

Données récentes sur les mécanismes moléculaires de la translocation chromosomique *t(14;18)(q21;q32)* activant le gène *BCL2*

Le gène *BCL2*, qui joue un rôle essentiel dans certains processus de mort cellulaire programmée ou apoptose, est activé par une translocation chromosomique *t(14;18)* dans une grande majorité de lymphomes folliculaires humains. Pour expliquer la genèse de cette translocation, on a invoqué des erreurs du complexe recombinaise, le responsable des recombinaisons somatiques des gènes d'immunoglobulines et des gènes des récepteurs de l'antigène (gènes *IG* et *TCR*). A la lumière de données récentes – présence de séquences de recombinaison de type χ proches des points de cassure et identification de protéines s'y liant – on peut proposer des modèles plus élaborés pour rendre compte du mécanisme de recombinaison illégitime de la translocation.

Christian-Jacques
Larsen
Paule Séité
Roland Berger

Le gène *BCL2* a été découvert par l'étude de la translocation chromosomique *t(14;18)*, qui caractérise les lymphomes non Hodgkiniens (LNH), particulièrement les lymphomes folliculaires, mais aussi les lymphomes diffus*. Les résultats les plus récents sur la biologie de ce gène sont singulièrement importants, tant du point de vue de sa fonction physiologique que de sa participation à des processus malins. Il est désormais avéré que *BCL2* contrôle la mort cellulaire programmée, (ou apoptose) de certains tissus à renouvellement permanent, en maintenant la viabilité cellulaire. En fait, *BCL2* est le prototype d'une famille de gènes très conservés au

cours de l'évolution (*Ced9*, le gène homologue de *BCL2*, vient d'être cloné chez le nématode *Caenorhabditis elegans* [2, 3]) qui contrôlent positivement ou négativement l'apoptose cellulaire.

* Très schématiquement, on distingue deux classes de lymphomes non Hodgkiniens de type B [1]. La classe I inclut des lymphomes des organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques ou la rate, le sang, et, à des stades avancés, la moelle osseuse) qui sont issus de cellules ayant achevé un remaniement de type V(D)J dans la moelle osseuse. La majorité des cellules tumorales sont dans la phase G_0 du cycle cellulaire. Ce fait explique l'évolution lente de ces tumeurs et leur caractère chronique affirmé. La classe II est, au contraire, constituée de tumeurs de grade élevé où les cellules prolifèrent rapidement. Les lymphomes de Burkitt et les lymphomes malins associés au *SIDA* sont rangés dans cette catégorie.

ADRESSE

C.J. Larsen : directeur de recherche au Cnrs.
P. Séité : docteur ès sciences. R. Berger : directeur de recherche au Cnrs, directeur de l'unité Inserm U. 301, Institut de génétique moléculaire, 27, rue Juliette-Dodu, 75010, Paris, France.

Par ailleurs, la fonction anti-apoptotique de *BCL2* explique son rôle probable dans la lymphomatosité : les cellules lymphoïdes B porteuses de la translocation t(14;18) expriment constitutivement le gène et échappent ainsi à l'apoptose qui, dans les conditions normales de l'ontogénèse B, élimine les cellules dans lesquelles les recombinaisons somatiques des gènes d'immunoglobulines (*IG*) n'ont pas abouti à des gènes fonctionnels (sur l'ontogénèse, voir l'ouvrage de Roitt *et al.* [4]). Les cellules ainsi protégées constituent un compartiment en expansion lente mais continue qui devient le siège d'événements oncogéniques « vrais », permettant l'émergence d'un clone malin en son sein.

Comme l'ensemble des translocations chromosomiques des lymphoproliférations malignes, la t(14;18) apparaît dans des précurseurs lymphoïdes pro-B ou pré-B au moment où les gènes *IG* subissent les étapes de recombinaison somatique. Cette simultanéité d'événements s'accorde avec l'hypothèse qu'une perturbation des mécanismes de recombinaison somatique des gènes *IG* est responsable de la translocation. Il était donc logique de rechercher au voisinage des points de cassure des deux partenaires chromosomiques de la translocation, des éléments structuraux remarquables participant normalement au processus de la recombinaison somatique. Dès 1985, Croce et ses collaborateurs ont défini un modèle explicatif fondé sur la présence de séquences-consensus de reconnaissance par le complexe recombinaison, au voisinage des points de cassures sur le 14 et le 18 [5]. Il est apparu assez vite que ce modèle négligeait certains faits dérivés de l'analyse de nombreux cas individuels de t(14;18) et ne rendait donc pas compte de façon satisfaisante de la genèse de ces translocations [6]. D'autres modèles ont été proposés qui prennent en compte ces données non considérées par le modèle de Croce *et al.* Plusieurs travaux, dont certains très récents, ont montré qu'il existe des protéines nucléaires liant des séquences spécifiques d'ADN et intervenant très probablement dans l'une des étapes de la recombinaison des gènes *IG* et *TCR*. Nous nous proposons de faire le point sur la situation de la t(14;18) et sur les générali-

sations à l'ensemble des translocations intéressant principalement les gènes de la superfamille des immunoglobulines (*IG* et *TCR*).

Les caractéristiques structurales de la translocation t(14;18)

Compte tenu de la concentration des points de cassure dans la région 3' du gène *BCL2* sur le chromosome 18 et dans la région J_H et parfois D_H sur le chromosome 14, et de l'orientation télomère-centromère de ces deux gènes sur leurs chromosomes respectifs, les dérivés $14q^+$ et $18q^-$ engendrés par la translocation ont une structure présentée sur la figure 1. Selon que le point de cassure intéresse *mbr* ou *mcr* (voir ci-après), la majeure partie, voire la totalité, de *BCL2* quitte le chromosome 18 pour être juxtaposée à la partie 3' du gène *IGH* composée d'un ou plusieurs segments J_H (selon la position du point de cassure), de la région de commutation (*switch*), puis la région constante (en fait, dans une proportion importante des translocations, on a récemment décrit une délétion interstitielle ciblée allant de la région de commutation S_{μ} à l'extrémité 5' de la région constante C_{ϵ} [7]). Le dérivé $18q^-$ reçoit en retour la portion 5' du gène *IGH*.

