger, M. (2007a). Reporter gene insertions reveal a strictly B lymphoid-specific expression pattern of Pax5 in support of its B cell identity function. *J Immunol* *178*, 3031-3037.
- Fuxa, M., and Busslinger, M. (2007b). Reporter gene insertions reveal a strictly B lymphoid-specific expression pattern of Pax5 in support of its B cell identity function. *J Immunol* *178*, 8222-8228.
- 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.
- Galler, G.R., Mundt, C., Parker, M., Pelanda, R., Martensson, I.L., and Winkler, T.H. (2004). Surface mu heavy chain signals down-regulation of the V(D)J-recombinase machinery in the absence of surrogate light chain components. *J Exp Med* *199*, 1523-1532.
- Garvie, C.W., Hagman, J., and Wolberger, C. (2001). Structural studies of Ets-1/Pax5 complex formation on DNA. *Mol Cell* *8*, 1267-1276.
- Gerber, J.K., Richter, T., Kremmer, E., Adamski, J., Hofler, H., Balling, R., and Peters, H. (2002). Progressive loss of PAX9 expression correlates with increasing malignancy of dysplastic and cancerous epithelium of the human oesophagus. *J Pathol* *197*, 293-297.
- 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.
- Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., Raphael, K., and et al. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* *334*, 676-682.
- Gounari, F., Aifantis, I., Martin, C., Fehling, H.J., Hoeflinger, S., Leder, P., von Boehmer, H., and Reizis, B. (2002). Tracing lymphopoiesis with the aid of a pTalpha-controlled reporter gene. *Nat Immunol* *3*, 489-496.
- Greaves, M.F. (1997). Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* *349*, 344-349.
- Haber, J.E. (2008). Alternative endings. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 405-406.

- Hamasaki, A., Yamada, Y., Kurose, T., Ban, N., Nagashima, K., Takahashi, A., Fujimoto, S., Shimono, D., Fujiwara, M., Toyokuni, S., *et al.* (2007). Adult pancreatic islets require differential pax6 gene dosage. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 40-46.
- Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* 173, 1213-1225.
- Hardy, R.R., Kincade, P.W., and Dorshkind, K. (2007). The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* 26, 703-714.
- Harrison, C.J., Moorman, A.V., Broadfield, Z.J., Cheung, K.L., Harris, R.L., Reza Jalali, G., Robinson, H.M., Barber, K.E., Richards, S.M., Mitchell, C.D., *et al.* (2004). Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 125, 552-559.
- Hartley, S.B., Cooke, M.P., Fulcher, D.A., Harris, A.W., Cory, S., Basten, A., and Goodnow, C.C. (1993). Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 72, 325-335.
- Heissig, B., Ohki, Y., Sato, Y., Rafii, S., Werb, Z., and Hattori, K. (2005). A role for niches in hematopoietic cell development. *Hematology* 10, 247-253.
- 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.
- Hibbs, M.L., Quilici, C., Kountouri, N., Seymour, J.F., Armes, J.E., Burgess, A.W., and Dunn, A.R. (2007). Mice lacking three myeloid colony-stimulating factors (G-CSF, GM-CSF, and M-CSF) still produce macrophages and granulocytes and mount an inflammatory response in a sterile model of peritonitis. *J Immunol* 178, 6435-6443.
- Hieter, P.A., Max, E.E., Seidman, J.G., Maizel, J.V., Jr., and Leder, P. (1980). Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments. *Cell* 22, 197-207.
- 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.
- Hock, H., Meade, E., Medeiros, S., Schindler, J.W., Valk, P.J., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2004). Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* 18, 2336-2341.
- Hollis, G.F., Evans, R.J., Stafford-Hollis, J.M., Korsmeyer, S.J., and McKearn, J.P. (1989). Immunoglobulin lambda light-chain-related genes 14.1 and 16.1 are expressed in pre-B cells and may encode the human immunoglobulin omega light-chain protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5552-5556.
- 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.
- Hong, D., Gupta, R., Ancliff, P., Atzberger, A., Brown, J., Soneji, S., Green, J., Colman, S., Piacibello, W., Buckle, V., *et al.* (2008). Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* 319, 336-339.
- 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.
- Hui, K.S., Wang, Y.J., and Lajtha, A. (1983). Purification and characterization of an enkephalin aminopeptidase from rat brain membranes. *Biochemistry* 22, 1062-1067.

- Huret, J.L., Leonard, C., and Savage, J.R.K. (2000). Chromosomes, Chromosome Anomalies In Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.
- Ichikawa, M., Asai, T., Chiba, S., Kurokawa, M., and Ogawa, S. (2004). Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. *Cell Cycle* 3, 722-724.
- Igarashi, H., Gregory, S.C., Yokota, T., Sakaguchi, N., and Kincade, P.W. (2002). Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity* 17, 117-130.
- Iida, S., Rao, P.H., Nallasivam, P., Hibshoosh, H., Butler, M., Louie, D.C., Dyomin, V., Ohno, H., Chaganti, R.S., and Dalla-Favera, R. (1996). The t(9;14)(p13;q32) chromosomal translocation associated with lymphoplasmacytoid lymphoma involves the PAX-5 gene. *Blood* 88, 4110-4117.
- Inlay, M.A., Bhattacharya, D., Sahoo, D., Serwold, T., Seita, J., Karsunky, H., Plevritis, S.K., Dill, D.L., and Weissman, I.L. (2009). Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development. *Genes Dev* 23, 2376-2381.
- Iwasaki, H., Somoza, C., Shigematsu, H., Duprez, E.A., Iwasaki-Arai, J., Mizuno, S., Arinobu, Y., Geary, K., Zhang, P., Dayaram, T., *et al.* (2005). Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood* 106, 1590-1600.
- Jankovic, M., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2007). Antigen receptor diversification and chromosome translocations. *Nat Immunol* 8, 801-808.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., and Thun, M.J. (2006). Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 56, 106-130.
- Johnson, K., Hashimshony, T., Sawai, C.M., Pongubala, J.M., Skok, J.A., Aifantis, I., and Singh, H. (2008). Regulation of immunoglobulin light-chain recombination by the transcription factor IRF-4 and the attenuation of interleukin-7 signaling. *Immunity* 28, 335-345.
- 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.
- Johnston, C.M., Wood, A.L., Bolland, D.J., and Corcoran, A.E. (2006). Complete sequence assembly and characterization of the C57BL/6 mouse Ig heavy chain V region. *J Immunol* 176, 4221-4234.
- Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B.S., Lew, A.M., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Nutt, S.L. (2007). Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* 26, 555-566.
- Kanteti, R., Nallasura, V., Loganathan, S., Tretiakova, M., Kroll, T., Krishnaswamy, S., Faoro, L., Cagle, P., Husain, A.N., Vokes, E.E., *et al.* (2009). PAX5 is expressed in small-cell lung cancer and positively regulates c-Met transcription. *Lab Invest* 89, 301-314.
- Karanjawala, Z.E., Grawunder, U., Hsieh, C.L., and Lieber, M.R. (1999). The nonhomologous DNA end joining pathway is important for chromosome stability in primary fibroblasts. *Curr Biol* 9, 1501-1504.
- Karsunky, H., Inlay, M.A., Serwold, T., Bhattacharya, D., and Weissman, I.L. (2008). Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood* 111, 5562-5570.
- Kawakami, A., Kimura-Kawakami, M., Nomura, T., and Fujisawa, H. (1997). Distributions of PAX6 and PAX7 proteins suggest their involvement in both early and late phases of chick brain development. *Mech Dev* 66, 119-130.
- Kawamata, N., Ogawa, S., Zimmermann, M., Niebuhr, B., Stocking, C., Sanada, M., Hemminki, K., Yamamoto, G., Nannya, Y., Koehler, R., *et al.* (2008). Cloning of genes involved in chromosomal translocations by high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11921-11926.

- Kawano, Y., Yoshikawa, S., Minegishi, Y., and Karasuyama, H. (2006). Pre-B cell receptor assesses the quality of IgH chains and tunes the pre-B cell repertoire by delivering differential signals. *J Immunol* *177*, 2242-2249.
- Keenan, R.A., De Riva, A., Corleis, B., Hepburn, L., Licence, S., Winkler, T.H., and Martensson, I.L. (2008). Censoring of autoreactive B cell development by the pre-B cell receptor. *Science* *321*, 696-699.
- Kikuchi, K., Kasai, H., Watanabe, A., Lai, A.Y., and Kondo, M. (2008). IL-7 specifies B cell fate at the common lymphoid progenitor to pre-proB transition stage by maintaining early B cell factor expression. *J Immunol* *181*, 383-392.
- Kikuchi, K., Lai, A.Y., Hsu, C.L., and Kondo, M. (2005). IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J Exp Med* *201*, 1197-1203.
- Kirstetter, P., Thomas, M., Dierich, A., Kastner, P., and Chan, S. (2002). Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur J Immunol* *32*, 720-730.
- Kitamura, D., Kudo, A., Schaal, S., Muller, W., Melchers, F., and Rajewsky, K. (1992). A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell* *69*, 823-831.
- Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R., and Rajewsky, K. (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* *350*, 423-426.
- Knodel, M., Kuss, A.W., Berberich, I., and Schimpl, A. (2001). Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. *Eur J Immunol* *31*, 1972-1980.
- Kodama, H., Nose, M., Niida, S., and Nishikawa, S. (1994). Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. *Exp Hematol* *22*, 979-984.
- 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.
- Kruhlak, M.J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Muller, W.G., McNally, J.G., Bazett-Jones, D.P., and Nussenzweig, A. (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* *172*, 823-834.
- Kudo, A., and Melchers, F. (1987). A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. *EMBO J* *6*, 2267-2272.
- Kuppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* *5*, 251-262.
- Kurahashi, S., Hayakawa, F., Miyata, Y., Yasuda, T., Minami, Y., Tsuzuki, S., Abe, A., and Naoe, T. (2011). PAX5-PML acts as a dual dominant-negative form of both PAX5 and PML. *Oncogene*.
- Kwon, K., Hutter, C., Sun, Q., Bilic, I., Cobaleda, C., Malin, S., and Busslinger, M. (2008). Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development. *Immunity* *28*, 751-762.
- Lai, A.Y., and Kondo, M. (2006). Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med* *203*, 1867-1873.
- Laiosa, C.V., Stadtfeld, M., and Graf, T. (2006). Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* *24*, 705-738.
- 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.

