

Mécanismes de l'action oncogénique de Bcr-Abl dans la leucémie myéloïde chronique

Jean-Claude Chomel
François Guilhot
Joseph Tanzer
Alain Kitzis

La protéine Bcr est un intermédiaire de la signalisation cellulaire et la protéine Abl un régulateur de la croissance de la cellule. Une translocation chromosomique t(9;22) engendre une protéine hybride Bcr-Abl à activité tyrosine kinase dont le rôle dans la genèse de la leucémie myéloïde chronique (LMC) a été montré *in vitro* et *in vivo*. Quelques éléments expliquent la pathogénicité de cette protéine hybride : elle lie des adaptateurs permettant l'activation de la p21^{RAS}, indispensable à la fonction oncogénique de Bcr-Abl ; les cellules possédant un chromosome Philadelphie (signe de la translocation 9;22) ne s'ancrent plus sur les cellules du stroma médullaire, ce qui empêche la régulation négative de leur prolifération et facilite donc l'émergence du clone malin ; on a observé un effet anti-apoptotique précoce de Bcr-Abl. Ces quelques propriétés contribuent certainement à la perturbation globale des processus de contrôle de la prolifération cellulaire à l'origine de la LMC. Peut-être l'étude des perturbations de la transmission des signaux intracellulaires par la protéine hybride Bcr-Abl débouchera-t-elle sur de nouvelles perspectives thérapeutiques ?

ADRESSE

J.C. Chomel : *assistant hospitalier universitaire*.
A. Kitzis : *professeur des universités-praticien hospitalier*. Laboratoire de génétique cellulaire et moléculaire.
F. Guilhot : *professeur des universités-praticien hospitalier*.
J. Tanzer : *professeur des universités-praticien hospitalier*.
Département d'hématologie et oncologie médicale, CHU La Milétrie, BP 577, 86021 Poitiers Cedex, France.

TIRÉS À PART

J.C. Chomel.

m/s n° 12, vol. 11, décembre 95

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération de la lignée granuleuse envahissant la moelle osseuse, la rate, le sang. Dans plus de 90 % des cas, il existe une signature cytogénétique de la LMC : le chromosome Philadelphie ou Ph. Ce chromosome 22 raccourci révèle la translocation réciproque t(9;22) (q34;q11). Les zones de recombinaisons sont situées au niveau

de deux gènes qui sont mis en continuité : le proto-oncogène *c-ABL* en 9q et le gène *BCR*, pour *breakpoint cluster region*, en 22q. A ce jour, seuls la greffe de moelle osseuse allogénique et le traitement par l'interféron α permettent une amélioration cytogénétique de la maladie [1]. Dans cette revue, après avoir discuté des activités biologiques des protéines Bcr et Abl, nous décrirons l'état des connaissances sur les dérégulations moléculaires observées lors de la fusion *BCR-ABL*.

Le gène chimérique BCR-ABL

Le gène *BCR* s'étend sur environ 130 kb et comporte une vingtaine d'exons (figure 1). Il est transcrit en deux types principaux d'ARN messagers de 4,5 et 6,7 kb qui ne diffèrent que dans leur partie non traduite. La région promotrice de *BCR* est riche en séquences GC, contient des sites de fixation pour la protéine Spl et ne possède pas de boîte TATA [2]. La protéine de 160 kDa pour laquelle il code est exprimée dans de nombreux tissus (*m/s* n° 7, vol. 11, p. 1039) [3]. Dans la LMC, le réarrangement se produit dans une zone appelée M-BCR, pour *major breakpoint cluster region*, qui chevauche les exons 12 à 16 de *bcr* (exons b1 à b5 de M-BCR). L'analyse nucléotidique de M-BCR a mis en évidence des séquences caractéristiques pouvant expliquer un fort taux de recombinaisons [4]. Cette région comprend une séquence Alu, une séquence riche en AT similaire aux origines de réplication virale, des séquences de recombinaison des gènes d'immunoglobulines...

Le deuxième gène impliqué dans la t(9;22) est le proto-oncogène *c-ABL*. Il s'agit de l'homologue cellulaire de l'oncogène viral, *v-abl*, à l'origine de la leucémie murine d'Abelson sous la forme activée *gag-abl*. Le proto-oncogène *c-ABL* est localisé dans la partie télomérique du chromosome 9; il comprend une dizaine d'exons et s'étend sur environ 230 kb. Ce gène est transcrit en deux ARN messagers de 6 et 7 kb obtenus par utilisation alternative des exons 1b ou la (figure 1). Ces ARNm sont transcrits après activation de deux promoteurs différents, riches en GC et possédant de multiples sites de fixation pour le facteur Spl [5]. Les transcrits donnent naissance à deux protéines de 145 kDa ne différant que dans leur partie N-terminale (1b et 1a) et synthétisées dans la plupart des tissus. La protéine de type 1b peut se fixer aux membranes cellulaires par myristoylation, la protéine 1a en est incapable. La plupart des recombinaisons décrites dans la LMC ont lieu dans une grande zone d'environ 200 kb située dans le premier intron d'*ABL*.

La translocation t(9;22) observée dans la LMC se fait sans perte de matériel génétique. Que ce soit sur le

chromosome Ph ou sur le chromosome 9q+, les gènes *BCR* et *c-ABL* fusionnent dans la même orientation transcriptionnelle et le cadre de lecture est conservé. Ainsi, lors de la translocation, il y a formation de deux produits de recombinaison: le gène *BCR-ABL* sur le chromosome Ph et le gène *ABL-BCR* sur le chromosome 9q+. Le gène *BCR-ABL* est transcrit en un ARNm hybride après activation du promoteur de *BCR*. Il existe deux types principaux de transcrits suivant la zone de cassure dans *BCR*; ceux de type b2a2 pour lesquels il y a fusion de l'exon 2 de M-BCR avec l'exon 2 de *c-ABL* et ceux de type b3a2 où l'exon 3 de M-BCR est fusionné avec l'exon 2 de *c-ABL* (figure 1). Les ARNm hybrides comprennent toute la séquence codante de *c-ABL* à l'exception de l'exon 1. Ces messagers sont traduits en une protéine de 210 kDa qui comporte 927 ou 902 acides aminés provenant de *BCR*, selon que l'exon b3 reste sur le chromosome 22 ou migre sur le 9, et 1 097 acides aminés de *c-ABL*.

