

Physiologie et pathologie de la recombinaison V(D)J

La recombinaison des segments V(D)J des gènes d'immunoglobuline et des récepteurs TCR est une étape essentielle de la différenciation des cellules B et T au cours de laquelle est engendrée la diversité des spécificités pour les antigènes. Des séquences cibles particulières et des systèmes enzymatiques spécifiques sont requis pour les recombinaisons qui mettent aussi en jeu les systèmes généraux d'excision/réparation de l'ADN. La spécificité du réarrangement dans les cellules B et T est liée à l'activation transcriptionnelle préalable des domaines devant subir la recombinaison. Les anomalies de la recombinaison, chez l'homme, sont responsables de déficits immunitaires sévères. La plasticité du génome nécessaire à la génération de la diversité des récepteurs de l'antigène expose à des accidents chromosomiques qui peuvent toucher des gènes critiques et participer à la transformation tumorale. La caractérisation des clones lymphocytaires grâce à l'amplification par PCR des séquences jonctionnelles a constitué une percée décisive, tant dans l'étude de la maladie résiduelle après traitement de syndromes lymphoprolifératifs que pour l'étude du répertoire lymphocytaire dans diverses maladies infectieuses ou auto-immunes.

François Sigaux

ADRESSE

F. Sigaux : professeur d'hématologie, directeur du laboratoire d'hématologie moléculaire. Institut d'hématologie, hôpital Saint-Louis, 1, avenue Claude-Vellefaux, 75475 Paris Cedex 10, France.

m/s n° 10, vol. 10, octobre 94

La recombinaison V(D)J est l'un des événements fondamentaux et spécifiques de la différenciation lymphoïde. Elle permet la diversification des récepteurs des antigènes et donc la reconnaissance spécifique des antigènes par les cellules lymphoïdes. Ces recombinaisons impliquent les segments V, J et, dans certains cas, D qui codent pour la partie amino-terminale des chaînes des récepteurs de l'antigène. Les immunoglobulines de surface sont les récepteurs pour l'antigène des

cellules B. Deux types de récepteurs de l'antigène des cellules T (TCR) ont été décrits, TCR $\alpha\beta$ et TCR $\gamma\delta$. Une cellule T n'exprime en règle qu'un seul type de TCR. La recombinaison V(D)J est somatique. Elle survient sans que soit nécessaire une exposition aux antigènes pendant les étapes les plus précoces de la différenciation lymphoïde. Des anomalies de cette recombinaison surviennent dans certaines maladies génétiques et dans certaines tumeurs hémato-poïétiques. La connaissance de la physiologie de la recombinaison

RÉFÉRENCES

1. Alt F, Oltz E, Young F, Gorman J, Taccioli G, Chen J. V(D)J recombination. *Immunol Today* 1992 ; 13 : 306-14.
2. Schatz DG, Oettinger MA, Schlissel MS. V(D)J recombination : molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol* 1992 ; 10 : 359-83.
3. Lewis SM, Hesse JE. Cutting and closing without recombination in V(D)J joining. *EMBOJ* 1991 ; 10 : 3631-9.
4. Sheehan KM, Lieber MR. V(D)J recombination : signal and coding joint resolution are uncoupled and depend on parallel synapsis of the sites. *Mol Cell Biol* 1993 ; 13 : 1363-70.
5. Gauss GH, Lieber MR. Unequal signal and coding joint formation in human V(D)J recombination. *Mol Cell Biol* 1993 ; 13 : 3900-6.
6. Hesse J, Lieber M, Mizuuchi K, Gellert M. V(D)J recombination : a functional definition of the joining signals. *Genes Dev* 1989 ; 3 : 1053-61.
7. Wei Z, Lieber MR. Lymphoid V(D)J recombination. Functional analysis of the spacer sequence within the recombination signal. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 3180-3.
8. Komori T, Okada A, Stewart V, Alt FW. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* 1993 ; 261 : 1171-5.
9. Gilfillan S, Dierich A, Lemeur M, Benoist C, Mathis D. Mice lacking TdT : mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 1993 ; 261 : 1175-8.
10. Gerstein RM, Lieber MR. Coding end sequence can markedly affect the initiation of V(D)J recombination. *Genes Dev* 1993 ; 7 : 1459-69.
11. Gerstein RM, Lieber MR. Extent to which homology can constrain coding exon junctional diversity in V(D)J recombination. *Nature* 1993 ; 363 : 625-7.
12. Asanow DM, Cado D, Raullet DH. Selection is not required to produce invariant T-cell receptor gamma-gene junctional sequences. *Nature* 1993 ; 362 : 158-60.