- Laslo, P., Spooner, C.J., Warmflash, A., Lancki, D.W., Lee, H.J., Sciammas, R., Gantner, B.N., Dinner, A.R., and Singh, H. (2006). Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* 126, 755-766.
- Lazorchak, A.S., Wojciechowski, J., Dai, M., and Zhuang, Y. (2006). E2A promotes the survival of precursor and mature B lymphocytes. *J Immunol* 177, 2495-2504.
- Lean, J.M., Jagger, C.J., Kirstein, B., Fuller, K., and Chambers, T.J. (2005). Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology* 146, 728-735.
- Letting, D.L., Rakowski, C., Weiss, M.J., and Blobel, G.A. (2003). Formation of a tissue-specific histone acetylation pattern by the hematopoietic transcription factor GATA-1. *Mol Cell Biol* 23, 1334-1340.
- Li, L., Leid, M., and Rothenberg, E.V. (2010). An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b. *Science* 329, 89-93.
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., *et al.* (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326, 289-293.
- Lin, H., and Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* 376, 263-267.
- 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.
- Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H., and Schatz, D.G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841-845.
- Liu, P., Keller, J.R., Ortiz, M., Tessarollo, L., Rachel, R.A., Nakamura, T., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2003). Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat Immunol* 4, 525-532.
- Liu, W., Li, X., Chu, E.S., Go, M.Y., Xu, L., Zhao, G., Li, L., Dai, N., Si, J., Tao, Q., *et al.* (2010). Paired box gene 5 is a novel tumor suppressor in hepatocellular carcinoma through interaction with p53 signaling pathway. *Hepatology*.
- 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.
- Maia, A.T., van der Velden, V.H., Harrison, C.J., Szczepanski, T., Williams, M.D., Griffiths, M.J., van Dongen, J.J., and Greaves, M.F. (2003). Prenatal origin of hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia in identical twins. *Leukemia* 17, 2202-2206.
- Mansson, R., Zandi, S., Anderson, K., Martensson, I.L., Jacobsen, S.E., Bryder, D., and Sigvardsson, M. (2008). B-lineage commitment prior to surface expression of B220 and CD19 on hematopoietic progenitor cells. *Blood* 112, 1048-1055.
- Martensson, I.L., Almqvist, N., Grimsholm, O., and Bernardi, A.I. (2010). The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Lett* 584, 2572-2579.
- Martensson, I.L., Keenan, R.A., and Licence, S. (2007). The pre-B-cell receptor. *Curr Opin Immunol* 19, 137-142.
- Martinez-Agosto, J.A., Mikkola, H.K., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2007). The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev* 21, 3044-3060.
- Maulik, G., Kijima, T., Ma, P.C., Ghosh, S.K., Lin, J., Shapiro, G.I., Schaefer, E., Tibaldi, E., Johnson, B.E., and Salgia, R. (2002). Modulation of the c-Met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 8, 620-627.

- McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J., and Maki, R.A. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* 15, 5647-5658.
- Medina, K.L., Garrett, K.P., Thompson, L.F., Rossi, M.I., Payne, K.J., and Kincade, P.W. (2001). Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. *Nat Immunol* 2, 718-724.
- 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.
- Mikkola, I., Heavey, B., Horcher, M., and Busslinger, M. (2002). Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science* 297, 110-113.
- Minegishi, Y., and Conley, M.E. (2001). Negative selection at the pre-BCR checkpoint elicited by human mu heavy chains with unusual CDR3 regions. *Immunity* 14, 631-641.
- Miyamoto, T., Iwasaki, H., Reizis, B., Ye, M., Graf, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2002). Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev Cell* 3, 137-147.
- Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2002). Identification of B/macrophage progenitors in adult bone marrow. *Semin Immunol* 14, 371-376.
- Morgenstern, D.A., Hasan, F., Gibson, S., Winyard, P., Sebire, N.J., and Anderson, J. (2010). PAX5 expression in nonhematopoietic tissues. Reappraisal of previous studies. *Am J Clin Pathol* 133, 407-415.
- Mori, H., Colman, S.M., Xiao, Z., Ford, A.M., Healy, L.E., Donaldson, C., Hows, J.M., Navarrete, C., and Greaves, M. (2002). Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8242-8247.
- Morrison, S.J., and Spradling, A.C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132, 598-611.
- 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.
- Mullighan, C.G. (2009). Genomic analysis of acute leukemia. *Int J Lab Hematol* 31, 384-397.
- 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., Miller, C.B., Radtke, I., Phillips, L.A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T.P., Le Beau, M.M., Pui, C.H., *et al.* (2008). BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 453, 110-114.
- Mullighan, C.G., Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Phillips, L.A., Miller, C.B., Ma, J., Liu, W., Cheng, C., Schulman, B.A., *et al.* (2009a). Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 360, 470-480.
- Mullighan, C.G., Zhang, J., Harvey, R.C., Collins-Underwood, J.R., Schulman, B.A., Phillips, L.A., Tasian, S.K., Loh, M.L., Su, X., Liu, W., *et al.* (2009b). JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9414-9418.
- Mundt, C., Licence, S., Shimizu, T., Melchers, F., and Martensson, I.L. (2001). Loss of precursor B cell expansion but not allelic exclusion in VpreB1/VpreB2 double-deficient mice. *J Exp Med* 193, 435-445.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-563.

- Muschen, M., Re, D., Jungnickel, B., Diehl, V., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (2000). Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *J Exp Med* *192*, 1833-1840.
- Nachman, J.B., Heerema, N.A., Sather, H., Camitta, B., Forestier, E., Harrison, C.J., Dastugue, N., Schrappe, M., Pui, C.H., Basso, G., *et al.* (2007). Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *110*, 1112-1115.
- Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* *6*, 107-116.
- Nakamura, T., Yamazaki, Y., Saiki, Y., Moriyama, M., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2000). Evi9 encodes a novel zinc finger protein that physically interacts with BCL6, a known human B-cell proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* *20*, 3178-3186.
- 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.
- Nerlov, C., Querfurth, E., Kulesa, H., and Graf, T. (2000). GATA-1 interacts with the myeloid PU.1 transcription factor and represses PU.1-dependent transcription. *Blood* *95*, 2543-2551.
- Nielsen, P.J., Lorenz, B., Muller, A.M., Wenger, R.H., Brombacher, F., Simon, M., von der Weid, T., Langhorne, W.J., Mossmann, H., and Kohler, G. (1997). Altered erythrocytes and a leaky block in B-cell development in CD24/HSA-deficient mice. *Blood* *89*, 1058-1067.
- Nowell, P.C., and Hungerford, D.A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* *25*, 85-109.
- 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., Metcalf, D., D'Amico, A., Polli, M., and Wu, L. (2005). Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med* *201*, 221-231.
- 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'Neill, D.W., Schoetz, S.S., Lopez, R.A., Castle, M., Rabinowitz, L., Shor, E., Krawchuk, D., Goll, M.G., Renz, M., Seelig, H.P., *et al.* (2000). An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol Cell Biol* *20*, 7572-7582.
- O'Riordan, M., and Grosschedl, R. (1999). Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* *11*, 21-31.
- Oefelein, M., Grapey, D., Schaeffer, T., Chin-Chance, C., and Bushman, W. (1996). Pax-2: a developmental gene constitutively expressed in the mouse epididymis and ductus deferens. *J Urol* *156*, 1204-1207.

- 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.
- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S.W., Grosveld, G., and Downing, J.R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* *84*, 321-330.
- Ortiz de Mendibil, I., Vizmanos, J.L., and Novo, F.J. (2009). Signatures of selection in fusion transcripts resulting from chromosomal translocations in human cancer. *PLoS One* *4*, e4805.
- Osborne, C.S., Chakalova, L., Mitchell, J.A., Horton, A., Wood, A.L., Bolland, D.J., Corcoran, A.E., and Fraser, P. (2007). Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol* *5*, e192.
- Panzer-Grumayer, E.R., Fasching, K., Panzer, S., Hettinger, K., Schmitt, K., Stockler-Ipsiroglu, S., and Haas, O.A. (2002). Nondisjunction of chromosomes leading to hyperdiploid childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is an early event during leukemogenesis. *Blood* *100*, 347-349.
- Park, H., Seo, Y., Kim, J.I., Kim, W.J., and Choe, S.Y. (2006). Identification of the nuclear localization motif in the ETV6 (TEL) protein. *Cancer Genet Cytogenet* *167*, 117-121.
- Parker, M.J., Licence, S., Erlandsson, L., Galler, G.R., Chakalova, L., Osborne, C.S., Morgan, G., Fraser, P., Jumaa, H., Winkler, T.H., *et al.* (2005). The pre-B-cell receptor induces silencing of VpreB and lambda5 transcription. *EMBO J* *24*, 3895-3905.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S., Klein, U., Kuppers, R., Rajewsky, K., and Dalla-Favera, R. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 11816-11821.
- 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.
- Paulsson, K., Forestier, E., Lilljebjorn, H., Heldrup, J., Behrendtz, M., Young, B.D., and Johansson, B. (2010). Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Paulsson, K., and Johansson, B. (2009). High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* *48*, 637-660.
- Pearl, E.R., Vogler, L.B., Okos, A.J., Crist, W.M., Lawton, A.R., 3rd, and Cooper, M.D. (1978). B lymphocyte precursors in human bone marrow: an analysis of normal individuals and patients with antibody-deficiency states. *J Immunol* *120*, 1169-1175.
- Pelanda, R., Braun, U., Hobeika, E., Nussenzweig, M.C., and Reth, M. (2002). B cell progenitors are arrested in maturation but have intact VDJ recombination in the absence of Ig-alpha and Ig-beta. *J Immunol* *169*, 865-872.
- Peters, H., Schuster, G., Neubuser, A., Richter, T., Hofler, H., and Balling, R. (1997). Isolation of the Pax9 cDNA from adult human esophagus. *Mamm Genome* *8*, 62-64.
- Polidoros, A.N., Pasentsis, K., and Tsaftaris, A.S. (2006). Rolling circle amplification-RACE: a method for simultaneous isolation of 5' and 3' cDNA ends from amplified cDNA templates. *Biotechniques* *41*, 35-36, 38, 40 *passim*.
- Polli, M., Dakic, A., Light, A., Wu, L., Tarlinton, D.M., and Nutt, S.L. (2005). The development of functional B lymphocytes in conditional PU.1 knock-out mice. *Blood* *106*, 2083-2090.
- Pongubala, J.M., Northrup, D.L., Lancki, D.W., Medina, K.L., Treiber, T., Bertolino, E., Thomas, M., Grosschedl, R., Allman, D., and Singh, H. (2008). Transcription factor EBF restricts alternative lineage options and promotes B cell fate commitment independently of Pax5. *Nat Immunol* *9*, 203-215.

- Pridans, C., Holmes, M.L., Polli, M., Wettenhall, J.M., Dakic, A., Corcoran, L.M., Smyth, G.K., and Nutt, S.L. (2008). Identification of Pax5 target genes in early B cell differentiation. *J Immunol* 180, 1719-1728.
- Proulx, M., Cayer, M.P., Drouin, M., Laroche, A., and Jung, D. (2010). Overexpression of PAX5 induces apoptosis in multiple myeloma cells. *Int J Hematol* 92, 451-462.
- Pui, C.H., Relling, M.V., and Downing, J.R. (2004). Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 350, 1535-1548.
- Qiu, G., and Stavnezer, J. (1998). Overexpression of BSAP/Pax-5 inhibits switching to IgA and enhances switching to IgE in the I.29 mu B cell line. *J Immunol* 161, 2906-2918.
- Rabbitts, T.H. (1991). Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell* 67, 641-644.
- Rafii, S., Mohle, R., Shapiro, F., Frey, B.M., and Moore, M.A. (1997). Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. *Leuk Lymphoma* 27, 375-386.
- Raghavan, S.C., Swanson, P.C., Wu, X., Hsieh, C.L., and Lieber, M.R. (2004). A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. *Nature* 428, 88-93.
- Raimondi, S.C., Shurtleff, S.A., Downing, J.R., Rubnitz, J., Mathew, S., Hancock, M., Pui, C.H., Rivera, G.K., Grosveld, G.C., and Behm, F.G. (1997). 12p abnormalities and the TEL gene (ETV6) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 90, 4559-4566.
- 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.
- Reth, M. (1992). Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 10, 97-121.
- Reya, T., O'Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R., and Grosschedl, R. (2000). Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 13, 15-24.
- Reynaud, D., Demarco, I.A., Reddy, K.L., Schjerven, H., Bertolino, E., Chen, Z., Smale, S.T., Winandy, S., and Singh, H. (2008). Regulation of B cell fate commitment and immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Ikaros. *Nat Immunol* 9, 927-936.
- Rice, K.L., Hormaeche, I., and Licht, J.D. (2007). Epigenetic regulation of normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* 26, 6697-6714.
- Rinkenberger, J.L., Wallin, J.J., Johnson, K.W., and Koshland, M.E. (1996). An interleukin-2 signal relieves BSAP (Pax5)-mediated repression of the immunoglobulin J chain gene. *Immunity* 5, 377-386.
- Ritz-Laser, B., Estreicher, A., Gauthier, B., and Philippe, J. (2000). The paired homeodomain transcription factor Pax-2 is expressed in the endocrine pancreas and transactivates the glucagon gene promoter. *J Biol Chem* 275, 32708-32715.
- Robbani, D.F., Bunting, S., Feldhahn, N., Bothmer, A., Camps, J., Deroubaix, S., McBride, K.M., Klein, I.A., Stone, G., Eisenreich, T.R., *et al.* (2009). AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. *Mol Cell* 36, 631-641.
- Robichaud, G.A., Nardini, M., Laflamme, M., Cuperlovic-Culf, M., and Ouellette, R.J. (2004). Human Pax-5 C-terminal isoforms possess distinct transactivation properties and are differentially modulated in normal and malignant B cells. *J Biol Chem* 279, 49956-49963.
- Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Kolodziej, K.E., Guyot, B., Heck, A.J., Vyas, P., de Boer, E., Grosveld, F., and Strouboulis, J. (2005). GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J* 24, 2354-2366.