Potentiel oncogénique de BCR-ABL

Le virus d'Abelson, portant l'oncogène activé *v-abl*, induit chez la souris des leucémies pré-B et transforme *in vitro* les cellules lymphoïdes, myéloïdes et fibroblastiques. On peut cependant remarquer que lorsque l'oncogène *v-abl* infecte des fibroblastes NIH/3T3, ces derniers adoptent deux phénotypes opposés. La majorité des cellules est bloquée en phase G1 du cycle cellulaire, alors que la minorité devient indépendante des facteurs de croissance [6]. La transformation de ces fibroblastes nécessite la myristoylation de *v-Abl*. Lorsque *v-Abl* n'est pas myristoylée (mutant dépourvu du site de myristoylation), il n'y a pas transformation des cellules NIH/3T3. En revanche, ce mutant possède toujours une activité transformante sur une lignée lymphoblastoïde pro B (cellule Ba/F3). Il en est de même pour la protéine Bcr-Abl qui n'est pas myristoylée. Elle transforme les cellules Ba/F3 et non pas les NIH/3T3 [7]. Ces expériences suggèrent que le mécanisme de transformation des cellules NIH/3T3 est différent de celui des cellules Ba/F3, l'un nécessi-

RÉFÉRENCES

1. Guilhot F. Le traitement de la leucémie myéloïde chronique par les interférons α . *médecine/sciences* 1991; 7: 453-9.
2. Shah NP, Witte ON, Denny CT. Characterization of the *BCR* promoter in Philadelphia chromosome-positive and -negative cell lines. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 1854-60.
3. Collins S, Colman H, Groudine L. Expression of *bcr* and *bcr-abl* fusion transcripts in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2870-6.
4. Sowerby SJ, Kennedy MA, Fitzgerald PH, Morris CM. DNA sequence analysis of the major breakpoint cluster region of the *BCR* gene rearranged in Philadelphia-positive human leukemias. *Oncogene* 1993; 8: 1679-83.
5. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Roe BA, Canaani E. Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *abl* gene and from the *bcr-abl* fused gene. *Cell* 1986; 47: 277-84.
6. Renshaw MW, Kipreos ET, Albrecht MR, Wang YJ. Oncogenic *v-Abl* tyrosine kinase can inhibit or stimulate growth, depending on the cell context. *EMBO J* 1992; 11: 3941-51.
7. Daley GQ, McLaughlin J, Witte ON, Baltimore D. The CML-specific-p210^{bcr/abl} protein, unlike *v-abl*, does not transform NIH/3T3 fibroblasts. *Science* 1987; 237: 532-5.
8. Daley GQ, Van Etten RA, Jackson PK, Bernards A, Baltimore D. Nonmyristoylated Abl proteins transform a factor-dependent hematopoietic cell line. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 1864-71.
9. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210^{bcr/abl} gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990; 247: 824-30.
10. Kelliher MA, McLaughlin J, Witte ON, Rosenberg N. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with *v-abl* and *BCR-ABL*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6649-53.
11. Hariharan IK, Harris AW, Crawford M, Abud H, Webb E, Cory S, Adams JM. A *bcr-v-abl* oncogene induces lymphomas in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 2798-805.

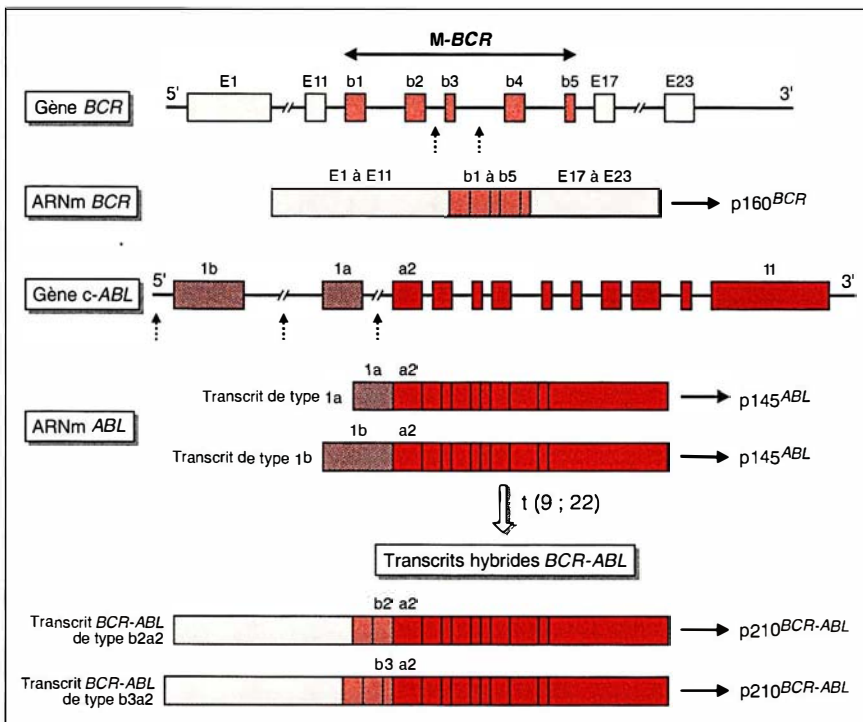


Figure 1. **Gènes et transcrits BCR, ABL et BCR-ABL.** Les flèches au niveau des gènes BCR et ABL indiquent les zones possibles de recombinaisons. Dans BCR, ces dernières se situent dans la région M-BCR qui comprend les exons b1 à b5. Les deux principaux transcrits BCR-ABL ne diffèrent que par la présence ou l'absence de l'exon b3 de M-BCR.

tant la fixation de la protéine transformante à la membrane (v-Abl sur les NIH/ 3T3), l'autre non (Bcr-Abl ou v-Abl non myristoylée sur les cellules Ba/ F3) [8]. Ainsi, la protéine hybride Bcr-Abl possède une activité transformante spécifique des cellules de type hématopoïétique.

In vivo, les études concernant l'implication de Bcr-Abl dans la LMC ont été réalisées selon deux approches. Des souris irradiées et reconstituées à partir d'une moelle osseuse infectée par un rétrovirus contenant la séquence *BCR-ABL* développent des syndromes de type LMC [9, 10]. Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de produire de souris transgéniques qui synthétisent la protéine BCR-ABL responsable de la LMC (p210)*. En revanche, des souris transgéniques portant, soit la construction *BCR-V-ABL*, soit le gène *BCR-ABL* codant pour la protéine à l'origine des leu-

cémies aiguës lymphoblastiques (p190), développent des lymphomes ou des leucémies aiguës [11, 12].

Le potentiel oncogénique de la protéine de fusion Bcr-Abl a été démontré aussi bien *in vitro* par la transformation de progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes qu'*in vivo* par l'induction de tumeurs de type hématopoïétique. La protéine hybride est donc bien à l'origine de la LMC par des mécanismes moléculaires que l'on commence à appréhender.

La famille des kinases Abl

Les protéines tyrosine kinases sont trouvées chez tous les organismes pluricellulaires. Elles jouent un rôle clé dans la transmission des signaux de l'extérieur de la cellule vers une cible intracellulaire. Ces tyrosine kinases peuvent être divisées en deux groupes: les récepteurs membranaires et les kinases non récepteurs dont le chef de file est Src. La famille des kinases Abl à localisation cytoplasmique ou nucléaire fait partie de ce deuxième groupe.