Concentration des points de cassure sur les chromosomes 18 et 14

Sur le chromosome 18, une grande majorité des points de cassure (60-70%) est concentrée dans une région de 150 paires de bases (pb) située dans la partie 3' non traduite de l'exon 3 du gène *BCL2* (figure 1A). Cette région a été nommée *mbr* (*major breakpoint region*, [5, 8, 9]). Un autre site d'accumulation de points de cassure (20 à 30%) couvrant une région plus large (environ 4,0 kb) a été trouvé à plus de 20 kb en aval de l'exon 3, et désigné *mcr* pour *minor cluster region* [10].

Sur le chromosome 14, les points de cassure sont principalement localisés en amont d'un segment J_{H1} (surtout J_{H6} , [11]) et peu fréquemment en 5' d'un segment D_H , lui-même juxtaposé à un segment J_H .

RÉFÉRENCES

- Potter M. Pathogenetic mechanisms in B-cell non-Hodgkin's lymphomas in humans. *Cancer Res* 1992 ; 52 (suppl) : 5222s-8s.
- Hentgarner MO, Robert Horvitz R. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 1994 ; 76 : 665-76.
- Labouesse M. *C. elegans*, les promesses d'un petit animal intelligent : «small is beautiful». *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 337-41.
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK. In: *Immunologie* 3^e ed. Bruxelles : De Boeck-Wesmael SA, 1994.
- Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosomal translocation involved in B-cell neoplasms results from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985 ; 229 : 963-7.
- Tycko B, Sklar J. Chromosomal translocations in lymphoid neoplasia: a reappraisal of the recombinaison model. *Cancer Cells* 1990 ; 2 : 1-8.
- Zelenetz AD, Cleary ML, Levy R. A submicroscopic interstitial deletion of chromosome 14 frequently occurs adjacent to the t(14;18) translocation breakpoint in human follicular lymphoma. *Genes Chrom Cancer* 1992 ; 6 : 140-50.
- Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ; 82 : 7439-43.
- Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride DW, Epstein AL, Korsmeyer SJ. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around J_H on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985 ; 41 : 889-906.
- Cleary ML, Galili N, Sklar J. Detection of a second t(14;18) breakpoint region cluster in human follicular lymphomas. *J Exp Med* 1987 ; 164 : 315-20.

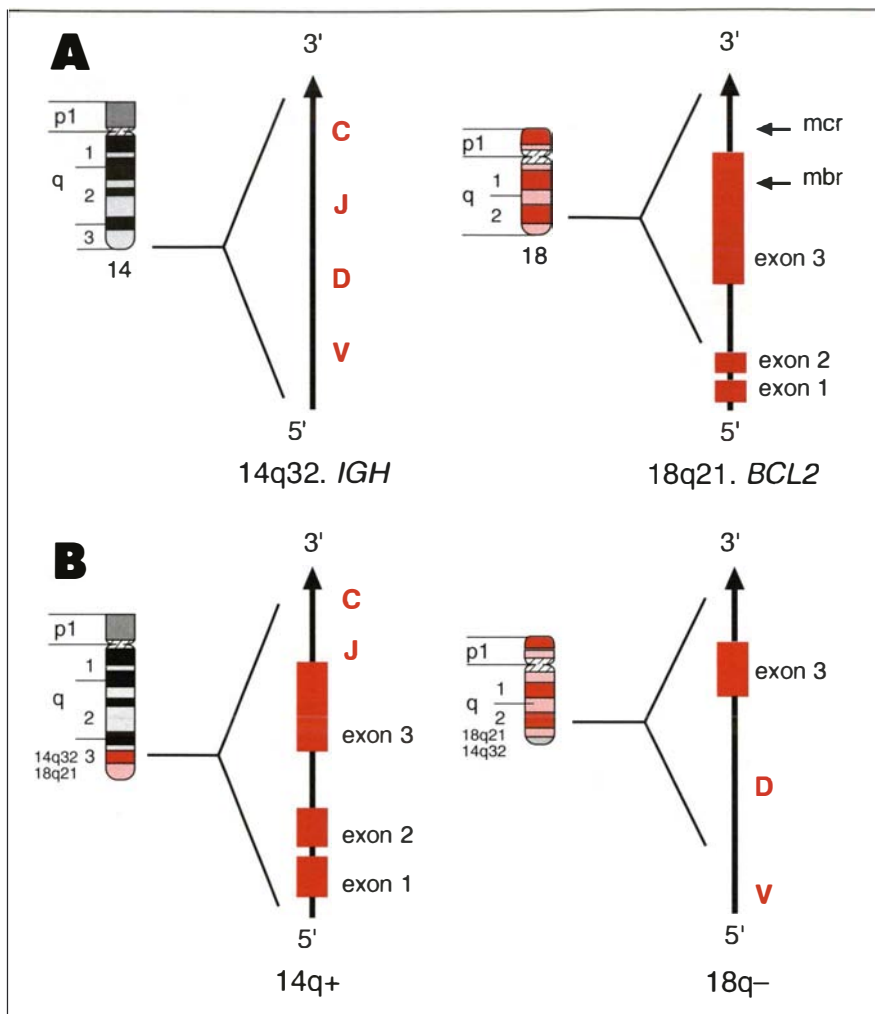


Figure 1. **Schéma de la translocation t(14;18).** A : Les gènes IGH et BCL2 sont représentés sur leurs chromosomes respectifs 14 et 18 dans leur orientation normale. Les deux régions principales où s'accumulent les points de cassure sur le chromosome 18, mbr et mcr, sont indiquées. B : Chromosomes recombinés 14q⁺ et 18q⁻ avec les régions fusionnées sur chaque chromosome.