- 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.
- Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T.H., Karasuyama, H., and Melchers, F. (1994). IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int Immunol* 6, 1257-1264.
- Rolink, A.G. (2004). B-cell development and pre-B-1 cell plasticity in vitro. *Methods Mol Biol* 271, 271-281.
- Rolink, A.G., Andersson, J., and Melchers, F. (2004). Molecular mechanisms guiding late stages of B-cell development. *Immunol Rev* 197, 41-50.
- 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.
- Rosenbloom, J., Abrams, W.R., Indik, Z., Yeh, H., Ornstein-Goldstein, N., and Bashir, M.M. (1995). Structure of the elastin gene. *Ciba Found Symp* 192, 59-74; discussion 74-80.
- Rumfelt, L.L., Zhou, Y., Rowley, B.M., Shinton, S.A., and Hardy, R.R. (2006). Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *J Exp Med* 203, 675-687.
- Sakaguchi, N., and Melchers, F. (1986). Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature* 324, 579-582.
- Santoro, A., Bica, M.G., Dagnino, L., Agueli, C., Salemi, D., Cannella, S., Veltroni, M., Cetica, V., Giarin, E., Fabbiano, F., *et al.* (2009). Altered mRNA expression of PAX5 is a common event in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 146, 686-689.
- Schaniel, C., Bruno, L., Melchers, F., and Rolink, A.G. (2002a). Multiple hematopoietic cell lineages develop in vivo from transplanted Pax5-deficient pre-B I-cell clones. *Blood* 99, 472-478.
- Schaniel, C., Gottar, M., Roosnek, E., Melchers, F., and Rolink, A.G. (2002b). Extensive in vivo self-renewal, long-term reconstitution capacity, and hematopoietic multipotency of Pax5-deficient precursor B-cell clones. *Blood* 99, 2760-2766.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035-1048.
- 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.
- Schilham, M.W., Oosterwegel, M.A., Moerer, P., Ya, J., de Boer, P.A., van de Wetering, M., Verbeek, S., Lamers, W.H., Kruisbeek, A.M., Cumano, A., and Clevers, H. (1996). Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* 380, 711-714.
- Sciammas, R., Shaffer, A.L., Schatz, J.H., Zhao, H., Staudt, L.M., and Singh, H. (2006). Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* 25, 225-236.
- Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573-1577.
- Seale, P., Asakura, A., and Rudnicki, M.A. (2001). The potential of muscle stem cells. *Dev Cell* 1, 333-342.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M.A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102, 777-786.

- 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., Giltane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., and Staudt, L.M. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51-62.
- 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.
- Shen, H.M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X., and Storb, U. (1998). Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 280, 1750-1752.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3, 155-168.
- Shimizu, T., Mundt, C., Licence, S., Melchers, F., and Martensson, I.L. (2002). VpreB1/VpreB2/lambda 5 triple-deficient mice show impaired B cell development but functional allelic exclusion of the IgH locus. *J Immunol* 168, 6286-6293.
- Shin, D.H., Kwon, B.S., Chang, Y.P., Bae, S.R., Kim, J., and Kim, J.W. (2003). Ultramicroscopical immunolocalization of PAX6 in the adult chicken retina. *Acta Histochem* 105, 267-272.
- Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.P., and Canaani, E. (1985). Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* 315, 550-554.
- Singh, H. (1996). Gene targeting reveals a hierarchy of transcription factors regulating specification of lymphoid cell fates. *Curr Opin Immunol* 8, 160-165.
- Singh, H., Medina, K.L., and Pongubala, J.M. (2005). Contingent gene regulatory networks and B cell fate specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4949-4953.
- Sitnicka, E., Brakebusch, C., Martensson, I.L., Svensson, M., Agace, W.W., Sigvardsson, M., Buza-Vidas, N., Bryder, D., Cilio, C.M., Ahlenius, H., *et al.* (2003). Complementary signaling through flt3 and interleukin-7 receptor alpha is indispensable for fetal and adult B cell genesis. *J Exp Med* 198, 1495-1506.
- Sitnicka, E., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Buza-Vidas, N., Adolfsson, J., and Jacobsen, S.E. (2002). Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* 17, 463-472.
- 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.
- Soutoglou, E., Dorn, J.F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., Danuser, G., and Misteli, T. (2007). Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 9, 675-682.
- Spector, L.G., and Ross, J.A. (2006). Infant leukemia: finding the needle in the haystack. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 2331.
- Spilianakis, C.G., Lalioti, M.D., Town, T., Lee, G.R., and Flavell, R.A. (2005). Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 435, 637-645.
- Staal, F.J., and Clevers, H.C. (2005). WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol* 5, 21-30.
- 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.
- Stegmaier, K., Pendse, S., Barker, G.F., Bray-Ward, P., Ward, D.C., Montgomery, K.T., Krauter, K.S., Reynolds, C., Sklar, J., Donnelly, M., and *et al.* (1995). Frequent loss of heterozygosity at the TEL gene locus in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood* 86, 38-44.

- Stopka, T., Amanatullah, D.F., Papetti, M., and Skoultchi, A.I. (2005). PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *EMBO J* 24, 3712-3723.
- Stoykova, A., and Gruss, P. (1994). Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 14, 1395-1412.
- Stranks, G., Height, S.E., Mitchell, P., Jadayel, D., Yuille, M.A., De Lord, C., Clutterbuck, R.D., Treleaven, J.G., Powles, R.L., Nacheva, E., and et al. (1995). Deletions and rearrangement of CDKN2 in lymphoid malignancy. *Blood* 85, 893-901.
- Su, I.H., Basavaraj, A., Krutchinsky, A.N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B.T., and Tarakhovsky, A. (2003a). Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol* 4, 124-131.
- Su, Y.W., Flemming, A., Wossning, T., Hobeika, E., Reth, M., and Jumaa, H. (2003b). Identification of a pre-BCR lacking surrogate light chain. *J Exp Med* 198, 1699-1706.
- Sulong, S., Moorman, A.V., Irving, J.A., Strefford, J.C., Konn, Z.J., Case, M.C., Minto, L., Barber, K.E., Parker, H., Wright, S.L., et al. (2009). A comprehensive analysis of the CDKN2A gene in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals genomic deletion, copy number neutral loss of heterozygosity, and association with specific cytogenetic subgroups. *Blood* 113, 100-107.
- 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.
- Thai, T.H., Purugganan, M.M., Roth, D.B., and Kearney, J.F. (2002). Distinct and opposite diversifying activities of terminal transferase splice variants. *Nat Immunol* 3, 457-462.
- Thevenin, C., Nutt, S.L., and Busslinger, M. (1998). Early function of Pax5 (BSAP) before the pre-B cell receptor stage of B lymphopoiesis. *J Exp Med* 188, 735-744.
- 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.
- Thomas, M.G., Barker, R.A., Beazley, L.D., and Ziman, M.R. (2007). Pax7 expression in the adult rat superior colliculus following optic nerve injury. *Neuroreport* 18, 105-109.
- Thompson, J.A., Lovicu, F.J., and Ziman, M. (2007). Pax7 and superior collicular polarity: insights from Pax6 (Sey) mutant mice. *Exp Brain Res* 178, 316-325.
- Thompson, J.A., Zembrzycki, A., Mansouri, A., and Ziman, M. (2008). Pax7 is requisite for maintenance of a subpopulation of superior collicular neurons and shows a diverging expression pattern to Pax3 during superior collicular development. *BMC Dev Biol* 8, 62.
- Thompson, P.J., Mitchell, T.N., Free, S.L., Williamson, K.A., Hanson, I.M., van Heyningen, V., Moore, A.T., and Sisodiya, S.M. (2004). Cognitive functioning in humans with mutations of the PAX6 gene. *Neurology* 62, 1216-1218.
- 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.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Tsai, A.G., Lu, H., Raghavan, S.C., Muschen, M., Hsieh, C.L., and Lieber, M.R. (2008). Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. *Cell* 135, 1130-1142.
- 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.

- Tussiwand, R., Bosco, N., Ceredig, R., and Rolink, A.G. (2009). Tolerance checkpoints in B-cell development: Johnny B good. *Eur J Immunol* 39, 2317-2324.
- Urbanek, P., Fetka, I., Meisler, M.H., and Busslinger, M. (1997). Cooperation of Pax2 and Pax5 in midbrain and cerebellum development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5703-5708.
- 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.
- Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., *et al.* (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132, 875-886.
- Vettermann, C., Herrmann, K., and Jack, H.M. (2006). Powered by pairing: the surrogate light chain amplifies immunoglobulin heavy chain signaling and pre-selects the antibody repertoire. *Semin Immunol* 18, 44-55.
- Vidal, L.J., Perry, J.K., Vouyovitch, C.M., Pandey, V., Brunet-Dunand, S.E., Mertani, H.C., Liu, D.X., and Lobie, P.E. (2010). PAX5alpha enhances the epithelial behavior of human mammary carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 8, 444-456.
- Vosshenrich, C.A., Cumano, A., Muller, W., Di Santo, J.P., and Vieira, P. (2003). Thymic stromal-derived lymphopoietin distinguishes fetal from adult B cell development. *Nat Immunol* 4, 773-779.
- Wada, H., Masuda, K., Satoh, R., Kakugawa, K., Ikawa, T., Katsura, Y., and Kawamoto, H. (2008). Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature* 452, 768-772.
- Wang, J.H., Alt, F.W., Gostissa, M., Datta, A., Murphy, M., Alimzhanov, M.B., Coakley, K.M., Rajewsky, K., Manis, J.P., and Yan, C.T. (2008). Oncogenic transformation in the absence of Xrcc4 targets peripheral B cells that have undergone editing and switching. *J Exp Med* 205, 3079-3090.
- Wang, J.H., Gostissa, M., Yan, C.T., Goff, P., Hickernell, T., Hansen, E., Difilippantonio, S., Wesemann, D.R., Zarrin, A.A., Rajewsky, K., *et al.* (2009). Mechanisms promoting translocations in editing and switching peripheral B cells. *Nature* 460, 231-236.
- Wang, Q., Kumar, S., Mitsios, N., Slevin, M., and Kumar, P. (2007). Investigation of downstream target genes of PAX3c, PAX3e and PAX3g isoforms in melanocytes by microarray analysis. *Int J Cancer* 120, 1223-1231.
- Watabe, K., Leusch, M., and Ito, J. (1984). Replication of bacteriophage phi 29 DNA in vitro: the roles of terminal protein and DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5374-5378.
- Weinstock, D.M., and Jasin, M. (2006). Alternative pathways for the repair of RAG-induced DNA breaks. *Mol Cell Biol* 26, 131-139.
- Wildhardt, G., Winterpacht, A., Hilbert, K., Menger, H., and Zabel, B. (1996). Two different PAX3 gene mutations causing Waardenburg syndrome type I. *Mol Cell Probes* 10, 229-231.
- Xue, H.H., Bollenbacher-Reilley, J., Wu, Z., Spolski, R., Jing, X., Zhang, Y.C., McCoy, J.P., and Leonard, W.J. (2007). The transcription factor GABP is a critical regulator of B lymphocyte development. *Immunity* 26, 421-431.
- Yamashita, Y., Oritani, K., Miyoshi, E.K., Wall, R., Bernfield, M., and Kincade, P.W. (1999). Syndecan-4 is expressed by B lineage lymphocytes and can transmit a signal for formation of dendritic processes. *J Immunol* 162, 5940-5948.
- Ye, M., Ermakova, O., and Graf, T. (2005). PU.1 is not strictly required for B cell development and its absence induces a B-2 to B-1 cell switch. *J Exp Med* 202, 1411-1422.
- Yoshida, T., Hazan, I., Zhang, J., Ng, S.Y., Naito, T., Snippert, H.J., Heller, E.J., Qi, X., Lawton, L.N., Williams, C.J., and Georgopoulos, K. (2008). The role of the chromatin remodeler Mi-2beta in hematopoietic stem cell self-renewal and multilineage differentiation. *Genes Dev* 22, 1174-1189.