Les gènes de la famille *ABL* sont représentés par l'oncogène viral *v-abl* et par des proto-oncogènes cellulaires: *c-ABL* et *ARG* chez l'homme, *D-abl* chez la drosophile et *N-abl* chez le nématode [13]. Tous ces gènes codent pour des protéines possédant une fonction tyrosine kinase. De la région N-terminale à la région C-terminale de la protéine c-Abl, différents domaines peuvent être individualisés (figure 2). La zone variable de myristoylation est due aux exons 1 alternatifs de *c-ABL*. Ensuite trois domaines homologues de Src sont retrouvés. Le domaine SH3, d'environ 60 acides aminés, reconnaît des motifs riches en prolines [14]; il interagit ainsi de façon constitutive avec des protéines possédant les motifs cibles. Le domaine SH2 comporte environ 100 acides aminés et permet la reconnaissance de motifs contenant une tyrosine phosphorylée [14]. Le domaine SH1 ou tyrosine kinase est le siège de l'activité majeure de c-Abl. Le reste de la protéine, peu conservé entre les différents membres de la famille, n'est pas retrouvé dans Src et représente sans doute une fonction spécifique. Abl a une localisation cytoplasmique ou nucléaire [15, 16]. Un signal de translocation nucléaire (NTS), similaire à celui de l'antigène grand T de SV40, a été localisé dans la deuxième partie de la protéine [15]. La région pré-carboxy terminale contient un large site de fixation à l'ADN (D-B pour *DNA binding*) [17]. Ce domaine permet la fixation de la protéine à une séquence spécifique d'ADN similaire à l'élément EP du *enhancer* du virus de l'hépatite B [18]. c-Abl est ainsi la première tyrosine kinase décrite pouvant se fixer à l'ADN. Les 162 derniers acides aminés de c-Abl permettent sa fixation sur des molécules d'actine polymérisées (domaine A-B pour *actin binding*) [13, 19]. En fait, cette fixation n'a lieu que lorsque la protéine est synthétisée en très grande quantité. Il convient de remarquer que le domaine carboxy-terminal est très riche en prolines [19]. La protéine Abl peut donc être schématiquement divisée en deux régions, une zone NH₂-terminale, en partie similaire à Src, et une zone C-terminale essentielle à la localisation de la protéine au niveau du cytosquelette ou de l'ADN.

L'inactivation de gènes par recombinaison

* Récemment des souris transgéniques exprimant un gène hybride p210^{bcr-abl} ont été élaborées. Elles développent des leucémies aiguës (Honda et al. *Blood* 1995; 85: 2853-61).

RÉFÉRENCES

12. Heisterkamp N, Jenster G, Ten Hoeve J, Zovich D, Pattengale PK, Groffen J. Acute leukaemia in *bcr-abl* transgenic mice. *Nature* 1990; 344: 251-3.
13. Wang JY. Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 35-43.
14. Chardin P. Domaines SH2 et SH3: un nouveau paradigme pour la transmission du signal. *médecine/sciences* 1994; 10: 709-12.
15. Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D. The mouse type IV *c-abl* gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell* 1989; 58: 669-78.
16. Wetzler M, Talpaz M, Van Etten RA, Hirsh-Ginsberg C, Beran M, Kurzrock R. Subcellular localization of Bcr, Abl and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J Clin Invest* 1993; 92: 1925-39.
17. Kipreos ET, Wang JY. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science* 1992; 256: 382-5.
18. Dikstein R, Heffetz D, Ben-Neriah Y, Shaul Y. c-Abl has a sequence-specific enhancer binding activity. *Cell* 1992; 69: 751-7.
19. McWhirter JR, Wang JY. Activation of tyrosine kinase and microfilament-binding functions of c-Abl by Bcr sequences in Bcr/Abl fusion proteins. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 1553-65.
20. Tybulewicz VLJ, Crawford CE, Jackson PK, Bronson RT, Mulligan RC. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the *c-abl* proto-oncogene. *Cell* 1991; 65: 1153-63.
21. Schwartzberg PL, Stall AM, Hardin JD, Bowdish KS, Humaran T, Boast S, Harbison ML, Roberson EJ, Goff SP. Mice homozygous for the *abltm* mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell* 1991; 65: 1165-75.
22. Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Haviik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 1994; 77: 121-31.

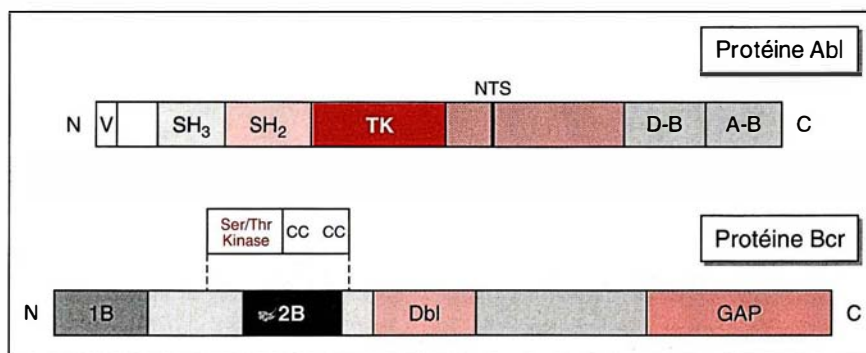


Figure 2. **Domaines fonctionnels des protéines Abl et Bcr.** La protéine Abl comprend une extrémité N-terminale variable (V), un domaine SH3, un domaine SH2, la région tyrosine kinase, le signal de translocation nucléaire (NTS), la zone carboxy-terminale pouvant se fixer à l'ADN (D-B) et le domaine pouvant lier l'actine (A-B). La protéine Bcr comprend deux domaines essentiels à l'activation d'Abl, 1B et 2B, une zone d'homologie avec Dbl, facteur d'échange GDP-GTP, et un domaine GAP à l'extrémité C-terminale. Le domaine 2B chevauche une région de type sérine thréonine kinase suivie d'une zone riche en cystéines (CC CC).

naison homologue produit des mutants nuls par « perte de fonction ». Le gène cible n'étant plus exprimé, l'observation des conséquences de la mutation sur la souris transgénique permet d'appréhender la fonction biologique de la protéine. Une telle mutation affectant *c-abl* entraîne la mort de souris homozygotes très rapidement après leur naissance. Une atrophie thymique et splénique est observée, ainsi qu'une lymphopénie [20]. Des souris dont le gène *abl* possède une mutation à l'origine d'une protéine tronquée dans sa partie C-terminale, mais avec une fonction tyrosine kinase conservée, présentent également une lymphopénie et une mortalité néonatale [21]. Ces expériences montrent l'importance de la région C-terminale de la protéine. Le domaine fixant l'ADN et celui fixant l'actine participent à la fonction physiologique d'Abl. On ne sait que peu de choses sur l'action d'Abl au niveau du cytosquelette. La protéine peut y être impliquée dans la transduction de signaux de croissance ou de différenciation. En revanche, la fonction nucléaire d'Abl est mieux cernée. La fixation à l'ADN suggère que *c-Abl* joue un rôle dans la transcription, la réplication de l'ADN ou la régulation du cycle cellulaire. Des travaux portant sur le rôle d'Abl dans le cycle cellulaire ont montré que l'oncoprotéine était hyperphosphorylée pendant la méta-

phase. Cette phosphorylation correspond à la perte de l'aptitude à fixer l'ADN [17]. D'autres données indiquent que *c-Abl* exerce un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire [22]. Au contraire, nous verrons que la protéine Bcr-Abl agit comme un régulateur positif de croissance. Ces faits ne sont pas sans rappeler l'action de l'anti-oncogène *p53* sur la croissance des cellules.