Structure des dérivés 14q⁺ et 18q⁻

La structure du dérivé 14q⁺ 5'-mbr-J_H-3' est tout à fait similaire à celle d'un joint codant DJ issu de la recombinaison somatique d'un gène IGH. Entre les séquences nucléotidiques originaires des deux partenaires 14 et 18, il existe un court segment de nucléotides non parentaux désignés nucléotides N. Quant au chromosome 18q⁻, il n'a pas la structure réciproque attendue 5'-J_H-mbr-3', mais une structure du type 5'-DH-mbr-3', ce qui implique qu'il y a eu élimination des quelques 40 kb séparant la région J_H de la région D_H.

Les points de cassure dans le locus IGH sont localisés à proximité de séquences de recombinaison V(D)J.

En raison de leur proximité avec un segment J_H ou D_H, les points de cassure du 14 sont dans le proche voisinage de séquences consensus de recombinaison V(D)J ou séquences 7-9: une séquence heptamère CAC(A/T)GTG suivie d'une séquence non conservée de 12 ou 23 nucléotides, puis d'une séquence nonamère de type ACAAAAACC ou analogue (sur les séquences 7-9 voir par exemple [4, 11]). En revanche, sur le

chromosome 18, il n'existe pas d'authentique séquence 7-9 dans la région mbr, mais seulement deux pseudo-séquences 7-9 inversées auprès desquelles seuls quelques rares points de cassure ont été localisés. Aucune séquence 7-9 n'a été retrouvée dans la région mcr.

De façon très frappante, la plus grande partie des points de cassure sur mbr est concentrée en trois amas ou *clusters* séparés l'un de l'autre par une cinquantaine de nucléotides (figure 2A). Le *cluster* 1, le plus en amont, est adjacent à une séquence en tandem 5'-CCTCCTGCCCTCCTC-3', très similaire à la séquence χ (Chi) des procaryotes (CCACCAGC). Chez les procaryotes, les séquences χ sont impliquées dans des recombinaisons [13]. Les *clusters* 2 et 3 sont flanqués de séquences χ -like (homologie = 5/8 nucléotides). Il est intéressant de noter que le brin complémentaire de la séquence CCTCCTGC est 5'-GCAGGAGG-3' qui constitue le *core* du minisatellite décrit par Jeffreys *et al.* en 1985 [14].

Des séquences χ ou « χ -like » ont également été retrouvées dans le voisinage de segments D_H, plus précisément la famille D_{XP}, et des segments J_H (pour les détails, on se reportera à [11]).

Ces deux caractéristiques remarquables – concentration des points de cassures, proximité immédiate de séquences de recombinaison de type χ ou minisatellite – suggèrent immédiatement que ces dernières jouent un rôle important dans la genèse des translocations.

Rappel du modèle de Croce et Tsujimoto. Imperfections de ce modèle

En examinant la séquence du 14q⁺ des premières analyses moléculaires de t(14;18), Tsujimoto et Croce ont identifié deux séquences 7-9 inversées au voisinage des points de cassure (figure 2A). S'il en est ainsi, la portion de mbr contenant ce couple peut être assimilée à un pseudo-segment D. D'où la proposition que la translocation résulterait d'une erreur du système recombinaise qui catalyse l'assemblage V(D)J. Pour expliquer que la recombinaise puisse accéder à ces séquences, on a postulé un chan-

RÉFÉRENCES

11. Wyatt RT, Rudders RA, Zelenetz A, Delellis RA, Krontiris TG. *BCL2* oncogene translocation is mediated by a χ -like consensus. *J Exp Med* 1993 ; 175 : 1575-88.
12. Sigaux F. Physiologie et pathologie de la recombinaison V(D)J. *médecine* 1994 ; 10 : 995-1005.
13. Dunderdale H, West SC. Recombination genes and proteins. In: *Curr Op Genet Dev* 1994 ; 4 : 221-8.
14. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hyper-variable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 1985 ; 314 : 67-73.
15. Yancopoulos G, Alt F. Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* 1985 ; 40 : 271-81.
16. Schlissel MS, Baltimore D. Activation of immunoglobulin κ gene rearrangements correlates with induction of germline κ gene transcription. *Cell* 1989 ; 58 : 1001-7.
17. Hsieh CL, McCloskey RP, Lieber MR. V(D)J recombination on minichromosomes is not affected by transcription. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 15614-9.
18. Jaeger U, Purtscher B, Delle Karth G, Knapp S, Mannhalter C, Lechner K. Mechanism of the chromosomal translocation t(14;18) in lymphoma : detection of a 45-Kd breakpoint binding protein. *Blood* 1993 ; 81 : 1833-40.
19. Knapp S, Delle Karth GD, Friedl J, Purtscher B, Mitterbauer G, Dömer PH, Jaeger U. Guanine-rich (GGNNGG) elements at chromosomal breakpoints interact with a loop-forming, single-stranded DNA-binding protein. *Oncogene* 1994 ; 9 : 1501-5.
20. Ngan BY., Nourse J, Cleary ML. Detection of chromosomal translocation t(14;18) within the minor cluster region of *BCL-2* by polymerase chain reaction and direct genomic sequencing of the enzymatically amplified DNA in follicular lymphomas. *Blood* 1989 ; 73 : 1759-62.
21. Hartl P, Lipp M. Generation of a variant t(2;8) translocation of Burkitt's lymphoma by site specific recombination via the κ light-chain joining signals. *Mol Cell Biol* 1987 ; 7 : 2037-45.