V(D)J a permis de mettre au point des outils moléculaires importants pour le diagnostic des hémopathies lymphoïdes et pour la surveillance des malades traités par chimiothérapie ou greffe de moelle.

Mécanisme de la recombinaison V(D)J

L'architecture particulière des gènes *Ig* et *TCR* permet la recombinaison V(D)J (pour une revue [1, 2]). Les différents loci, *IgH*, *Igκ* et *Igλ* pour les *Ig* et *TCRA*, *TCRB*, *TCRG* et *TCRD* pour les gènes *TCR*, comportent, à l'état non réarrangé, de multiples segments V, J et D (pour les gènes *IgH*, *TCRβ* et *TCRδ*). Lors des réarrangements, les régions codantes pour un segment V, un segment J et, éventuellement, un segment D se juxtaposent. Lorsque les cadres de lecture de ces segments sont conservés par la recombinaison, la transcription de l'unité V(D)J néoformée code pour la partie amino-terminale d'une chaîne fonctionnelle. Les multiples combinaisons VJ sont à l'origine d'une partie de la diversité des récepteurs de l'antigène (diversité combinatoire). Cette diversité combinatoire reste cependant limitée pour les gènes *TCRγ* et *TCRδ*. A la jonction V(D)J surviennent, en outre, des délétions et additions aléatoires de nucléotides qui peuvent augmenter de façon considérable la diversité des récepteurs de l'antigène (diversité jonctionnelle). La jonction V(D)J est importante, notamment pour les chaînes de *TCR*, puisqu'elle interagit de façon préférentielle avec les antigènes dans le modèle classique de présentation (peptide + produits des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) pour les cellules αβ). Le réarrangement des différents segments des gènes *Ig* et *TCR* est ordonné de façon assez stricte au cours de l'ontogénie et de la différenciation précoce des cellules lymphoïdes. Pour les gènes comportant des segments D, les réarrangements DJ précèdent les réarrangements V(D)J (sauf peut-être pour les gènes *TCRδ* où des réarrangements précoces V-D ont été observés). Dans la lignée T, les réarrangements des gènes *TCRδ*, *TCRγ* et les réarrangements incom-