La protéine Bcr

L'analyse de la protéine Bcr met en évidence différentes régions (figure 2). La partie N-terminale de la protéine est entièrement codée par le premier exon du gène *BCR*. Les acides aminés 1 à 63 définissent le domaine 1B et constituent une région indispensable à l'activation d'Abl dans la protéine hybride [19, 23]. En outre, cette région est à l'origine de réactions d'oligomérisation [24]. Les acides aminés 176 à 242 caractérisent le domaine 2B qui possède deux sites de liaison aux domaines SH2 de certaines protéines (SH2-B pour *SH2 binding*). L'interaction Bcr/protéines à module SH2 se fait, soit sur les sérines/thréonines phosphorylées, soit, et le plus souvent, sur les tyrosines phosphorylées de SH2-B (*m/s n°7, vol. 11, p. 1039*). Le domaine 2B chevauche une région sérine/thréonine kinase suivie d'une zone riche en résidus cystéines [25]. L'activité

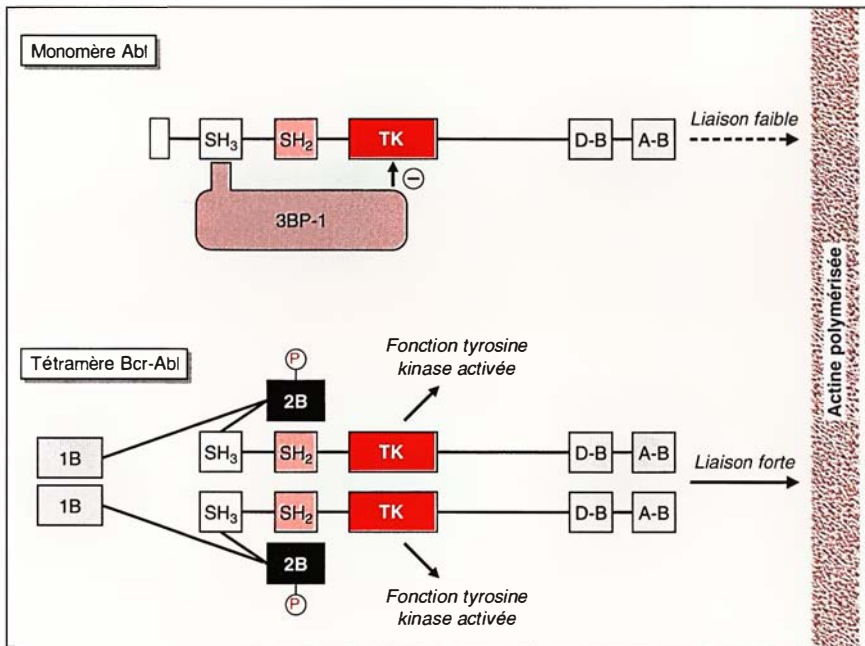


Figure 3. **Activation d'Abl par Bcr.** La protéine Abl peut se fixer sur les filaments d'actine avec une faible affinité. Un phénomène de trans-inhibition faisant intervenir la protéine 3BP-1 permet la régulation de son activité tyrosine kinase. La formation de la protéine hybride induit l'activation de la fonction tyrosine kinase. La formation des tétramères Bcr-Abl permet une fixation plus forte sur les filaments d'actine du cytosquelette. Pour simplifier, seul un dimère Bcr-Abl est représenté sur le schéma.

sérine/thréonine kinase de Bcr peut s'exercer, soit sur la protéine elle-même, soit sur des protéines substrats. Les paires de cystéines trouvées en aval de l'activité kinase sont importantes pour l'activation de l'enzyme. La partie centrale de Bcr présente des homologies avec les protéines Dbl à fonction de facteur d'échange GDP-GTP pour CDC42. La région C-terminale de Bcr possède une fonction GAP (*GTPase-activating protein*) pour les protéines Rac 1 et Rac 2 [26]. Ces protéines appartiennent à la famille de la p21^{ras} impliquée dans l'organisation du cytosquelette. Les p21^{rac1/rac2} favorisent la production d'oxygène actif dans les polynucléaires neutrophiles et les macrophages *via* la chaîne respiratoire dépendante du NADP [27]. Afin de préciser les fonctions de Bcr, des mutants nuls ont été créés. Contrairement aux souris *abl*^{-/-}, les souris transgéniques homozygotes mutées dans *bcr* sont viables. Aucune différence entre les phénotypes normaux et mutants n'est observée, notamment en ce qui concerne le développement hématopoïétique et la fonction lymphoïde [28]. Cependant, l'introduction d'endotoxine bactérienne, sous la forme de lipopolysaccharides, chez les individus

homozygotes mutés est à l'origine d'un choc septique gravissime. Ce phénomène est dû à une synthèse exagérée de peroxyde d'hydrogène par les polynucléaires neutrophiles. De plus, un taux élevé de protéine Rac sous-membranaire est retrouvé dans les cellules des mutants nuls. On peut donc déduire de ces travaux que Bcr exerce un contrôle sur l'équilibre Rac-GTP/Rac-GDP au cours de l'activation des neutrophiles (*m/s* n° 7, vol. 11, p. 1039).

L'activation d'Abl par Bcr et ses conséquences

Le gène hybride *BCR-ABL* est sous la dépendance du promoteur *BCR*. Ce dernier étant similaire au promoteur *ABL*, l'activation oncogénique ne provient pas d'un mécanisme de dérégulation transcriptionnelle, mais de la structure de la protéine hybride. Cette dernière comprend la partie N-terminale de Bcr, notamment les domaines 1B et 2B, et la totalité de c-Abl, sauf la zone variable de myristoylation N-terminale. La protéine hybride est donc une protéine Abl activée synonyme de la protéine Gag-Abl du virus de la leucémie murine d'Abelson, malgré l'absence du site de myristoylation. Si la protéi-

ne Bcr est cytoplasmique et la protéine c-Abl à la fois cytoplasmique et nucléaire, la protéine hybride Bcr-Abl est uniquement cytoplasmique, alors que le signal de translocation nucléaire d'Abl est conservé [16]. Les protéines v-Abl et Bcr-Abl ont une fonction tyrosine kinase activée de façon constitutive et sont exclues du noyau. L'acquisition de l'activité transformante de Bcr-Abl passe par la suppression de mécanismes inhibiteurs et par l'activation de la fonction tyrosine kinase d'Abl. Cette activation permet la phosphorylation de nombreuses protéines substrats.