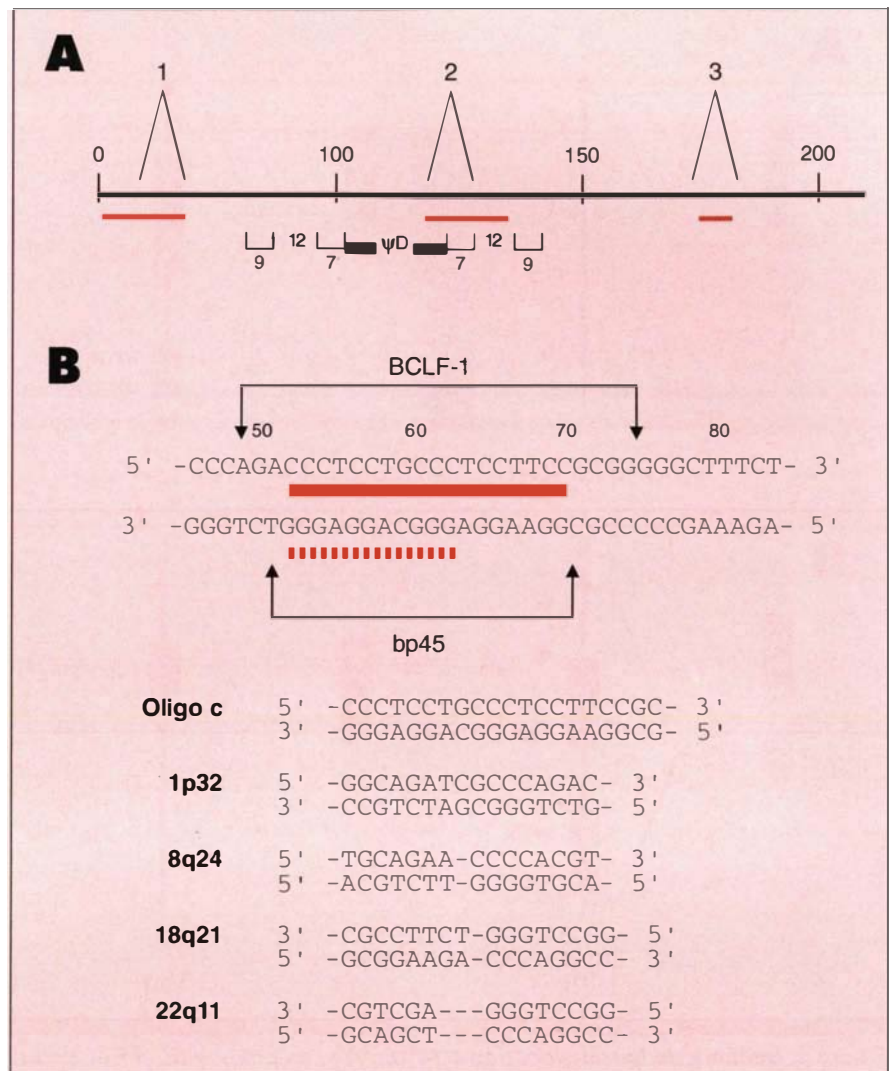


Figure 2. **Organisation de la région mbr. A : Structure générale.** On a indiqué les trois clusters où se positionne la majorité des points de cassure. On a indiqué les trois clusters (numérotés 1, 2, 3). La numérotation arbitraire des nucléotides recouvre la totalité de la région membranaire. La présence des deux séquences consensus 7-9 inversées encadrant un pseudo-segment D est signalée. Les régions χ ou χ -like sont soulignées en rouge. **B : Séquence de la portion initiale de mbr correspondant au cluster 1 des points de cassure.** La séquence χ en tandem est délimitée par un trait rouge plein et la séquence GGGAGG, par un pointillé rouge. Sont délimités les sites de liaison des protéines bp45 et BCLF-1 qui lient spécifiquement les séquences χ ou χ -like. La séquence de l'oligonucléotide c qui est spécifiquement retardé sur gel par la protéine bp45 est indiquée [18]. Sont également présentées les séquences localisées au niveau des points de cassure de t(1;14), t(8;14) [30] et t(18;22) [28]. A noter que les séquences sont inversées par rapport à mbr et que les séquences 18q21 et 22q11 possèdent deux doubles GG séparés par 3 nucléotides et sont donc susceptibles d'être reconnues par la protéine C1, protéine proche de bp45 s'associant à des séquences simple brin.

gement de la conformation locale de la chromatine, par exemple en raison du statut transcriptionnel actif des gènes. De fait, des travaux ont montré que la recombinaison des gènes *IG* est précédée par une expression de transcrits stériles [15, 16]. Mais cette expression pourrait également être concomitante de la recombinaison. Selon d'autres auteurs, la transcription n'est pas nécessaire à la réaction d'assemblage [17]. Quant à *BCL2*, il est effectivement exprimé dans des cellules où se produit l'assemblage V(D)J.

Pour que le modèle acquière une valeur générale, on devrait retrouver des séquences 7-9 au voisinage des points de cassure sur les deux parte-

naires, condition qui n'est pas remplie. Par ailleurs, on a vu plus haut que le joint réciproque prévu par ce modèle n'est pas du type 5'-J_H-mbr-3', mais 5'-D_H-mbr-3'. Il semble donc clair qu'un dysfonctionnement de l'assemblage V(D)J n'explique pas toutes les caractéristiques observées dans les chromosomes dérivés de la translocation.

Importance des séquences χ

La présence des séquences χ ainsi que la disposition des points de cassure au voisinage de segments D et J ont conduit le groupe de Krontiris *et al.* à proposer un autre modèle [11].