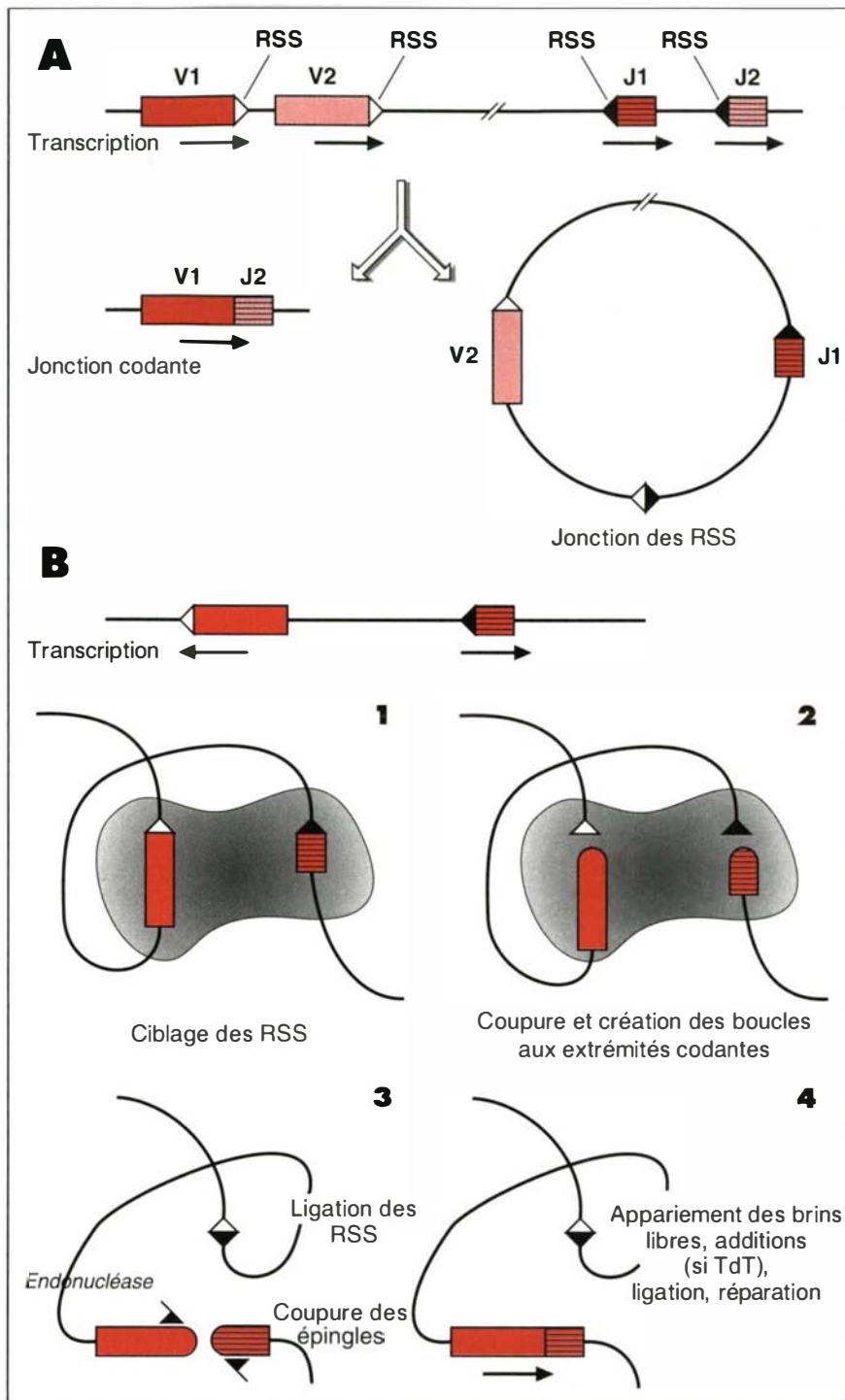
plets Dβ-Jβ sont très précoces. Le réarrangement complet Vβ(D)Jβ précède les réarrangements Vα-Jα. A l'échelon cellulaire, l'expression d'un récepteur membranaire pré-T comportant une chaîne Vβ(D)Jβ-Cβ complète et d'un partenaire - désigné à titre provisoire par l'appellation gp33 - précède l'expression d'un récepteur complet TCRβ-TCRα chez la souris. De la même façon, le réarrangement des différents gènes d'Ig est réglé au cours de l'ontogénie et de la différenciation. Le réarrangement des chaînes lourdes précède celui des chaînes légères. Le réarrangement de la chaîne Igκ précède celui de la chaîne Igλ et un mécanisme de régulation complexe permet d'éviter la coexpression de deux types différents de chaîne légère d'Ig. Comme pour les cellules T, l'expression d'une Ig fonctionnelle est précédée par l'expression d'un récepteur immature.

Les mécanismes biochimiques et les étapes de la recombinaison V(D)J sont identiques dans la lignée B et la lignée T. La majorité des données a été obtenue en utilisant des substrats synthétiques de recombinaison transfectés dans des cellules capables de recombinaison et en analysant les produits obtenus. Globalement, cette recombinaison nécessite la reconnaissance de séquences spécifiques qui ciblent le réarrangement (RSS), le rapprochement de ces séquences, la coupure double-brin de l'ADN à la jonction entre la partie codante des segments et les RSS, puis la ligation correcte, des segments codants d'une part, des RSS d'autre part.