- Yoshida, T., Ng, S.Y., and Georgopoulos, K. (2010). Awakening lineage potential by Ikaros-mediated transcriptional priming. *Curr Opin Immunol* 22, 154-160.
- 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.
- Zandi, S., Mansson, R., Tsapogas, P., Zetterblad, J., Bryder, D., and Sigvardsson, M. (2008). EBF1 is essential for B-lineage priming and establishment of a transcription factor network in common lymphoid progenitors. *J Immunol* 181, 3364-3372.
- Zha, S., Boboila, C., and Alt, F.W. (2009). Mre11: roles in DNA repair beyond homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* 16, 798-800.
- Zhang, J., and Li, L. (2008). Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem* 283, 9499-9503.
- Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-Aswapati, N., Radoska, H.S., Auron, P.E., Tenen, D.G., and Sun, Z. (1999). Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8705-8710.
- Zhang, Z., Cotta, C.V., Stephan, R.P., deGuzman, C.G., and Klug, C.A. (2003). Enforced expression of EBF in hematopoietic stem cells restricts lymphopoiesis to the B cell lineage. *EMBO J* 22, 4759-4769.
- 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.
- Zhou, H.M., Wang, J., Rogers, R., and Conway, S.J. (2008). Lineage-specific responses to reduced embryonic Pax3 expression levels. *Dev Biol* 315, 369-382.
- Zhu, C., Mills, K.D., Ferguson, D.O., Lee, C., Manis, J., Fleming, J., Gao, Y., Morton, C.C., and Alt, F.W. (2002). Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. *Cell* 109, 811-821.
- Zwollo, P., Arrieta, H., Ede, K., Molinder, K., Desiderio, S., and Pollock, R. (1997). The Pax-5 gene is alternatively spliced during B-cell development. *J Biol Chem* 272, 10160-10168.

IX. Annexes

1. Annexe#1 : Protocole RCA sur BAC

Amplification de l'ADN BAC par RCA (*Rolling-Circle amplification*) et production de sonde pour FISH:

Mix 1 :

Plasmide purifié (ou culture bact)	0,1-1 µl (~50-200ng)
5x annealing buffer	1 µl (200mM Tris-HCl pH8; 50mM MgCl2)
Exo-resistant random heptamer	1 µl (FERMENTAS)
Eau BM	qsp 5 µl

Agiter puis centri paillasse

Incuber à 94°C pendant 4 minutes puis refroidir sur glace

Pendant l'incubation préparer :

Mix 2 :

Phi29 Buffer 10x	2 µl (New England Biolabs)
dNTPs 10mM each	1 µl
Phi29 DNA polymerase	0,7 µl (New England Biolabs)
BSA	0,5 µl (New England Biolabs)
Eau BM	10,8 µl

Ajouter les 15µl du mix 2 au mix 1

Agiter puis centri paillasse

Incuber à 30°C pendant 18h puis inactiver la polymerase 10 minutes à 65°C

10-20µg d'ADN pBAC généré. Si on est parti d'une miniprep de BAC, pas la peine de purifier le produit de RCA pour le marquage.

Marquage par Nick-Translation (Kit AMERSHAM GE):

- Préparer une solution de DNaseI à 0,00233U/µl (1µl stock + 19µl NaCl 150mM puis 2,33µl de ce mix + 497,67µl NaCl 150mM)

Produit de RCA	ajust. µl (50-100ng/µl de sonde souhaitée final)
dATP	3,5-7 µl
dCTP	3,5-7 µl
dGTP	3,5-7 µl
dTTP	1-2 µl
dUTP* Rhoda ou FITC (Roche)	1-2 µl
DNase 0,00233U/µl	0,5-1 µl
Enzyme mix	5-10 µl
Eau BM	qsp. 25µl-qsp. 50µl

Incuber au BM pendant 4h à 15°C

- Ajouter 2,5-5 µl EDTA 0,8M pH=5,2 (stop réaction)
- Ajouter 35-70 µl CotDNA (de 1 à 3x la qtté d'ADN BAC)
- Ajouter 10-20 µl ssDNA (ADN de sperme de saumon dénaturé 5 minutes dans l'eau bouillante puis 5 minutes dans la glace)
- Ajouter 16-32 µl NaOAc 3M
- Ajouter 0,5-1 ml éthanol 100% froid

- Vortexer

Incuber OVN à -20°C ou 1h à -80°C

- Centrifuger à 4°C 20 minutes à 13000rpm
- Eliminer le surnageant par pipettage
- Laver le culot avec 250µl d'éthanol 70% froid
- Centrifuger à 4°C 10 minutes à 13000rpm
- Eliminer le surnageant à la pipette, retourner le tube sur papier absorbant
- Protéger le tube de la lumière
- Sécher 5 minutes sous cloche à vide puis 1h ou plus sur la paillasse
- Reprendre dans 50-100µl solution mix (50% formamide, 10% dextran, SSC2x)
Vortexer 30 secondes et centri paillasse
Controler la bonne resolubilisation du culot
Stocker à -20°C

2. Annexe#2 : Protocole détaillé RCA-RACE

Constitution de matrice d'ADNc cible concaténé et PCR inverse

I – Transcription inverse SuperScript III (Invitrogen) – 2h

ARN 100ng-5µg	
Oligo-dT anchor primer 5' Phosphate 50µM (5'-P-GACCACGCGTATCGATGTCGACT ₁₆ V(V=A,G ou C)-3')	1µl
dNTPs 10mM each	1µl
DEPC-treated water	qsp 10µl

[65°C;5'] [on ice;1']

Pendant l'incubation, préparer dans l'ordre le mix :

10X RT buffer	2µl
25 mM MgCl ₂	4µl
0.1 M DTT	2µl
RNaseOUT. (40 U/µl)	1µl
SuperScript. III RT (200 U/µl)	1µl

Mélanger par pipetage 10µl de ce mix avec l'ARN traité précédemment.

[50°C;50'] [85°C;5'] [4°C ;∞]

Ajouter 1µl de RNase H dans le tube et incuber 20' à 37°C.

Possibilité d'utiliser un autre système pour la RT. L'essentiel est d'utiliser une amorce modifiée 5' Phosphate (afin de générer des cDNA 5'P qui seront circularisables).

II – Purification sur colonne QIAGEN (PCR purification kit) – 5'

Protocole standard

Eluer dans 30µl d'eau BM.

III – Circularisation monomoléculaire (Epicentre Biotechnologies) – 1h30

Quantités ajustées pour 500ng d'ARN au départ. Pour 100ng, mettre 16µl d'ADNc et rester dans 20µl final.

ADNc purifié	15µl
CircLigase 100U/µl	1µl
Reaction Buffer 10x	2µl
ATP 1mM	1µl
H ₂ O _{BM} qsp	20µl

[60°C;60'] [80°C;10'] [4°C;∞]

IV – Purification sur colonne PCR purification kit (QIAGEN) – 5'

Protocole standard

Eluer dans 50µl d'eau BM.

V – Rolling Circle Amplification – 21h30

ADNc Circularisé	20µl
dNTPs 10mM each	5µl
BSA 10mg/ml	1µl
Phi29 DNA polymerase buffer 10x	5µl
Phi29 DNA polymerase 10U/µl	1µl
Exo-resistant Specific primer (100µM)*	5µl
H ₂ O _{BM}	qsp 50µl

[30°C;21h][65°C;10'] [4°C;∞[

* Sur devis (Eurogentec). L'amorce exo-résistante spécifique comporte 2 liaisons phosphorothioates entre ses 3 dernières bases en 3' (la Phi29 a une forte activité exonucléase). Elle doit être localisée au début d'une séquence conservée dans le gène cible.

VI – PCR inverses sur matrice d'ADNc concaténé – 4h

Produit de RCA (non purifié, dilué du 1/10 ^{ème} au 1/100 ^{ème})	1µl
dNTPs 10mM each	1µl
Primer sens spécifique 10µM	1µl
Primer antisens spécifique 10µM	1µl
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase Buffer10x (Stratagene)	5µl
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase	1µl
H ₂ O _{BM}	qsp 50µl

[95°C;2'] [95°C;20''/64°C*;20''/72°C;2'***]_{x35-40} [72°C;3'/4°C; ∞[***

*A ajuster en fonction du T_m des amorces.

**A ajuster en fonction aux longueurs des fragments attendus.

*** Plusieurs cycles sont possibles. Si il faut adapter le cycle :

- [95°C;2'/64°C;20''/72°C;40'] [95°C;20''/64°C;20''/72°C;2']_{x40} [72°C;3'/4°C; ∞[

Ce cycle permet de s'assurer la génération d'un produit pleine taille double brin (si le cDNA de fusion est très long). Cette modification est tirée du papier : *3' End cDNA amplification using classic RACE ; Scotto-Lavino et coll, Nature Protocols, 2006.*

- [95°C;2'] [95°C;20''/72°C;2']_{x5} [95°C;20''/70°C;6']_{x5} [95°C;20''/68°C;6']_{x25} [68°C;3'/4°C; ∞[

La « touchdown PCR » accroît la spécificité et est bien adaptée pour parer à un problème d'amplification non spécifique.

NB : Comme une PCR classique, on peut évidemment la nicher en utilisant des amorces plus écartées (voir figure de principe de la RCA-RACE).

Cette approche est basée sur une méthode décrite par Polidoros, A.N. *et al.*, (2006) *BioTechniques* 41(1). Cette technique permet de détecter des ADNc chimériques mais également des isoformes du gène matrice.