Selon ces auteurs, la première étape de la translocation consisterait en une reconnaissance des séquences χ de la région mbr et de la région D_H, précédant une recombinaison entre ces séquences. Cette reconnaissance pourrait prendre la forme d'un appariement direct des séquences χ ou, plus vraisemblablement, être relayée par une protéine liant spécifiquement les séquences χ . En conséquence, les portions correspondantes des chromosomes 14 et 18 seraient mises en contact et clivées pour engendrer les intermédiaires structuraux 14q⁺ et 18q⁻. Pour acquérir leur structure définitive, ces deux intermédiaires doivent subir de nouveaux remaniements mettant en jeu les séquences χ

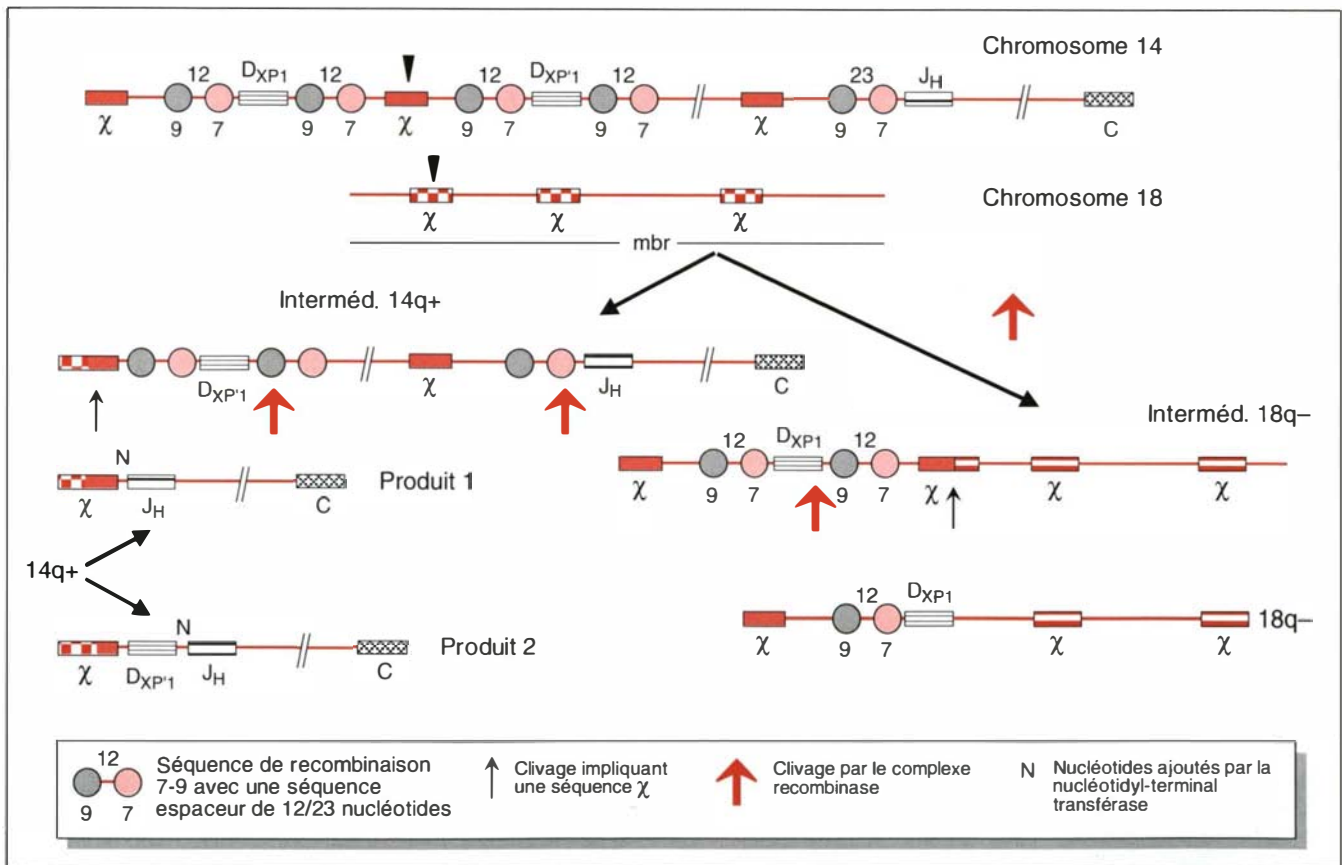


Figure 3. Schéma du mécanisme de la translocation selon Wyatt, et al. [11] (modèle de Krontiris, et al. 1992). La première étape est un remaniement entre la région D_H (ici le segment D_{XP1}) et mbr par l'intermédiaire d'une protéine reconnaissant les séquences χ sur les chromosomes 14 et 18. Le cluster 1 serait favorisé en raison de son analogie plus élevée (présence de séquences χ en tandem). Les pointes de flèches indiquent le site de cassure sur chaque chromosome. Le clivage est suivi de la recombinaison illégitime qui engendre les intermédiaires 14q⁺ et 18q⁻. Ces intermédiaires subissent à leur tour des remaniements qui mettent à contribution la protéine liant les séquences χ et la recombinaison. L'intermédiaire 14q⁺ engendre deux produits finaux (joints codants) : le produit 1, le plus fréquent, et le produit 2 beaucoup plus rare. Le produit final de l'intermédiaire 18q⁻ résulte également de remaniements au voisinage d'une séquence χ et d'une séquence 7-9. La dernière étape est l'addition de nucléotides supplémentaires par l'enzyme nucléotidyl terminal transférase.