Quatre voies expérimentales différentes ont permis de caractériser certains des éléments impliqués dans la recombinaison V(D)J.

Empreinte moléculaire de la recombinaison V(D)J

La comparaison des séquences des segments réarrangés avec leurs contreparties germinales a été facilitée par l'utilisation des techniques de PCR. Cette étude a montré que, quel que soit le segment, la recombinaison V(D)J se fait toujours au voisinage de séquences nucléotidiques de recombinaison (RSS) constituées d'un heptamère séparé d'un nona-



mère par 12 ou 23 nucléotides. La séquence de l'heptamère est très conservée d'un segment à un autre (consensus CACAGTG). La séquence du nonamère est moins conservée mais est riche en A et T. Ces séquences flanquent les segments V, D et J dans leur configuration germinale (non réarrangée).

La recombinaison aboutit, lorsqu'elle est complète, à deux jonctions, l'une dite « codante », qui réunit les séquences codantes des segments, et l'autre dite « jonction des signaux », qui réunit les RSS (figure 1). La création de ces deux jonctions semble correspondre à des événements moléculaires indépendants. La conséquence de la recombinaison V(D)J sur la structure chromosomique dépend de l'orientation des segments impliqués dans la recombinaison. Lorsque les RSS sont en orientation identique (c'est-à-dire heptamère-espaceur-nonamère, heptamère-espaceur-nonamère), ce qui survient lorsque les segments de gènes sont en orientation transcriptionnelle opposée, le produit de la réaction est une inversion, et les deux jonctions sont retrouvées dans le génome sans perte de matériel. Lorsque les RSS sont en orientation opposée – cas le plus fréquent –, l'ensemble de l'ADN contenu entre les RSS (elles comprises) est inclus dans une boucle d'ADN. Ces produits circulaires ont été identifiés de façon indiscutable pour les gènes *TCR* dans les thymocytes. D'autres produits plus rares sont possibles et ont été essentiellement décrits au niveau de substrats de recombinaison. Un de ces produits correspond à la coupure et à la ligation de l'ADN sans recombinaison [3]. Les modifications enzymatiques des deux jonctions et notamment leur ligation se font indépendamment [4, 5]. Des extrémités libres sont engendrées par ce mécanisme [5]. Cette constatation est importante pour comprendre les anomalies chromosomiques dues à la recombinaison V(D)J.

Les recombinaisons DJ, V(D)J et VJ peuvent être modifiées par des réarrangements secondaires. Ceux-ci incluent les réarrangements V sur DJ, V sur VJ ou V(D)J (utilisant, comme RSS, un heptamère interne localisé dans la partie distale de la

Figure 1. **Représentation schématique de la recombinaison V(D)J.** D'après [1 et 33]. A : réarrangement par excision de boucle. Le segment V1 réarrange sur le segment J2. Les jonctions codantes et les jonctions de RSS sont montrées. Le sens de la transcription est indiqué. B : réarrangement par inversion. Le schéma tente d'inclure les propositions de Lieber [33] concernant les modifications des jonctions codantes. La présence de protéines au sein du complexe de recombinaison (en gris) est hypothétique.