3. Annexe#3 : Publication du GRAAL

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-FOXPI¹² and PAX5-ETV6¹² 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

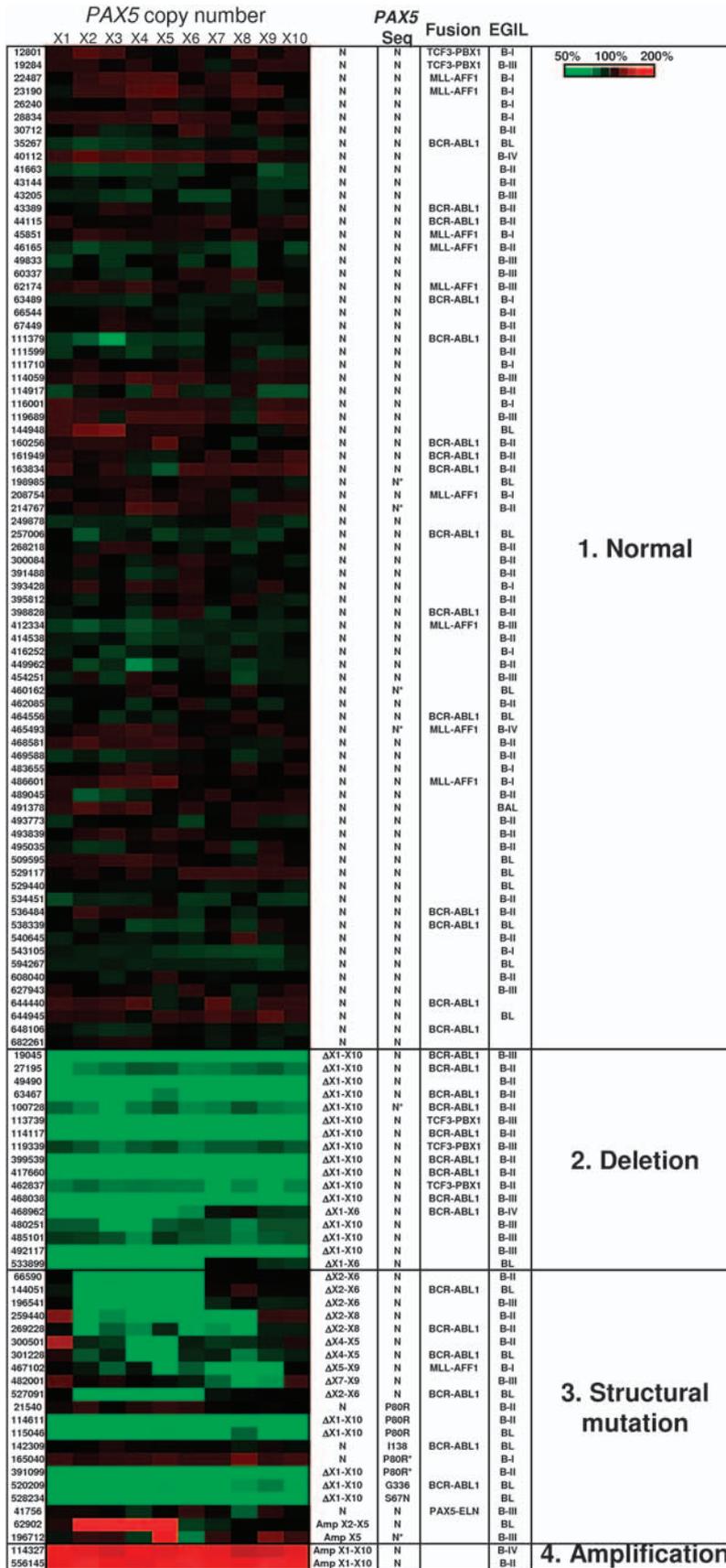
Normal *PAX5* content was found in 81 patients (69%), 20 had a complete hemizygous deletion (17%), 12 a partial hemizygous deletion (10%), 2 a partial amplification (2%) and 2 a complete amplification (2%) (Figure 1; Supplementary Table S2). *PAX5* copy number results were validated by FISH analysis (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.

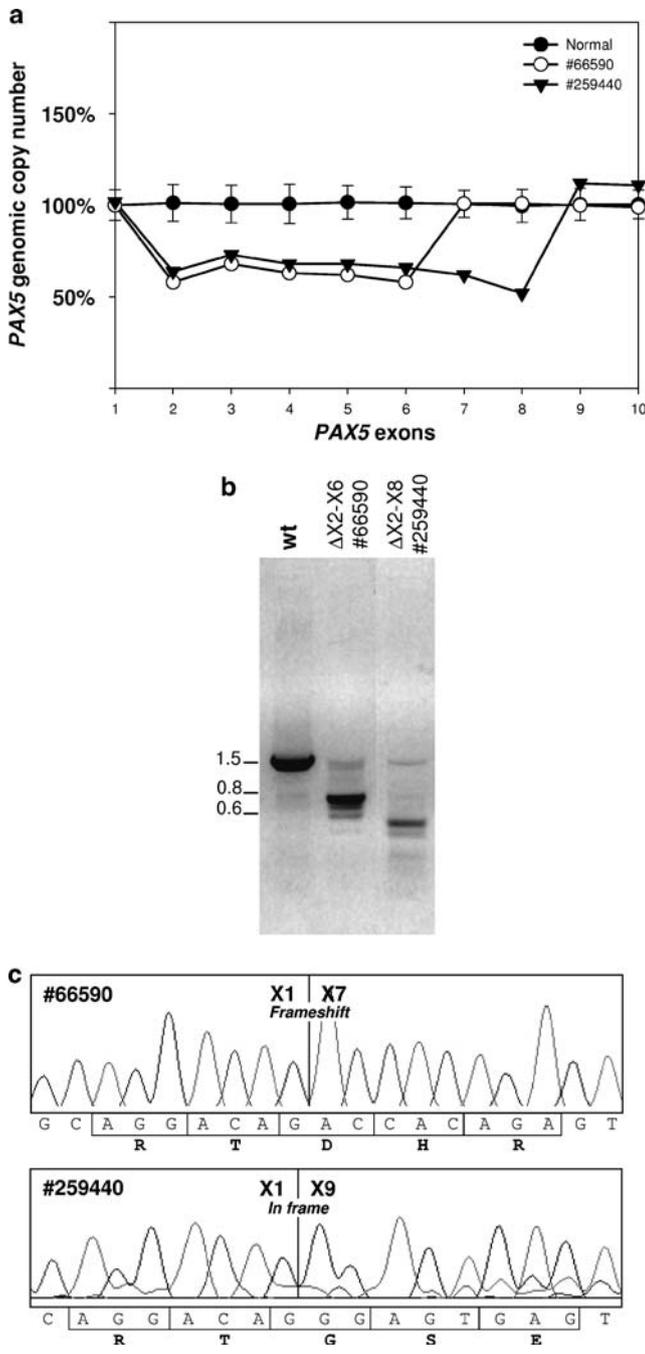
Table 1 Statistical analysis of clinical and biological data

	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 PAX5 (%)		Deletion PAX5 (%)		Mutant PAX5 (%)		Amplification PAX5 (%)		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-

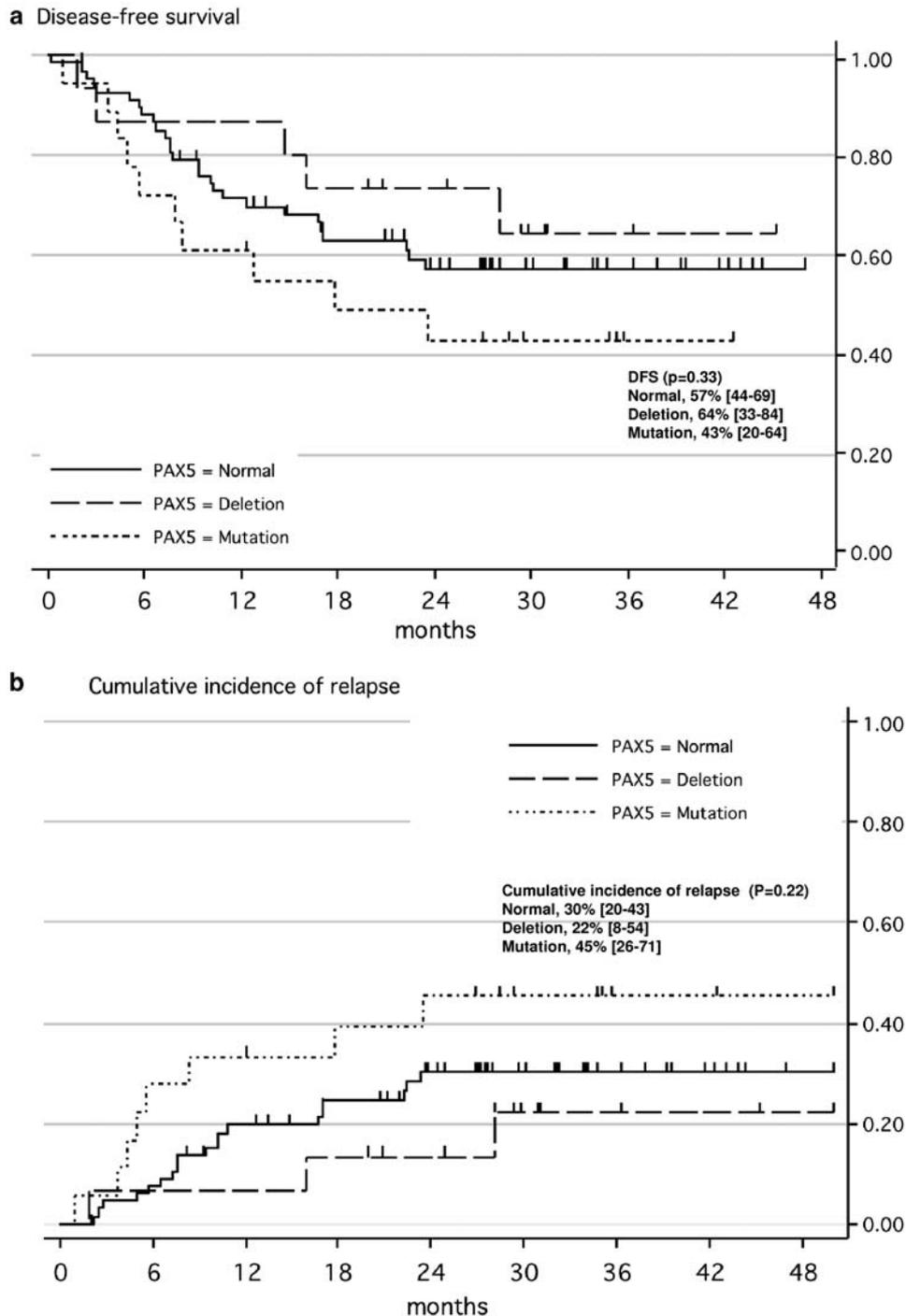


Figure 3 Disease-free survival (DFS) and cumulative incidence of relapse according to *PAX5* (paired-box domain 5) status (a) DFS. At 3 years, estimated DFS was 57% (95%; CI 44–69%), 64% (95%; CI 38–84%) and 43% (95%; CI 20–64%), in the normal, deleted and structural mutant *PAX5* group, respectively ($P=0.33$, 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_HJ_H to $V_HD_HJ_H$ *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 CITITL (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, Lepelley, 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, Bauray, 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, König 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.