Suppression des mécanismes inhibiteurs

Abl est activée par fusion avec Bcr ou, *in vitro*, par délétion, soit de son domaine SH3, soit de sa partie C-terminale. Ainsi, l'altération moléculaire peut interrompre un mécanisme inhibiteur de la fonction tyrosine kinase. La partie C-terminale d'Abl contient des régions riches en prolines. On peut envisager qu'elles se fixent sur le domaine SH3 et induisent ainsi une *cis*-inhibition [29]. Mais cette hypothèse ne repose sur aucune base expérimentale, alors que l'existence d'un mécanisme de

RÉFÉRENCES

23. Muller AJ, Young JC, Pendergast AM, Pondel M, Landau NR, Littman DR, Witte ON. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 1785-92.
24. McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 7587-95.
25. Maru Y, Witte ON. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* 1991; 67: 459-68.
26. Diekmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C, Hall C, Lim L, Hall A. Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21^{ras}. *Nature* 1991; 351: 400-2.
27. Benna JE, Ruedi JM, Babior BM. Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac 2 operates *in vivo* as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J Biol Chem* 1994; 269: 6729-34.
28. Voncken JW, van Schaick H, Kaartinen V, Deemer K, Coates T, Landing B, Patten-gale P, Dorseuil O, Bokoch GM, Groffen J, Heisterkamp N. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell* 1995; 80: 719-28.
29. Goga A, McLaughlin J, Pendergast AM, Parmar K, Muller A, Rosenberg N, Witte ON. Oncogenic activation of c-ABL by mutation within its last exon. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4967-75.
30. Cicchetti P, Mayer BJ, Thiel G, Baltimore D. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science* 1992; 257: 803-6.
31. Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 1993; 259: 1157-61.
32. Mayer BJ, Baltimore D. Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the Abl tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2883-94.
33. Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* 1991; 66: 161-71.
- trans*-inhibition a été prouvée (figure 3). Une protéine, la 3BP-1, peut se fixer au domaine SH3 de c-Abl et inhiber ainsi la fonction tyrosine kinase de la protéine [30, 31]. L'activation de Abl par Bcr passe, dans un premier temps, par la levée de ces inhibitions.

Activation d'Abl

Contrairement au domaine SH3 qui exerce une régulation négative sur l'activité tyrosine kinase d'Abl, le domaine SH2 participe à l'acquisition de la fonction transformante [32]. Les domaines 1B et 2B codés par le premier exon de BCR sont essentiels à l'activation oncogénique d'Abl [23]. Le domaine 2B se lie au domaine SH2 d'Abl et contribue à la dérégulation de la fonction tyrosine kinase [33]. Cette fixation nécessite la phosphorylation de Bcr sur des résidus sérines ou thréonines et non sur une tyrosine. Le domaine 1B est à l'origine de réactions d'oligomérisation favorisant notamment la formation de tétramères Bcr-Abl. La présence, au sein du tétramère, de quatre sites de liaison à l'actine permet à l'oncoprotéine d'avoir une meilleure affinité pour le cytosquelette (figure 3) [19]. Ces polymères Bcr-Abl sont en grande partie fixés sur les filaments d'actine, ce qui leur confère une localisation cytoplasmique diffuse. L'action oncogénique de Bcr-Abl provient donc de l'activation de la fonction tyrosine kinase d'Abl au niveau cytoplasmique.

Les protéines substrats de Bcr-Abl

Dans les cellules Ph⁺, de nombreuses protéines apparaissent phosphorylées alors qu'elles ne le sont pas dans les cellules normales. La plupart de ces substrats potentiels possèdent les modules SH2 ou SH3 caractéristiques des protéines impliquées dans les signaux de transmission. Le premier substrat de Bcr-Abl est la protéine hybride elle-même ou la protéine Bcr selon un mécanisme que nous développerons plus loin. Des protéines impliquées dans la voie mitogénique de p21^{ras} peuvent être des substrats de Bcr-Abl. C'est le cas de Shc [34], des protéines associées à Ras-GAP (m/s n°5, vol. 8, p. 471) [35], de la phosphatase Syp [36]. Des protéines exprimées spécifiquement dans les

cellules hématopoïétiques ont également été trouvées phosphorylées dans les cellules Ph⁺. Il s'agit de la tyrosine kinase c-Fes [37] et du facteur Vav jouant un rôle d'échange GDP-GTP pour la p21^{ras} (m/s n°8-9, vol. 9, p. 998) [38]. Divers autres substrats potentiels de l'oncoprotéine ont été identifiés. On peut citer la protéine Crkl constamment phosphorylée dans les polynucléaires neutrophiles de malades atteints de LMC [39], la protéine Bap-1 (*Bcr-associated protein*) appartenant à la famille 14-3-3* et impliquée dans la prolifération cellulaire [40]. Le rôle de ces protéines phosphorylées est encore mal connu. Cependant, on peut supposer que leur phosphorylation est à l'origine de désordres importants au niveau du métabolisme cellulaire, notamment dans la transmission des signaux.

Modèles d'action de la protéine Bcr-Abl dans la LMC

De très nombreux travaux impliquant la protéine hybride Bcr-Abl dans diverses dérégulations moléculaires ont été publiés. Nous décrivons les modèles d'action les plus cohérents et les mieux documentés.

Bcr-Abl et activation de la p21^{ras}

La partie N-terminale du domaine 1 de Bcr permet des interactions protéine-protéine [24]. Cette aptitude est à l'origine de réactions d'oligomérisation aboutissant à la formation de tétramères Bcr-Abl et d'oligomères Bcr/Bcr-Abl, ce qui favorise l'autophosphorylation de Bcr-Abl ou la transphosphorylation de Bcr [41]. Ces réactions de phosphorylation, qu'elles aient lieu par un mécanisme ou par un autre, se font toujours sur la tyrosine en position 177 du domaine 2 de Bcr [42]. Cette phosphorylation est essentielle à l'activité transformante de Bcr-Abl et permet son association à des protéines, comme Grb-2, contenant les modules de signalisation SH2-SH3 [43].

* Famille de protéines isolées en 1967 par Moore et Perez qui procédaient à une analyse systématique des protéines du cerveau, d'où cette dénomination.