RÉFÉRENCES

13. Davodeau F, Peyrat MA, Hallet MM, Houde I, Vie H, Bonneville M. Peripheral selection of antigen receptor junctional features in a major human gamma delta subset. *Eur J Immunol* 1993 ; 23 : 804-8.
14. Hsieh CL, McCloskey RP, Radany E, Lieber MR. V(D)J recombination : evidence that a replicative mechanism is not required. *Mol Cell Biol* 1991 ; 11 : 3972-7.
15. Oettinger MA, Stanger B, Schatz DG, Glaser T, Call K, Housman D, Baltimore D. The recombination activating genes, *RAG1* and *RAG2*, are on chromosome 11p in humans and chromosome 2p in mice. *Immunogenetics* 1992 ; 35 : 97-101.
16. Schatz D, Oettinger M, Baltimore D. The V(D)J recombination activating gene, *RAG1*. *Cell* 1989 ; 59 : 1035-48.
17. Oettinger M, Schatz D, Gorka C, Baltimore D. *RAG-1* and *RAG-2*, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990 ; 248 : 1517-23.
18. Rathbun G, Oltz EM, Alt FW. Comparison of *RAG* gene expression in normal and transformed precursor lymphocytes. *Int Immunol* 1993 ; 5 : 997-1000.
19. Silver DP, Spanopoulou E, Mulligan RC, Baltimore D. Dispensable sequence motifs in the *RAG-1* and *RAG-2* genes for plasmid V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 6100-4.
20. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. *RAG-1*-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992 ; 68 : 869-77.
21. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, Alt FW. *RAG-2*-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992 ; 68 : 855-67.
22. Shinkai Y, Koyasu S, Nakayama K, Murphy KM, Loh DY, Reinherz EL, Alt FW. Restoration of T cell development in *RAG-2*-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* 1993 ; 259 : 822-5.
23. Chen J, Lansford R, Stewart V, Young F, Alt FW. *RAG-2*-deficient blastocyst complementation : an assay of gene function in lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 4528-32.
24. Bories J, Cayuela J, Loiseau P, Sigaux F. Expression of human recombination activating genes (*RAG1* and *RAG2*) in neoplastic lymphoid cells : correlation with cell differentiation and antigen receptor expression. *Blood* 1991 ; 78 : 2053-61.
25. Ma A, Fisher P, Dildrop R, Oltz E, Rathbun G, Achacoso P, Stall A, Alt FW. Surface IgM mediated regulation of *RAG* gene expression in E mu-N-myc B cell lines. *EMBO J* 1992 ; 11 : 2727-34.
26. Turka LA, Schatz DG, Oettinger MA, Chun JJ, Gorka C, Lee K, McCormack WT, Thompson CB. Thymocyte expression of *RAG-1* and *RAG-2* : termination by T cell receptor cross-linking. *Science* 1991 ; 253 : 778-81.
27. Brandle D, Muller C, Rulicke T, Hengartner H, Pircher H. Engagement of the T-cell receptor during positive selection in the thymus down-regulates *RAG-1* expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 9529-33.
28. Borgulya P, Kishi H, Uematsu Y, von Boehmer H. Exclusion and inclusion of alpha and beta T cell receptor alleles. *Cell* 1992 ; 69 : 529-37.
29. Lin WC, Desiderio S. Regulation of V(D)J recombination activator protein *RAG-2* by phosphorylation. *Science* 1993 ; 260 : 953-9.
30. Lin WC, Desiderio S. Cell cycle regulation of V(D)J recombination-activating protein *RAG-2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 2733-7.
31. Cortes P, Ye ZS, Baltimore D. *RAG-1* interacts with the repeated amino acid motif of the human homologue of the yeast protein SRP1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 7633-7.
32. Roth DB, Nakajima PB, Menetski JP, Bosma MJ, Gellert M. V(D)J recombination in mouse thymocytes : double-strand breaks near T cell receptor delta rearrangement signals. *Cell* 1992 ; 69 : 41-53.
33. Lieber MR. The mechanism of V(D)J recombination : a balance of diversity, specificity, and stability. *Cell* 1992 ; 70 : 873-6.
34. Pergola F, Zdzienicka MZ, Lieber MR. V(D)J recombination in mammalian cell mutants defective in DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 1993 ; 13 : 3464-71.
35. Taccioli GE, Rathbun G, Oltz E, Stamato T, Jeggo PA, Alt FW. Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science* 1993 ; 260 : 207-10.
36. Goldman JP, Spencer DM, Raulat DH. Ordered rearrangement of variable region genes of the T cell receptor gamma locus correlates with transcription of the unrearranged genes. *J Exp Med* 1993 ; 177 : 729-39.
37. Ferrier P, Krippel B, Blackwell T, Furley A, Suh H, Winoto A, Cook W, Hood L, Costantini F, Alt F. Separate elements control DJ and VDJ rearrangement in a transgenic recombination substrate. *EMBO J* 1990 ; 9 : 117-25.

région codante du segment V déjà réarrangé) et les réarrangements utilisant des segments localisés de part et d'autre de la recombinaison pré-existante, aboutissant à sa délétion au sein de la boucle d'excision.