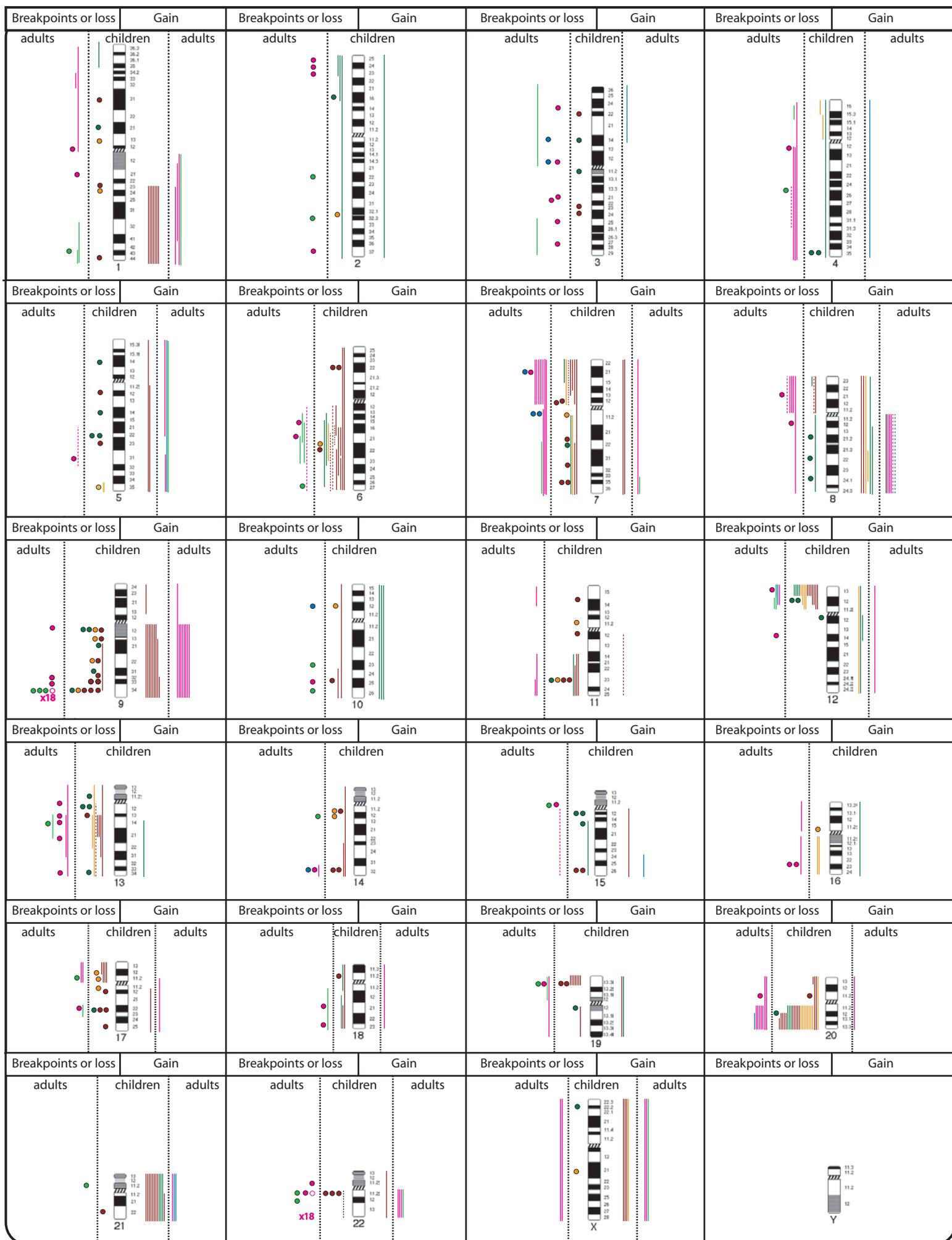
- 16 Bousquet M, Broccardo C, Quelen C, Meggetto F, Kuhlein E, Delsol G *et al*. A novel PAX5-ELN fusion protein identified in B-cell acute lymphoblastic leukemia acts as a dominant negative on wild-type PAX5. *Blood* 2007; **109**: 3417–3423.
- 17 Nebral K, Konig M, Harder L, Siebert R, Haas OA, Strehl 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>)

4. Annexe#4 : Idéogramme couleur (figure S4 Blood)

Représentation des anomalies chromosomiques visibles chez les patients de la cohorte du GFCH.

Figure S1 couleur : Répartition des anomalies chromosomiques. Les pertes de matériel et les points de cassure sont situés sur la gauche des chromosomes; les gains de matériel sont représentés sur la droite de chaque chromosome. Pour chaque chromosome, les adultes et les enfants sont séparés par une ligne pointillée. Les cercles représentent les points de cassure, les lignes pointillées représentent une région mal déterminée de perte ou gain de matériel, les lignes pointillées surmontées d'un cercle représentent une région contenant un point de cassure dont la localisation précise n'a pas été possible. Le code couleur est le suivant : ENFANTS : locus de *PAX5* intact : vert foncé ; locus de *PAX5* remanié : orange ; locus de *PAX5* délété : bordeaux / ADULTES : locus de *PAX5* intact : vert clair ; locus de *PAX5* remanié : bleu ; locus de *PAX5* délété : magenta.



5. Annexe#5 : Protocole système murin de différenciation B

(les réactifs en italiques marqués d'une * sont référencés en fin de protocole)

Production des particules virales : voir également le protocole détaillé :

http://www.stanford.edu/group/nolan/protocols/pro_helper_dep.html

Précipitation des plasmides

1 Volume ADN
10% NaOAc (3M, pH=5,2)
3 Volumes EtOH 100% (froid)
Sur la nuit à -20°C ou 1h à -80°C
Centrifuger vitesse max 30min à 4°C
Vider le surnageant sous la hotte
Laver avec 500µl EtOH 70%
Sécher sous la hotte
Reprendre dans 50µl d'H₂O stéril
Doser au nanodrop
Diluer à 1µg / µl
Stocker à -20°C

Lipofection

Jour 0 : diviser au ½ les Phoenix (70% de confluence le jour d'après)

DMEM 10% SVF
Pénistreptomycine
Sodium pyruvate
+1% glutamine

Jour 1 : dans des boites de 6cm, mettre $1,6 \cdot 10^6$ cellules dans 6 ml

Ou dans des boites de 10cm, mettre $4,6 \cdot 10^6$ cellules dans 15 ml

Avant de quitter le labo, préparer du DMEM 10% SVF (sans pyruvate ni pénicilline/streptomycine) et mettre dans incubateur 37° (équilibre en température et CO₂) dans une **flasque ventilée**

Jour 2 : le matin

Changer le milieu avec DMEM 10% (sans pyruvate ni pénistreptomycine) 1h avant de faire la lipofection

5 ml / boîte de 6 cm
12 ml / boîte de 10 cm

Préparation rétrovirus :	OPTIMEM	500µl	750µl
	X-MIE	6µg	24µg
	D155	2µg	8µg

Préparation Lipofectamine2000 :	OPTIMEM	500µl	750µl
	Lipo2000	20µl	20µl

5min à température ambiante
 Mettre OPTIMEM-Lipo2000 dans OPTIMEM-rétrovirus
 20min à température ambiante
 Mettre 1 ml final sur les cellules goutte à goutte (volume final dans les boites 6 ml/13.5 ml)
 Changer le milieu des cellules (au moins 6h après)
 Avant de quitter le labo, mettre dans l'incubateur du milieu DMEM 10% SVF
 1% Pénistreptomycine
 1% Sodium pyruvate
 dans une **flasque ventilée**

Jour 3 : le matin

Changer le milieu en faisant attention (les cellules ne sont pas très adhérentes) :
 remplacer le vieux milieu par 4 ml/10 ml de milieu DMEM 10% SVF
 1% Pénistreptomycine
 1% Sodium pyruvate
 Ajouter dans les **40µl/100µl** de Sodium butyrate 1M par condition (10 mM final)
 Laisser les cellules dans l'incubateur pendant **6-7 heures**

L'après midi

Laver les cellules doucement avec du PBS 1X (les cellules sont de moins en moins adhérentes)
 Mettre 2 ml/8 ml de **milieu proB**
 Incuber les cellules sur la nuit à 32°C pendant **24 heures (pas moins)**

Jour 4 : Prélever les surnageants rétroviraux avec une seringue de 5-10 ml

Filtrer avec un filtre de 0.45 µm
 Faire des aliquots de 500µl
 Procéder à la transduction avec les surnageants récoltés ou les conserver à -80°C (1 à 2 mois maxi)

Tri cellulaire : Milieux expérimentaux

Tampon MACS

PBS 495.5 ml
 SVF 2.5ml (0.5%)
 EDTA 2ml (2mM final)

Tampon FACS

PBS 500ml
 SVF 10ml (2%)
 EDTA 2ml (2mM final)

Tampon pro-B

IMDM 390ml
 SVF 100ml (20%)
 Penistrepto 5ml
 Glutamine 5ml
 B-Mercapto 2µl

Tampon de flush

IMDM 50ml
 SVF 1ml (2%)

Tampon OP9

SVF 100ml (20%)
 Penistrepto 5ml
 MEMalpha

Disséquer les membres postérieurs fémur+tibia (femelles de 4-5 semaines C57BL6)

LES CELLULES DOIVENT ETRE CONSERVEES SUR GLACE

Nettoyer les os (tibia, fémur alcool et PBS)

Découper les têtes d'os

Flusher avec seringue 10 ml

Récupérer dans falcon 50 ml

Centrifuger 1400g 5 min

Vider surnageant

Reprendre le culot dans 5 ml de tampon de flush dans un falcon 15 ml

Centrifuger 1400g 5 min

Vider le surnageant

Reprendre le culot dans 2ml d'AcK pendant 2min

Compléter à 10ml avec du PBS

Filtrer sur un tamis 70µm (enlever les débris osseux)

Compter les cellules (~100 M de cellules par souris)

Centrifuger 1400g 5min

Vider le surnageant

Reprendre dans tampon MACS (900µl pour 100M de cellules))

Ajouter 100µl de *microbeads B220** pour 100M de cellules (ordre : culot + billes => calcul du V et compléter au V final exact)

Incuber 15min à 4°C

Ajouter 2ml Tampon MACS

Centrifuger 1400g 5min

Pendant centrifugation,

Installer la colonne MACS

Equilibrer la colonne avec 3 ml de tampon MACS

Enlever le surnageant

Reprendre dans 500µl de tampon MACS

Déposer sur colonne magétique

Rincer avec 2 ml de tampon MACS

Décoller la colonne du support

Ajouter 3 ml de tampon FACS

Eluer dans falcon 15ml en poussant avec le piston

Compter les cellules (~15 à 30M par souris)

Marquage :

Anticorps	Dilutions	Volume (Ac dans tp FACS)
<i>Anti-B220 PE.Cy5.5*</i>	1/400 ^{ème}	0,5 dans 200µl
<i>Anti-c-Kit PE*</i>	1/200 ^{ème}	1 dans 200µl
<i>Anti-Igκ FITC*</i>	1/200 ^{ème}	1 dans 100µl

Triple marquage :

Dans 1ml de cellules (pour ~15 M de cellules) :

2,5 µl de B220 (PE-Cy5)

5 µl de c-Kit (PE)

5 µl de Igκ (FITC)

Incuber pendant 20min à 4°C

Simples marquages :

Compléter à 1ml de tampon FACS

Triple Marquage :

Compléter à 10ml de tampon FACS

Centrifuger 1200g 5 min à 4°C

Reprendre les culots dans 0,2 ml pour les simples marquages

Mettre le triple marquage entre 15-25 millions de cellules/ml

Transférer dans tube FACS stériles

Préparatifs pour le tri :

5ml de penistrepto dans tube FACS stériles

3ml de tampon pro-B dans un falcon 15 stérile (enduire les parois du tube de milieu proB)

Tri :

Passage des cellules entre 4000 et 6000 évènements / seconde

Efficacité autour de 90%

~250000-350000 cellules par souris

Mettre en culture les pro B récupérés sur les puits contenant les OP9 (OP9 irradiés à 30Gy platées 4-5 heures avant à 150.10^3 C/puits plaque de 6 puits)

40000 à 50000 proB / puits en milieu pro-B +IL-7 (IL-7 à 0,4 µl/ml de milieu pro-B) (plaque 6 puits, 3ml par puits)

Spinoculation 3 jours après le tri cellulaire

Les proB doivent avoir commencé à proliférer

- Le jour de l'infection, enlever 1ml par puits à transduire et mettre 1ml de surnageant

- préchauffer les centrifugeuses à 32°

- Mettre 3µg/ml final de polybren dans le surnageant (1ml de surnageant sera dans 3ml final par puits = 9µg de polybren a mettre dans chaque ml de surnageant.).