RÉFÉRENCES

22. Chang KS, Lu J, Wang G, Trujillo JM, Estey E, Cork A, Chu DT, Freireich EJ, Stass SA. The t(15;17) breakpoint in acute promyelocytic leukemia clusters within two different sites of the *MYL* gene : targets for the detection of minimal residual disease by the polymerase chain reaction. *Blood* 1992 ; 79 : 554-8.
23. Alcalay M, Zangrilli D, Pandolfi PP, Longo L, Mencarelli A, Giacomucci A, Rocchi M, Biondi A, Rambaldi A, Lo Coco F, Diverio D, Donti E, Grignani F, Pelicci PG. Translocation of acute promyelocytic leukemia lies within the retinoic acid receptor α locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 1977-81.
24. Domer PH, Fakharzadeh SS, Chen CS, Jockel J, Johansen J, Silverman GA, Kersey JH, Korsmeyer SJ. Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 7884-8.
25. Chen SJ, Chen Z, d'Auriol L, Le Coniat M, Grausz D, Berger R. Ph1+bcr- acute leukemias : implication of Alu sequences in a chromosomal translocation occurring in the new cluster region within the *BCR* gene. *Oncogene* 1989 ; 4 : 195-202.
26. Kasai M, Aoki K, Matsuo Y, Minowada J, Maziarz RT, Strominger JL. Recombination hotspot associated factors specifically recognize novel target sequences at the site of interchromosomal rearrangements in T-ALL patients with t(8;14)(q24;q11) and t(1;14)(p32;q11). *Int Immunol* 1994 (sous presse).
27. Aoki K, Nakahara K, Ikegawa C, Seto M, Takahashi T, Minowada J, Strominger JL, Kasai M. Nuclear proteins binding to a novel target sequence within the recombinant hotspot regions of *BCL-2* and the immunoglobulin DH gene family. *Oncogene* 1994 ; 9 : 1109-15.
28. Séité P, Leroux D, Hillion J, Monteil M, Berger R, Mathieu-Mahul D, Larsen CJ. Molecular analysis of a variant 18;22 translocation in a case of lymphocytic lymphoma. *Genes Chrom Cancer* 1993 ; 6 : 39-44.
29. Larsen CJ, Meccuci C, Leroux D. t(2;18) and t(18;22) variant chromosomal translocations and *BCL2* gene rearrangements in human malignant lymphomas. *Nouv Rev Fr Hematol* 1990 ; 32 : 401-3.
30. Kasai M, Maziarz RT, Aoki K, MacIntyre E, Strominger JL. Molecular involvement of the pvt-1 locus in a γ/δ T-cell leukemia bearing a variant translocation t(8;14)(q24;q11). *Mol Cell Biol* 1992 ; 12 : 4751-8.

et des séquences 7-9. L'intermédiaire 14q⁺ pourrait ainsi être le siège de deux types d'événements. Ou bien deux clivages, l'un au niveau de la séquence χ (relayé par la protéine liant cette séquence ou une autre endonucléase), l'autre au niveau de la séquence 7-9 précédant un segment J_H (relayé par la recombinase), conduiraient à la création du produit I qui est le joint codant le plus fréquemment observé dans les t(14;18), ou bien, un assemblage V(D)J classique relayé par la recombinase éliminerait les portions comprises entre les segments DH et JH, conduisant au produit 2 plus rarement observé. De son côté, l'intermédiaire 18q⁻ subirait également des remaniements mettant en jeu les séquences χ et les séquences 7-9. Au cours des remaniements impliquant la recombinase seraient ajoutés les nucléotides N entre les séquences parentales des deux dérivés de la translocation (voir figure 3 et la figure 9 de [11]).

L'avantage d'un tel modèle est double : d'une part, il prend en compte la totalité des caractéristiques structurales des chromosomes dérivés engendrés par la translocation. D'autre part, il permet certaines prédictions. C'est ainsi qu'il prévoit explicitement l'existence d'une protéine reconnaissant les séquences χ . Il paraît raisonnable de postuler que cette protéine est une composante du complexe recombinase. Enfin, la présence de ces séquences χ est un argument important en faveur de l'intervention de facteurs de recombinaison équivalents à Rec A-Rec BCD caractérisés chez *Escherichia coli*. On sait que l'activité de ces facteurs requiert une séquence χ (voir la revue de Dunderdale et West [13]).

Protéines liant la région mbr

Au cours des derniers mois, plusieurs travaux ont été publiés qui rapportent l'identification de protéines nucléaires liant spécifiquement des séquences χ ou apparentées ou leurs brins complémentaires correspondant à la séquence minisatellite.

La protéine bp45

En examinant la séquence riche en purines/pyrimidines de la région

mbr, un groupe autrichien a identifié, par la technique dite de retardement sur gel, une protéine nucléaire de 45 kD (bp45), qui s'associe spécifiquement à un oligonucléotide double brin de 20 nt (oligo c dans la figure 2B [18]). En fait, cette séquence correspond à la région de mbr où est localisé le cluster 1 des points de casure. Cette association bp45/oligo c est spécifique car elle est abolie par des oligonucléotides froids contenant la séquence, mais pas par l'oligo dC-dG. De façon notable, la région mcr contient aussi une séquence homologue à celle de l'oligo c, et qui entre en compétition avec lui pour la formation du complexe bp45/oligo c. Il convient aussi de souligner l'existence de séquences homologues dans les régions D_H et J_H du locus *IGH* qui réagissent avec la protéine bp45 (une séquence homologue située à 100 bp en aval de J_{H6} se comporte comme un compétiteur d'oligo c).

Pour mieux définir les nucléotides nécessaires et suffisants pour son interaction avec bp45, des substitutions ont été introduites dans oligo c. Les résultats montrent sans ambiguïté que toute mutation perturbant la séquence répétée GGAGGG abolit l'association.

La protéine liant des doublets G

Dans un travail plus récent, le même groupe vient de rapporter l'existence dans des extraits nucléaires d'une lignée cellulaire pré-B (lignée REH) de deux facteurs protéiques C1 et C2 s'associant à un oligonucléotide simple brin couvrant la partie 5' terminale de mbr : 5'-GCGGAA-GAGGGCAGGAGGG-3'. C1 se lie spécifiquement à l'élément monobrins 5'-GGGAGG-3' dans cette orientation ou dans l'orientation inverse [19]. La liaison est totalement abolie par un excès d'oligo-dG₂₀ froid. Ces deux résultats sont intéressants car ils suggèrent que l'affinité de la protéine requiert la présence de deux résidus guanine à chaque extrémité du fragment d'ADN. Cette hypothèse a été testée par des constructions où deux doublets de G encadrent un segment de taille variable et de séquence indéterminée (du type GG-Xn-GG). Il apparaît que l'affinité de la protéine est conservée pour une