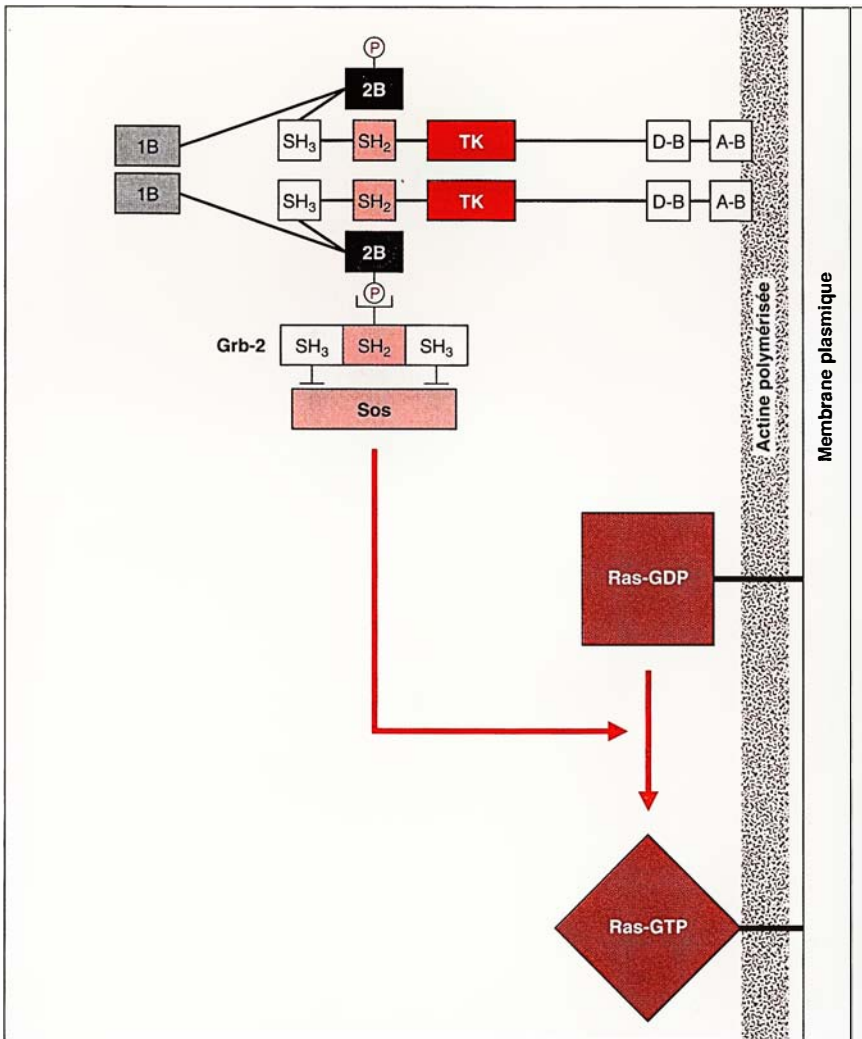


Figure 4. **Activation de Ras par Bcr-Abl.** Dans ce modèle, l'oncoprotéine joue le rôle d'un récepteur transmembranaire à fonction tyrosine kinase activée. Pour simplifier, seul un dimère Bcr-Abl est représenté sur le schéma. Grb-2: adaptateur à domaines SH₂ et SH₃; Sos (son of sevenless): facteur d'échange.

Les protéines Grb-2 et Sos jouent un rôle majeur dans l'activation de Ras par la voie des récepteurs à tyrosine kinase. Dans le cas de Bcr-Abl, il se forme un complexe Bcr-Abl/Grb-2/Sos dans lequel la tyrosine 177 phosphorylée de Bcr crée un lien physique entre Bcr-Abl et le domaine SH₂ de Grb-2. Les domaines SH₃ de Grb-2 interagissent alors avec Sos. Le complexe ainsi formé permet l'activation de Ras grâce à l'activité d'échange GDP/GTP de Sos (figure 4) (*m/s n° 10, vol. 8, p. 1097*) [42-44]. Il est connu que la voie de la p21^{RAS} est une voie de transmission du

signal mitogénique activé par les facteurs de croissance hématopoïétiques. Il a été montré que Bcr-Abl exerçait son pouvoir transformant principalement sur les cellules lymphoïdes ou myéloïdes. Dans ce modèle, l'oncoprotéine Bcr-Abl simule un récepteur à tyrosine kinase activé. Par l'intermédiaire d'adaptateurs comme les protéines Grb-2 ou Shc (*m/s n° 3, vol. 9, p. 334*) [14, 43], la protéine hybride est capable d'activer la p21^{RAS}. En se fondant sur ces hypothèses et en postulant que l'oncoprotéine est située au niveau des filaments d'actine sous-membra-

naire et non sur l'actine cytoplasmique, Bcr-Abl pourrait être à l'origine d'un signal mitogénique *via* la cascade des MAP kinases (*m/s n° 10, vol. 8, p. 1097*). Cependant, s'il a bien été observé dans les cellules Ph⁺ un taux élevé de Ras sous forme GTP, l'activation des MAP kinases n'a pas été démontrée. Une autre voie de signalisation issue de Ras-GTP semble donc devoir jouer un rôle dans l'apparition du phénotype transformé induit par Bcr-Abl, la coopération avec l'oncogène *c-MYC* pouvant également se révéler nécessaire [45].

Bcr-Abl et adhérence cellulaire

Au niveau de la moelle osseuse, les cellules hématopoïétiques en cours de différenciation ont besoin de facteurs de croissance solubles sécrétés par les cellules stromales. De plus, ces dernières exercent des régulations positives et négatives vis-à-vis des progéniteurs hématopoïétiques [46]. Les signaux positifs ne nécessitent pas de contact direct entre le progéniteur et son environnement. En revanche, la régulation négative de la prolifération se fait par interaction directe entre les deux types de cellules [47].

Nous avons déjà mentionné que v-Abl pouvait transformer un sous-type de cellules NIH/3T3 et que Bcr-Abl en était incapable. Des travaux récents ont fait le point sur l'action de la p210 sur ce sous-type de cellules [48]. L'oncoprotéine v-Abl induit à la fois une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance et une indépendance d'ancrage (phénotype transformé). Bcr-Abl confère à ces mêmes cellules un phénotype semi-transformé puisqu'on n'observe que la perte de la dépendance d'ancrage. Une protéine de fusion Gag-Bcr-Abl peut, quant à elle, induire ces deux caractères. Ainsi, la fixation à la membrane est associée à l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance (v-Abl, Gag-Bcr-Abl), et la fixation sur les filaments d'actine cytoplasmique à la perte de la dépendance d'ancrage (v-Abl, Gag-Bcr-Abl et Bcr-Abl). Dans la LMC, la perte de la dépendance d'ancrage empêche la régulation négative de la prolifération myéloïde. Le traitement par l'interféron α restaure l'expression par les cellules Ph⁺ de la molécule d'adhérence LFA-3