Incuber 15 min à température ambiante (à l'abris de la lumière)

Ajouter ces 1ml de surnageant dilué sur les 2ml de chaque puits contenant les proB + OP9 en IL-7 (dilution final du surnageant rétroviral au tiers)

Les puits : cellules non transduites (NT)

MIE vide

MIE-WT

MIE-mutants

Centrifuger 2h à 3500rpm à 32°C et **Enlever le frein**

Après la centrifugation rajouter 1 ml de **milieu proB + IL7** sur la nuit

Remplacer le milieu proB + IL7 le lendemain matin

Laisser proliférer 4 jours avant le début de l'expérience proprement dite (j0 manip).

Analyse de l'infection et de la différenciation

Après 6 jours, Analyser en FACS le pourcentage d'infection (GFP +) et le statut des différents marqueurs correspondant à la manip.

Récupérer les puits de 6 et les diviser en autant de puits de 24 que nécessaire (classiquement, 1 puits de 6 est divisé en 7 : réparti en 1/7^{ème} pour l'analyse j0 et le reste dans 6 puits de plaque 24).

Replanter avec ou sans IL-7 (prévoir 1 puits avec IL-7 et 2 ou 3 puits sans IL7 pour collecter assez de cellules après 6 jours).

Laisser les cellules à 37°C pendant la durée requise par la manip.

Marquage des proB pour analyse

Marqueurs de différenciation *anti-BPI-APC*** et *Igk-Cy7**, *B220-PECy5.5** et

Exclusion des cellules mortes à l'iodure de propidium.

Transférer chaque puits dans un falcon 15.

Centrifuger 1200rpm 5 min.

Vider le surnageant en retournant le tube (il reste 100-150µl au fond de chaque falcon).

Avec une p200 réglée à 80µl (sinon goutte trop grosse qui tombe du tamis), resuspendre par pipettage les cellules, puis filtrer chaque échantillon sur tamis 70µm. Récupérer la goutte par le dessous du tamis à la pipette et la mettre en plaque de 96 puits à fond conique.

Centrifuger la plaque à 1200rpm 5'

Pendant la centrifugation

Préparer les racks de distribution et la pipette multicanaux de 200.

Dans le premier rack, préparer le mix de marquage correspondant à la manip en comptant 50µl par condition.

Vider la plaque en la retournant et la taper sur un papier absorbant.

Puis procéder au(x) marquage

Reprendre les culots par pipettage dans 50µl du mix d'anticorps.

Incuber 15 minutes à 4°C.

Après l'incubation, laver les cellules avec 150µl de tampon FACS et centrifuger 5' 1200 rpm.

Vider la plaque en la retournant et la taper sur un sopalin.

Si marquage IP, faire solution IP diluée dans le tampon FACS (suivre le protocole du fournisseur).

Resuspendre les cellules marquées avec 100µl de tampon FACS (ou FACS+IP), puis transférer dans les tubes FACS pour analyse. Compléter le volume à 300µl par tube (avec du tampon FACS ou FACS+IP à la distributrice) et passer à la lecture.

***MARQUEURS UTILISES**

Anticorps	Marqueur	Fournisseur	Référence	Dilutions d'utilisation
<i>Rat anti-mouse B220</i>	<i>PE Cy5.5</i>	<i>Southern Biotech</i>	<i>1665-16</i>	<i>1/400^{ème}</i>
<i>Rat anti-mouse IgK light chain</i>	<i>FITC</i>	<i>BD Pharmingen</i>	<i>550003</i>	<i>1/200ème</i>
<i>Anti-mouse CD117 (c-Kit)</i>	<i>PE</i>	<i>eBiosciences</i>	<i>12-1171-82</i>	<i>1/200ème</i>
<i>Anti-mouse BP-1</i>	<i>Biotin</i>	<i>eBiosciences</i>	<i>13-5891-82</i>	<i>1/100ème</i>
<i>Streptavidin</i>	<i>APC</i>	<i>BD Pharmingen</i>	<i>554067</i>	<i>1/200ème</i>
<i>Rat anti-mouse Igκ light chain</i>	<i>PE Cy7</i>	<i>BD Pharmingen</i>	<i>560667</i>	<i>1/200ème</i>
<i>Billes Anti-CD45R (B220)</i>	<i>Magnétique</i>	<i>Miltenyi Biotech</i>	<i>130-049-501</i>	<i>1/10ème</i>
<i>Annexin V</i>	<i>PE</i>	<i>BD Pharmingen</i>	<i>559763</i>	<i>Protocole fournisseur</i>
<i>7-AAD</i>	<i>7-AAD</i>	<i>BD Pharmingen</i>	<i>559763</i>	<i>Protocole fournisseur</i>
<i>Propidium iodide</i>	<i>phenanthridinium</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	<i>P4864</i>	<i>Protocole fournisseur</i>

6. Annexe#6 : Liste des abréviations et des gènes

Convention d'écriture :

Les gènes sont écrits en italique, les protéines en normal.

Les gènes et protéines humains sont écrits tout en majuscule. L'équivalent murin est en minuscule avec une majuscule en premier caractère.

Abréviations

μ H : chaîne lourde μ des immunoglobulines

7-AAD : 7-Aminoactinomycine D

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

A-NHEJ : NHEJ alternatif

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

B6C3F1 : lignée de souris ostéopérotiques issue d'un croisement entre une femelle C57BL/6 et un mâle C3H

BAC : Chromosome artificiel bactérien

BCR : B-cell receptor

BM : de grade biologie moléculaire

BSA : bovine serum albumin

BSAP : B-cell specific activator protein

C57BL/6 : lignée consanguine de souris

ChIP : immuno-précipitation de chromatine

CLS : chaînes légères de substitution

C-NHEJ : NHEJ classique

CORNRR : Corepressor of nuclear receptor motif

CotDNA : Concentration/time deoxyribonucleic acid

CSH : Cellule souche hématopoïétique

CSH-CT : Cellule souche hématopoïétique de court terme

CSH-LT : Cellule souche hématopoïétique de long terme

CSR : commutation de classe isotypique

Cy 5.5 : Cyanine 5.5 (groupement fluorescent)

Cy 7 : Cyanine 7

DEPC : eau traitée au diéthylpyrocarbonate à 0,1% - eau pour expériences de biologie moléculaire

DNase : Désoxyribo nucléase

DTT : Dithiothreitol

EDTA : ethylene-diaminetetraacetic acid

FACS : flow analysis cell sorting

FISH : fluorescent *in situ* hybridization

FITC : fluorescein isothiocyanate

FSC : forward Scatter

FSC-A : FSC-area

FSC-W : FSC-width

GFCH : groupe francophone de cytogénétique hématologique

GRAAL : groupe de recherche sur les leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte
 H3K9m2 : double méthylation de la lysine 9 de l'histone H3
 HAT : histone acetyl transférase
 HD : homéodomaine
 HR : homologous recombination
 HRM : high resolution melting
 ID : inhibitory domain
 ID2 : domaine inhibiteur de la liaison à l'ADN
 IgA : Immunoglobuline A
 IgE : Immunoglobuline A
 IP : iodure de propidium
 IRES : internal ribosome entry site
 LAL : leucémie aiguë lymphoblastique
 LAM : leucémie aiguë myéloblastique
 LDGC : lymphome diffus à grandes cellules
 LLC : leucémie lymphoïde chronique
 LMC : leucémie myéloïde chronique
 LSK : population cellulaire de phénotype Lin⁻/c-Kithi/Scahi
 LTR: long terminal repeats
 MACS : magnetic analysis cell sorting
 Mb : méga base
 miARN : micro-ARN
 MIE : MSCV-IRES-eGFP
 MSCV : Moloney murine stem cell virus
 NHEJ : non homologous end joining
 NLS : nuclear localization signal
 OP : octapeptide
 OP9 : stromal cells derived from macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)-deficient osteopetrotic mice
 PBD : paired box domain
 PCR : polymerase chain reaction
 PE : phycoerythrin
 PEM : Progéniteur érythro-mégacaryocytaire
 PGM : Progéniteur granulo-monocytaire
 PLB : Progéniteur lymphoïde B
 PLC : Progéniteur lymphoïde commun
 PLP : Progéniteur lymphoïde précoce
 PMAL : Progéniteur multipotent amorcé vers la différenciation lymphoïde
 PMC : Progéniteur myéloïde commun
 PML : promyelocytic leukemia
 PMP : Progéniteur multipotent
 PRC2 : Polycomb repressive complex-2, mediate histone H3 methylation
 Pré-B : lymphocyte précurseur B
 Pré-BCR : précurseur du BCR
 Pré-pro-B : précurseur du lymphocyte progéniteur B
 Pro-B : lymphocyte progéniteur B

PTL : Progéniteur de toutes les lignées lymphoïdes
RACE : Rapid Amplification of cDNA Ends
RCA : rolling circle amplification
RP11 : Roswell Park 11 collection
RSS : séquences signal de recombinaison
SHM : hyper recombinaison somatique
SNC : système nerveux central
SNP-CGH : single nucleotide polymorphism-comparative genomic hybridization
SSC : side scatter
SSC-A : SSC-area
SSC-W : SSC-width
ssDNA : single strand DNA
SUMOylation : ajout d'un groupement Small Ubiquitin-related Modifier
TAD : domaine de transactivation
TdT : désoxyribonucléotidyl transferase
TK : tyrosine kinase
UTR : untranslated region
V(D)J : recombinaison des segments VDJ (*IgH*) et VJ (*IgL*) des immunoglobulines

Gènes

ABL : tyrosine kinase Abelson
AID : cytidine désaminase induite par activation du BCR
Aïolos : IKAROS family zinc finger 3
ATM : Ataxia telangiectasia mutated
AUTS2 : Gene de susceptibilité à l'autisme 2
B220 : isoforme de 220KDa de T200
Bcl11a et b : B-cell CLL/Lymphoma 11 a et b
Bcl6 : B-cell lymphoma 6
Blimp1 : B lymphocyte induced maturation protein
Blnk : B-cell linker protein
Brg1 : matrix associated actin-dependent regulator of chromatin
C/EBP α : CCAAT/enhancer-binding protein
C μ : segments constants de la chaîne lourde μ des immunoglobulines
C20orf112 : 112ème origine de réplication du chromosome 20
Cbfb : Core binding factor β
CCR2 : coil-coiled chemokine receptor 2
CD19 : B-lymphocyte cluster of differentiation 19
CD24 : cluster of differentiation 24, heat stable antigen (HSA)
CD25 : cluster of differentiation 25, chaîne α du récepteur à l'IL-2
CD28 : cluster of differentiation 28, T specific surface glycoprotein
CD43 : cluster of differentiation 43, leukosialin
Cd47 : cluster of differentiation 47, lymphocyte marker
Cd79a et b : cluster of differentiation 79, *Ig α* et *Ig β* , BCR and pre-BCR coreceptors
CD93 : cluster of differentiation 93, complement component 1q receptor
CDKN2A : cyclin dependent kinase inhibitor 2A