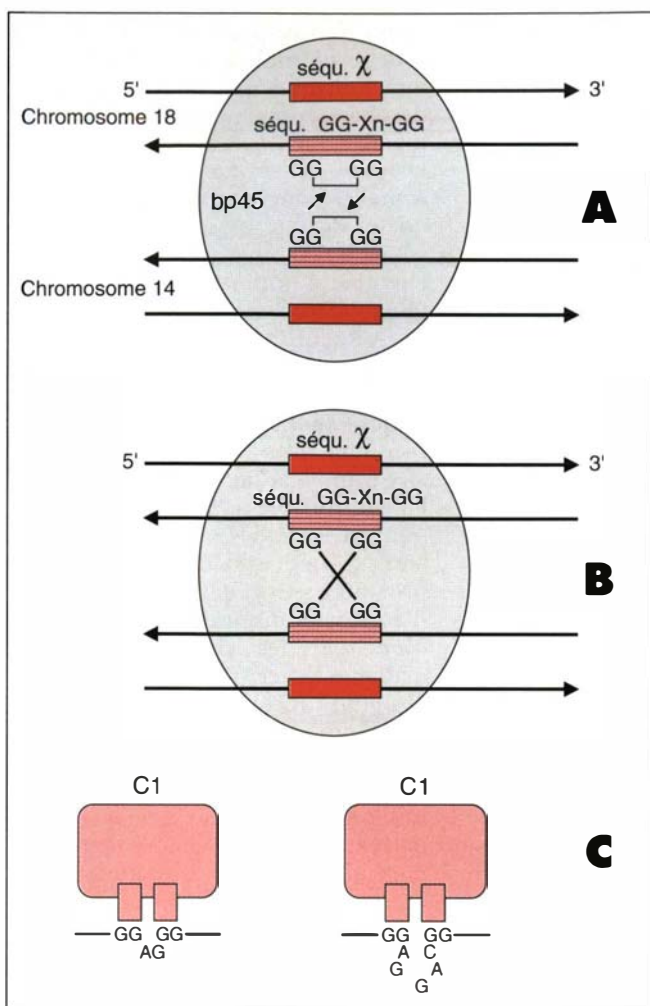


Figure 4. **Intervention possible des protéines bp45 et C1 dans la première étape de la t(14;18).** En A et B, on a représenté une seule molécule bp45 figurée par un ovale grisé, mais on peut concevoir que deux molécules s'associent ensemble après avoir lié une séquence χ . En C, la protéine C1, que l'on n'a pas superposée en A pour des raisons de clarté, lie la séquence GGGAGG. On a schématisé l'interaction avec le dinucléotide GA ou le pentanucléotide AGGAGC entre deux doublets GG (contenu dans la séquence χ -like en tandem). Cette association crée une boucle monobrin qui peut être éliminée par clivage.

valeur de n comprise entre 2 à 46. L'hypothèse que formulent Jaeger *et al.*, est celle d'une protéine possédant deux sites de reconnaissance pour le doublet GG (figure 4). Après liaison avec la protéine, la portion d'ADN entre les deux doublets peut former une boucle monobrin. Puisque l'élément GGGAGG est localisé dans la région mbr contenant le cluster 1 de points de cassure, il est tentant de penser que l'activité endonucléasique clivant cette région et trouvée dans des cellules pré-B agirait sur la boucle créée par la formation du complexe protéine/GGGAGG [18].

Curieusement, on ne sait pas si le facteur C1, liant les doublets GG, et la protéine bp45 sont une seule ou deux entités distinctes. Quoique bp45 s'associe à des séquences à deux brins, la présence de l'élément

GGGAGG est requise. Par ailleurs, bp45 semble être présent préférentiellement dans des cellules lymphoïdes alors que C1 semble beaucoup plus ubiquitaire. Il faudra donc attendre la purification puis le séquençage pour conclure sur ce point.

L'élément GGGAGG pourrait être impliqué dans d'autres translocations

Une compilation de points de cassure sur des translocations diverses rencontrées dans des leucémies aiguës lymphoblastiques et myéloïdes a montré que l'élément GGGAGG est souvent présent au voisinage des points de cassure sur un seul ou les deux partenaires, et dans les deux orientations. Outre mbr, D_H et J_H dans la t(14;18), on l'a retrouvé sur

le chromosome 18 dans la région mcr [20], sur le chromosome 8 en aval de *c-MYC* [21], au voisinage des points de cassure de la t(15;17), tant sur le 15 (*PML*, [22]) que sur le 17 (clusters *RARA1* et *RARA2*, [23]), de la t(4;11) au niveau de *MLL* sur le 11 [24], de la t(9;22) avec les deux clusters de points de cassure *BCR1* et *BCR2* sur le 9 [25], et *ABL* sur le 22. Compte tenu du mécanisme présumé de la protéine liant cette séquence, l'orientation n'est pas *a priori* problématique.

Autres séquences remarquables

Un autre groupe a recherché des protéines capables de s'associer à des séquences de la région mbr en utilisant des oligonucléotides très similaires ou identiques à l'oligo c

(double brin) utilisé par le groupe de Jaeger [26]. Une protéine retardant l'oligo sur un gel d'agarose a été trouvée dans toute une série de lignées lymphoïdes, mais pas dans des lignées non lymphoïdes. Cette protéine dénommée BCLF-1 reconnaît en fait le brin plus (5'-GCCCTCCTCCCTCCTTCCGCGGG-3') alors que deux autres protéines BCLF-2 et BCLF-3 réagissent avec le brin moins complémentaire. Il semble donc clair que BCLF-1 n'est pas la protéine reconnaissant les doublets GG. En revanche, il n'est pas exclu que l'une des deux protéines BCLF-2 et BCLF-3 puisse se lier aux doublets GG puisque l'élément GG-Xn-GG est répété plusieurs fois dans le brin moins.