RÉFÉRENCES

34. Matsuguchi T, Salgia R, Hallek M, Eder M, Druker B, Ernst TJ, Griffin JD. Shc phosphorylation in myeloid cells is regulated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and steel factor and is constitutively increased by p210^{BCR/ABL}. *J Biol Chem* 1994; 269: 5016-21.
35. Skorski T, Kanakaraj P, Ku DH, Nieborska-Skorska M, Canaani E, Zon G, Perussia B, Calabretta B. Negative regulation of p120GAP GTPase promoting activity by p210^{bcrlabl}: implication for RAS-dependent Philadelphia chromosome positive cell growth. *J Exp Med* 1994; 179: 1855-65.
36. Tauchi T, Feng GS, Shen R, Song HY, Donner D, Pawson T, Broxmeyer HE. SH2-containing phosphotyrosine phosphatase Syp is a target of p210^{bcrlabl}: tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1994; 269: 15381-7.
37. Ernst TJ, Slattery KE, Griffin JD. p210^{bcrlabl} and p160^{vabl} induce an increase in the tyrosine phosphorylation of p93^{c-fes}. *J Biol Chem* 1994; 269: 5764-9.
38. Matsuguchi T, Inhorn RC, Carlesso, Xu G, Druker B, Griffin JD. Tyrosine phosphorylation of p95^{vav} in myeloid cells is regulated by GM-CSF, IL-3 and steel factor and is constitutively increased by p210^{BCR/ABL}. *EMBO J* 1995; 14: 257-65.
39. Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ. Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem* 1994; 269: 22925-8.
40. Reuther GW, Fu H, Cripe LD, Collier RJ, Pendergast AM. Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* 1994; 266: 129-33.
41. Liu J, Cambell M, Guo JQ, Lu D, Xian YM, Anderson BS, Arlinghaus RB. BCR-ABL tyrosine kinase is autophosphorylated or transphosphorylates p160^{BCR} on tyrosine predominantly within the first BCR exon. *Oncogene* 1993; 8: 101-9.
42. Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N, Batzer A, Rabun KM, Der CJ, Schlessinger J, Gishizky ML. Bcr-Abl-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 1993; 75: 175-85.
43. Chardin P. Protéines Ras et transmission des signaux mitogènes. *médecine/sciences* 1994; 10: 657-64.
44. Puil L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci PG, Arlinghaus R, Pawson T. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* 1994; 13: 764-73.
45. Afar DEH, Goga A, McLaughlin J, Witte ON, Sawyers CL. Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc. *Science* 1994; 264: 424-6.
46. Eaves AC, Cashman JD, Gaboury LA, Kalousek DK, Eaves CJ. Unregulated proliferation of primitive chronic myeloid leukemia progenitors in the presence of normal marrow adherent cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5306-10.
47. Verfaillie C. Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term *in vitro* hematopoiesis. *Blood* 1992; 79: 2821-6.
48. Renshaw MW, McWhirter JR, Wang JY. The human leukemia oncogene *bcrlabl* abrogates the anchorage requirement but not the growth factor requirement for proliferation. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1286-93.
49. Upadhyaya G, Guba SC, Sih SA, Feinberg AP, Talpaz M, Kantarjian HM, Deisseroth AB, Emerson SG. Interferon-alpha restores the deficient expression of the cytoadhesion molecule lymphocyte function antigen-3 by chronic myelogenous leukemia progenitor cells. *J Clin Invest* 1991; 88: 2131-6.
50. Dowding C, Guo AP, Osterholz J, Siczkowski M, Goldman J, Gordon M. Interferon- α overrides the deficient adhesion of chronic myeloid leukemia primitive progenitor cells to bone marrow stromal cells. *Blood* 1991; 78: 499-505.
51. Smetsers TFCM, Skorski T, van De Locht LTF, Wessels HMC, Pennings AHM, De Witte T, Calabretta B, Mensink EJBM. Antisense BCR-ABL oligonucleotides induce apoptosis in the Philadelphia chromosome-positive cell line BV173. *Leukemia* 1994; 8: 129-40.
52. Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkey SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1994; 83: 2038-44.
53. Kabarowski JHS, Allen PB, Wiedemann LM. A temperature sensitive p210^{BCR-ABL} mutant defines the primary consequences of BCR-ABL tyrosine kinase expression in growth factor dependant cells. *EMBO J* 1993; 13: 5887-95.
- [49]. De plus, il a été montré que ce traitement facilitait le contact entre la cellule Ph⁺ et les cellules du stroma médullaire, et restaurait donc l'inhibition de contact [50]. La protéine Bcr-Abl, présente dans les cellules Ph⁺, peut donc lever la dépendance d'ancrage vis-à-vis des cellules stromales de la moelle osseuse en supprimant un signal inhibiteur de croissance (figure 5). Le retour à un contact direct entre les différentes cellules permet un contrôle de la prolifération des cellules anormales.

Bcr-Abl et apoptose

Dans ce dernier modèle proposé, la protéine Bcr-Abl inhibe l'apoptose et prolonge donc la survie cellulaire. Ce modèle repose sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens ou d'un mutant de la p210 sensible à la température. Des lignées hématopoïétiques synthétisant Bcr-Abl ont été traitées par des oligonucléotides BCR-ABL antisens [51, 52]. Comparées à des cellules témoins, ces cellules ont une croissance inhibée et prennent un aspect apoptotique. L'oncogène BCR-ABL pourrait donc bloquer l'apoptose. Cette action peut avoir pour conséquence l'accumulation d'aberrations génétiques conduisant à la phase d'accélération de la LMC. L'utilisation d'un mutant BCR-ABL thermosensible a permis de préciser l'effet précoce de la production de Bcr-Abl dans les cellules Ba/F3 dont la croissance dépend normalement d'IL3 [53]. En absence du facteur de croissance on observe, dans un premier temps, la survie des cellules transfectées, puis, dans un deuxième temps, la prolifération de ces cellules. Aucune activation de la voie des MAP kinases n'est alors observée. Dans ce modèle, Bcr-Abl induit la suppression de l'apoptose, peut-être grâce à la synthèse endogène de facteurs de croissance par les cellules Ph⁺, ce qui prolongerait leur survie.

Conclusions

L'oncoprotéine Bcr-Abl joue un rôle essentiel dans le déclenchement de la LMC. Si certains mécanismes moléculaires conduisant à la LMC demeurent obscurs, d'autres, comme l'activation de la p21^{RAS} ou la perte de la dépendance vis-à-vis de l'ancra-