C_H: segment constant du locus IgH
c-Kit : tyrosine kinase stem cell factor receptor
c-Met : Met oncogene
c-myc : myelocytomatosis virus proto oncogene homolog
Cre : Cre recombinase
CREB : cAMP response element binding protein
CRLF2 : thymic stromal derived lymphopoietin receptor
CXCL12 : stromal derived factor 1 (cytokine)
DACH : Daschund homolog
D_H: segment diversity du locus IgH
E2A : alias TCF3; transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
EBF1 : early B-cell factor 1
eGFP : enhanced GFP
ELN : élastine
Emb : embigin
Ets : v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
ETV6 : alias TEL; ets variant 6
Ezh2 : enhancer of zeste homolog 2
Flt3 : fms-related tyrosine kinase 3
FOXP1 : forkhead box P1
GABP : GA binding protein transcription factor
GAL-1 : galectine 1
GATA1 : GATA binding protein 1
G-CSF : Granulocyte colony stimulating factor
GFP : green fluorescent protein
GM-CSF : granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GPx1 : glutathione peroxidase 1
Id2 : inhibitor of differentiation 2, dominant negative helix-loop-helix protein
IgH : immunoglobuline heavy chain
IgL : immunoglobuline light chain
Igκ : immunoglobuline kappa light chain
Ikaros : transcription factor encoded by *Ikzf1*
Ikzf1 : Ikaros gene
IL-[nombre] : interleukine de type [nombre]
Il2rγ : IL-2 receptor gamma chain
IL-7R : IL-7 receptor
IL7Rα : IL-7 receptor alpha chain
IRF-4 et 8 : interferon regulatory factor 4 and 8
Jagged 1 : ligand du récepteur Notch
JAK : Janus kinase
J_H: segment joining du locus IgH
Lat2 : linker for activation of T cells family 2
Lcp1 : lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
Lef1 : lymphoid enhancer-binding factor 1
Lsp1 : lymphocyte-specific protein 1

MCL-1 : myeloid cell leukemia sequence 1 (*BCL2*-related)
M-CSF : macrophage colony stimulating factor
Mef2c : myocyte enhancer factor 2C
Mi-2 β : main component of the nucleosome remodeling and deacetylase complex
MLL : multi lineage leukemia
N-cadherin : neural cell adhesion molecule, adhésion cellule-cellule
NCoR1 : nuclear corepressor 1
NF κ B : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
Notch1 : T-cell specific transmembrane receptor
NRAS : neuroblastoma RAat Sarcoma viral (v-ras) oncogene homolog
p14^{arf} : alternate reading frame (ARF) product of the *CDKN2A* locus involved in cell cycle regulation
p16^{ink4A} : alternate reading fram product of *CDKN2A* locus, inhibitor of *CDK4*
PTPN11 : protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
p27^{kip1} : alternate splicing of *CDKN1B*, inhibitor of cyclin D and *CDK4* (*Cip/kip* family)
P53 : tumor protein p53
Pax5 : paired box gene 5
PBX1 : pre-B-cell leukemia homeobox 1
Pim1 : proto-oncogene serine/threonine-protein kinase pim
POM121 : Nuclear envelope pore membrane protein 121KDa
PTN : pleiotrophin, heparin binding growth factor
PU.1 : transcription factor *PU.1*, se lie aux séquences riches en purines (*PU-Box*) de ses promoteurs cibles
Rac-GTPase : GTPase de ras-related C3 botulinum toxin substrate
Rag : recombination activating gene
Ras: rat sarcoma viral oncogene homolog
Rb : retinoblastoma
RHOH : ras homolog gene family, member H
Runx1 : alias *Aml1*, runt-related transcription factor 1
SAGA : *Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase*, complexe qui facilite la liaison des *TBP*
SCF : stem cell factor
Sdc4: syndecan 4, Cell surface proteoglycan
SDF-1 : alias *CXCL12*, chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Sfp1 : alias *PU.1*, spleen focus forming virus (*SFFV*) proviral integration oncogene 1
SpiB : transcription factor of the *Ets* subfamily (*Spi-1/PU.1* related),
STAT5 : signal transducer and activator of transcription 5
TBP : TATA-Box binding protein
TCF3 : alias *E2A*; transcription factor 3 (*E2A* immunoglobulin enhancer binding factors *E12/E47*)
Tcfe2a : alia *E2A*
TGF- β : transforming growth factor beta
Tmsb10 : thymosin beta 10, migration-inducing gene
VCAM : vascular cell adhesion molecule 1
V_H : segment variable du locus *IgH*
VLA4 : very late activation protein 4, integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
VpreB1 : immunoglobulin iota chain, pré-BCR surrogate light chain
Wnt : *Wg* (wingless) and *Int-1* oncogene
Xbp1: X-box binding protein 1, transcription factor

XRCC4 : X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4, NHEJ component

ZNF521 : Early hematopoietic zinc finger protein 521

λ 5 : immunoglobulin lambda-like polypeptide, pré-BCR surrogate light chain

7. Annexe#7 : Abréviations cytogénétiques utilisées

D'après la nomenclature ISCN (International System for human Cytogenetic Nomenclature).

Une formule chromosomique est présentée comme suit :

(clone pathologique) Nombre de chromosomes, chromosomes sexuels, description des anomalies, nombre de métaphases pathologiques/(cellules normales) nombre de chromosomes, chromosome sexuels [nombre de métaphases]

par exemple : 45,XY,der(9)t(9;17)(p13;p11),dic(17;20)(p11;q11)[20]/46,XY[3] correspond à un caryotype masculin. 20 métaphases clonales ont été comptées chez un homme pour 3 métaphases normales. Les clones pathologiques ont 45 chromosomes. Ils présentent deux anomalies :

- Une translocation déséquilibrée entre le chromosome 9 et le chromosome 17, le matériel du 17 étant passé sur le 9. le chromosome 9 pathologique a perdu la région 9p13 jusqu'au télomère du bras court. Cette région a été remplacée par celle du chromosome 17 allant du locus 17p11 jusqu'au télomère de 17p.
- Une translocation dicentrique entre le chromosome 17 et le chromosome 20. Les régions 17p11 et 20q11 se sont fusionnées, amenant derrière elles tout le reste du chromosome. La région télomérique 20q11::tel est déléetée (17p11::tel est passé sur le 9).

Source : <http://cvirtuel.cochin.univ-paris5.fr/cytogen/1-4.htm>

(A;B)(locus 1;locus 2) : événement associant les loci 1 du chromosome A au locus 2 du chromosome B

add : présence de matériel chromosomique d'origine inconnue sur un chromosome.

Ap : bras court du chromosome A

Aq : bras long du chromosome A

del : *déléetion* d'un fragment de chromosome

der : chromosome dérivé ; désigne le chromosome réarrangé par un remaniement chromosomique déséquilibré.

Le type de réarrangement est généralement précisé à la suite. Ex : der(7)t(7;18) = chromosome 7 dérivé obtenu par une translocation entre un 7 et un 18.

dic : chromosome *dicentrique* , c'est-à-dire possédant deux centromères.

dup : duplication d'un fragment chromosomique

i : *isochromosome* ; ces chromosomes présentent deux bras courts identiques et pas de bras long (ou l'inverse).

ins : *insertion* de matériel dans un chromosome

inv : *inversion* chromosomique ; un fragment a changé d'orientation à l'intérieur même du chromosome.

locus::locus : région située entre deux positions

mar : petit fragment chromosomique avec ou sans centromère dont l'origine est inconnue.

r : anneau (ring en anglais).

rcp : réciproque. Parfois utilisé en association avec "t" pour préciser qu'une translocation est réciproque.

rob : robertsonienne. Parfois utilisé en association avec "t" pour préciser qu'une translocation est de type robertsonienne.

signe (;) : séparateur entre des chromosomes ou des régions

signe moins (-) : perte du chromosome indiqué juste après.

signe multiplié (x) : indique la présence de copies multiples d'un chromosome réarrangé.

signe plus (+) : gain du chromosome indiqué juste après.

souligné : utilisé pour distinguer les deux homologues quand ils sont tous les deux réarrangés

t : translocation.

tel : *télomère*

upd : *disomie uniparentale* ; les deux chromosomes d'une même paire sont hérités du même parent.

AUTHOR: Etienne COYAUD

TITLE: Characterization of *PAX5* rearrangements in B-cell acute lymphoblastic leukaemia.

DIRECTOR: Pr. Pierre BROUSSET

DATE OF ORAL EXAMINATION AND LOCATION:
Wednesday, April 27, 2011 – CHU Purpan, Toulouse

ABSTRACT:

PAX5 is an essential transcription factor of B-cell differentiation. It is altered in almost 40% of B-cell acute lymphoblastic leukaemia (B-ALL).

We have described its cytogenetic alterations in these diseases. Its allelic deletion is associated with BCR-ABL1 or E2A-PBX1. *PAX5* deletion appears as a secondary event in B-ALL. We have shown that patients harbouring an intragenic *PAX5* breakpoint display simple karyotypes. This result highlights that these events are initiating events in B-ALL. We have identified *NcoR1*, *DACH2*, *GOLGA6* and *TAOK1* as new *PAX5* fusion partners. We have not identified common function or structure between all these partners, excepted that all the fusion genes conserve the DNA binding domain of *PAX5*.

To evaluate the involvement of several mutants in leukemogenesis, we have tested their effect using a murine *ex-vivo* inducible B-cell differentiation system. Our work shows that these mutants are able to modify parameters such as differentiation, apoptosis and proliferation.

KEYWORDS: *PAX5*, B-ALL, chromosomal translocations, B-cell differentiation.

DISCIPLINE: Oncology

LAB: INSERM UMR 1037 - CRCT - CHU Purpan - BP 3028
31024 TOULOUSE Cedex 3

AUTEUR : Etienne COYAUD

TITRE : Caractérisation des réarrangements de *PAX5* dans les leucémies aiguës lymphoblastiques B.

DIRECTEUR : Pr. Pierre BROUSSET

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE :

27 avril 2011 – CHU Purpan, Toulouse

RESUME :

PAX5 est un facteur de transcription essentiel dans le développement lymphocytaire B. Il est altéré dans près de 40% des leucémies aiguës lymphoblastiques de type B (LAL-B).

Nous avons caractérisé des anomalies cytogénétiques l'impliquant dans les LAL-B. Sa délétion est associée à *BCR-ABL1* ou *E2A-PBX1*, ce qui suggère que cette altération est secondaire dans la leucémogénèse. En présence d'une cassure interne de *PAX5*, les caryotypes sont simples. Ceci souligne le caractère initiateur de ces d'altérations. Nous avons identifié *NCoR1*, *DACH2*, *GOLGA6* et *TAOK1* comme nouveaux partenaires de fusion de *PAX5*. Ces fusions n'ont pas de caractéristiques communes exceptées la conservation du domaine de liaison à l'ADN de *PAX5*.

Nous avons testé l'impact de ces mutants sur la différenciation B par un système murin inductible *ex-vivo*. Nos travaux présentent des modifications des propriétés de différenciation, de survie cellulaire et d'apoptose inhérentes à l'expression de divers mutants.

MOTS-CLES : *PAX5*, LAL-B, translocations chromosomiques, différenciation B.

DISCIPLINE : Cancérologie

LABORATOIRE D'ACCUEIL :

INSERM UMR 1037 - CRCT - CHU Purpan - BP 3028
31024 TOULOUSE Cedex 3