Dans un précédent travail, Aoki *et al.* [27] avaient rapporté des observations sur les points de cassure de translocations t(1;14) et t(8;14) affectant des leucémies aiguës lymphoblastiques T. Rappelons brièvement que la translocation t(1;14) affecte la structure ou l'expression du gène *TAL-1/SCL* qui code pour un facteur de transcription à motif bHLH, et la t(8;14) dérègle l'expression de *c-MYC*. Dans les deux cas, le partenaire est le locus *TCR α / δ* . Dans le proche voisinage des points de cassure sur le 1 et sur le 8, une séquence consensus a été identifiée (voir *figure 2*). Cette séquence a été retrouvée dans notre laboratoire au niveau d'une translocation t(18;22) remaniant la partie 5' et le gène de la chaîne légère λ d'IGL [28]. Parce qu'à une exception près, les rares translocations t(2;18) et t(18;22) trouvées dans les lymphomes et quelques cas de leucémie lymphoïde chronique intéressent les gènes *Ig κ* et *Ig λ* , elles ont été dénommées translocations variantes, et la région 5' de *BCL2* où se concentrent les points de cassure, *vcr* pour *variant cluster region* [29]. Kasai *et al.*, ont montré que la séquence consensus s'associe spécifiquement à un facteur nucléaire ReHF-1 [26]. Ils ont également présenté plusieurs données (taille similaire, compétition) qui suggèrent que ReHF-1 et BCLF-1 pourraient être le même facteur [27]. Cette hypothèse séduisante n'est cependant pas étayée par la comparaison des séquences des éléments reconnus respectivement par ReHF-1 et BCLF-1. En particulier, la

séquence consensus déduite de celle des oligonucléotides correspondants n'est pas très convaincante. Seule une caractérisation plus complète des deux facteurs permettra de conclure sur ce point.

Intervention de ces facteurs protéiques dans la recombinaison illégitime

Il est prématuré d'envisager un modèle qui intègre l'ensemble des faits rapportés ci-dessus, d'autant que certains d'entre eux doivent être affermis. Il semble toutefois possible que la protéine bp45 puisse se lier aux séquences χ dans la région D_H sur le chromosome 14, et dans la région mbr (*figure 4*). Puis, la protéine Cl en s'associant aux doublets G du brin complémentaire engendrerait deux boucles simple brin accessibles à une activité endonucléasique, qui cliverait donc les deux brins moins. La réunion des deux brins illégitimes créerait alors une conformation conduisant, par une contrainte structurale, au clivage des deux brins positifs (par la même endonucléase ou une autre) et leur réunion illégitime. Alternativement, une protéine de type RecA pourrait induire le processus de recombinaison homologue. Finalement, comme dans le modèle de Krontiris *et al.*, une recombinaison de type V(D)H interviendrait pour convertir les intermédiaires ainsi créés en leurs produits finaux.

Conclusions et perspectives

L'ensemble des résultats rapportés ici appelle plusieurs commentaires. Tout d'abord, les hypothèses actuelles expliquant la recombinaison illégitime qui crée la t(14;18), même si elles demeurent trop incomplètes reflètent beaucoup mieux l'ensemble des faits observés, alors que le précédent modèle prétendait expliquer les choses par la seule intervention des séquences consensus de recombinaison (séquences 7-9). Il s'ensuit que les voies à suivre sont clairement définies. En priorité, il faut isoler les facteurs liant les séquences χ et χ -like ou la séquence GGX_nGG sur le brin complémentaire. Cette étape passe obligatoirement par le clonage des

gènes correspondants. Cette approche permettra d'examiner les interactions qui spécifient l'association de chaque facteur à sa séquence en même temps qu'elle rendra possible la levée de certaines contradictions actuelles concernant l'identité de tel ou tel facteur (par exemple BCLF-1 et ReHF-1). En corollaire, la recherche d'homologies avec les facteurs de recombinaison du système RecA-RecBCD bien identifiés chez les procaryotes permettra de définir quels sont les facteurs équivalents impliqués chez les mammifères dans la recombinaison illégitime qui conduit aux translocations.

Une autre voie à suivre tient à l'existence des mêmes séquences χ -like et leur séquence complémentaire à proximité des points de cassure d'autres translocations intéressant d'une part les lymphoproliférations malignes B et T avec l'implication des gènes *IG* et *TCR* et, d'autre part, celles qui engendrent des gènes chimeriques dans des leucémies, par exemple la t(9;22) dans la leucémie myéloïde chronique et la t(15;17) dans la leucémie aiguë promyélocytaire. Il est bien sûr tentant de spéculer que ces séquences sont communes à toutes les translocations, autrement dit qu'il existerait un modèle unifié où les premières étapes utiliseraient les mêmes facteurs protéiques associés à ces séquences.

Finalement, on ne saurait totalement exclure que d'autres séquences (par exemple des séquences type Alu ou LINE) dont l'existence à proximité des points de cassure a été mentionnée par plusieurs groupes participent à la recombinaison illégitime. Néanmoins, ces séquences ne sont pas systématiquement présentes, ce qui rendrait leur participation fortuite ■

TIRÉS A PART

C.J. Larsen.

Summary

Molecular mechanism of BCL2 activating chromosome translocation t(14 ; 18) (q21 ; q32)

The *BCL2* gene is currently extensively investigated because of its essential contribution to cellular mechanisms controlling programmed cell death processes. In human follicular lymphomas and some other malignant B-cell proliferations, *BCL2* is constitutively activated by a t(14;18) chromosomal translocation. The presence of structural particularities in the vicinity of the breakpoints on chromosome partners has suggested the involvement of the lymphocyte recombinase complex that is essential for immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements, in the molecular mechanism leading to the translocation. Recent data in the literature, such as the characterization of χ or χ -like sequences close to the breakpoints, and characterization of nuclear proteins binding these sequences, suggest that other mechanisms can be at work for generating the illegitimate recombination.