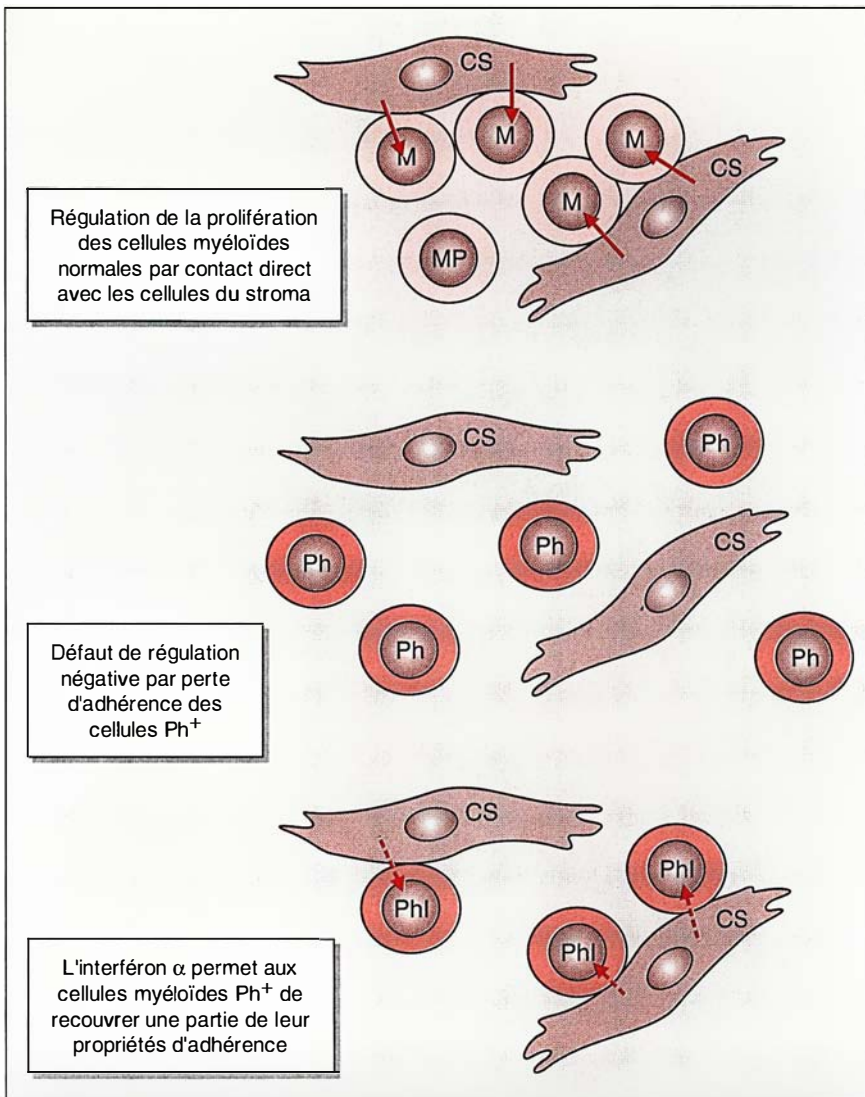


Figure 5. **Bcr-Abl et adhérence cellulaire.** Dans la moelle normale, les cellules du stroma exercent une régulation négative sur la prolifération des cellules hématopoïétiques. Les cellules Ph⁺ échappent à cette régulation par perte de la dépendance d'ancrage. L'interféron α permet la réapparition de la molécule LFA-3 sur les cellules Ph⁺ (contenant le chromosome Philadelphie). Elles recouvrent en partie leurs propriétés d'adhérence sur les cellules du stroma. CS: cellule stromale, M: progéniteur myéloïde normal, MP: cellule myéloïde en phase de prolifération, Ph: cellules myéloïdes exprimant la p210^{Bcr-Abl}, PhI: cellules myéloïdes exprimant la p210^{Bcr-Abl} et traitées par l'interféron α .

Tableau I	
DIFFÉRENTS MODÈLES D'ACTIVATION ONCOGÉNIQUE RELAYÉS PAR Bcr-Abl	
Modèle proposé	Conséquences attendues
Activation de la p21 ^{RAS}	Activation de la voie mitogénique
Perte de la dépendance d'ancrage des cellules Ph ⁺	Défaut de régulation négative au niveau de l'interaction cellule hématopoïétique-stroma médullaire
Effet anti-apoptotique de la protéine Bcr-Abl	Survie des cellules Ph ⁺ en l'absence de facteurs de croissance
Perte des fonctions normales des protéines Bcr et Abl	Dérégulation des voies métaboliques impliquant Bcr et Abl
Protéine Abl-Bcr ?	?

ge, sont bien démontrés (Tableau I). Les modèles proposés peuvent parfois paraître contradictoires. L'action oncogénique de Bcr-Abl n'est pas simple et un mécanisme unique ne suffit pas pour tout expliquer. Certaines données sont cependant fondamentales. Les domaines fonctionnels 1B et 2B de Bcr, SH2, tyrosine-kinase et A-B d'Abl, sont indispensables à l'effet transformant, de même que l'interaction avec la p21^{RAS}. Les différents modèles proposés sont sans doute les pièces d'un même puzzle et agissent suivant un contexte cellulaire encore mal défini. D'autres mécanismes que ceux décrits plus haut peuvent faciliter l'expansion des cellules Ph⁺ (Tableau I). Les protéines Abl et Bcr normales, du fait de la dérégulation due à Bcr-

Abl, pourraient ne plus avoir leurs fonctions physiologiques normales. Enfin il ne faut pas oublier l'existence de *ABL-BCR*, le gène réciproque de *BCR-ABL*. On ne sait pas s'il donne naissance à une protéine. Si tel est le cas, cette dernière pourrait participer à la transformation cellulaire.

Quel que soit le mécanisme en cause dans le déclenchement moléculaire de la LMC, les deux éléments de la protéine chimérique Bcr-Abl ont un rôle majeur. Il est établi que des deux activités kinasiques portées par Bcr-Abl, c'est l'activité tyrosine kinase d'Abl qui est primordiale dans le processus de transformation. Cependant, c'est la partie Bcr de Bcr-Abl qui favorise la fixation à l'actine du cytosquelette, qui active la fonction tyrosine kinase d'Abl et qui assure le lien physique entre Bcr-Abl et Grb-2. Si le rôle fondamental d'Abl dans la dérégulation cellulaire ne peut être nié, Bcr contribue largement à ce phénomène.

Les progrès réalisés dans la meilleure connaissance des voies métaboliques altérées devraient déboucher dans les années à venir sur une compréhension globale de l'implication de Bcr-Abl dans la LMC et, peut-être, à la mise au point de thérapeutiques plus spécifiques de la maladie, comme cela a déjà été le cas avec l'interféron α . ■

Summary

Molecular deregulations mediated by Bcr-Abl in chronic myeloid leukemia

Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder resulting in an accumulation of myeloid cells and their progenitors. CML is the result of a reciprocal translocation between the long arms of chromosomes 9 and 22. The *c-ABL* proto-oncogene (chromosome 9) is translocated to the major breakpoint cluster region within the *BCR* gene on chromosome 22 (Philadelphia chromosome or Ph). The *BCR-ABL* fusion gene encodes a 210 kDa protein with enhanced tyrosine kinase activity. *In vitro* and *in vivo* experiments show evidences for a causal relationship between the *BCR-ABL* oncogene and leukemia. The normal Bcr protein may be at the intersection of signal transduction pathways and Abl kinase is known to have a function in the regulation of cell growth. Several substrates of Bcr-Abl have been identified, including Shc, Ras-GAP, Syp, Fes, Vav, Crkl, Bap-1... The mechanisms leading to the expansion of cells expressing the chimeric protein are not completely understood. Howe-

ver some consistent and well studied models can be described. Bcr-Abl is involved in the stimulation of p21^{ras} through the Grb-2-Sos complex. The Ras proteins in their active state have a major importance in the oncogenic potential of Bcr-Abl. The oncoprotein abrogates the anchorage requirement between myeloid cells and stromal cells. Then, the Ph⁺ cells escape to the negative regulation induced by cell-cell interaction. Moreover, a primary effect of Bcr-Abl expression is to prolong cell survival by suppression of apoptosis. These models are not sufficient to give a complete explanation of the molecular deregulation mediated by Bcr-Abl. However, they increase our knowledge of the implication of the oncoprotein in the pathogenesis of CML. Further studies will undoubtedly identify new disregulated pathways involved in the transformed phenotype. These progresses may lead to the development of a suitable therapy.