La construction de substrats de recombinaison transfectables dans des lignées lymphoïdes immatures a permis de montrer que les RSS sont suffisantes pour cibler le réarrangement. Le principe d'action de ces substrats est de rendre l'expression d'un gène de sélection dépendante d'une recombinaison. Le rôle respectif des différents éléments des RSS a été précisé [6]. Les heptamères et, en leur sein, certains nucléotides sont indispensables à la recombinaison. Les réarrangements sont possibles mais rares en l'absence de nonamère. Les recombinaisons ne se font avec une fréquence appréciable qu'entre deux sites dont les séquences de recombinaison possèdent des espaceurs de taille différente (12 ou 23 nucléotides). Ces études ont également montré que la taille des espaceurs est critique pour la recombinaison, à un nucléotide près. En revanche, la séquence des espaceurs n'intervient pas dans l'efficacité de la recombinaison, y compris lorsque le contenu en bases GC est très fortement altéré [7]. Cette constatation plaide contre l'hypothèse d'une association des séquences homologues des RSS (cette hypothèse est à la base du modèle classique de recombinaison V(D)J dans lequel les séquences palindromiques des heptamères s'associent, d'une RSS à une autre, après fusion de l'ADN double-brin. Dans ce modèle, la composition en bases G et C des espaceurs devrait modifier les conditions de fusion de l'ADN au voisinage des RSS et influencer sur l'efficacité de la recombinaison). Des études utilisant ces substrats ont montré que plus de 99 % des recombinaisons nécessitent une interaction entre deux RSS. Cette nécessité limite le risque de coupures isolées à la jonction d'un heptamère de recombinaison.

Le séquençage d'un nombre important de recombinaisons des gènes endogènes et des substrats de recombinaison a montré que les jonctions des RSS sont en général franches, ou comportent tout au

plus l'addition de rares nucléotides non codés par des séquences germinales (séquences N). Les jonctions codantes sont fréquemment modifiées, incluant des délétions et des additions de séquences N ou de courtes séquences palindromiques dites « P », ces dernières n'étant observées qu'en l'absence de délétion des séquences codantes. L'addition de séquence N est, au moins en partie, le reflet de l'activité de l'enzyme TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) exprimée dans les cellules lymphoïdes immatures, notamment chez l'adulte. Le rôle important de la TdT, suggéré par des expériences de transfection, a été confirmé par la création de souris chez lesquelles l'activité de cette enzyme a été supprimée par recombinaison homologue (*m/s n°11, vol. 9, p. 1272*) [8, 9] (figure 2).

Bien que la recombinaison dépende essentiellement des séquences RSS, la séquence nucléotidique des segments codants adjacents peut intervenir dans l'efficacité de la recombinaison [10] et pour favoriser la création de jonctions préférentielles, notamment lorsque l'activité TdT est faible [11]. Comme l'ont montré des modèles transgéniques excluant l'influence d'une sélection par interaction avec le(s) ligand(s) des TCR, l'existence d'homologies entre les séquences codantes adjacentes aux RSS est probablement à l'origine des réarrangements dits « canoniques », peu diversifiés, retrouvés dans le locus TCR γ chez la souris [12]. De telles séquences invariantes existent également chez l'homme pour le réarrangement V γ 9-J γ P [13] et pourraient avoir une origine analogue. La réplication de l'ADN n'est pas indispensable pour la recombinaison V(D)J [14].

Les gènes RAG indispensables à la recombinaison V(D)J

Une deuxième voie d'étude des mécanismes de la recombinaison V(D)J s'est appuyée sur la spécificité cellulaire de cette recombinaison. Les réarrangements somatiques des gènes *Ig/TCR* ne se rencontrent, en effet, que dans les cellules lymphoïdes immatures et sont absents, en particulier, dans les fibroblastes. Cette constatation a été à la base du clonage de deux gènes, *RAG1* et

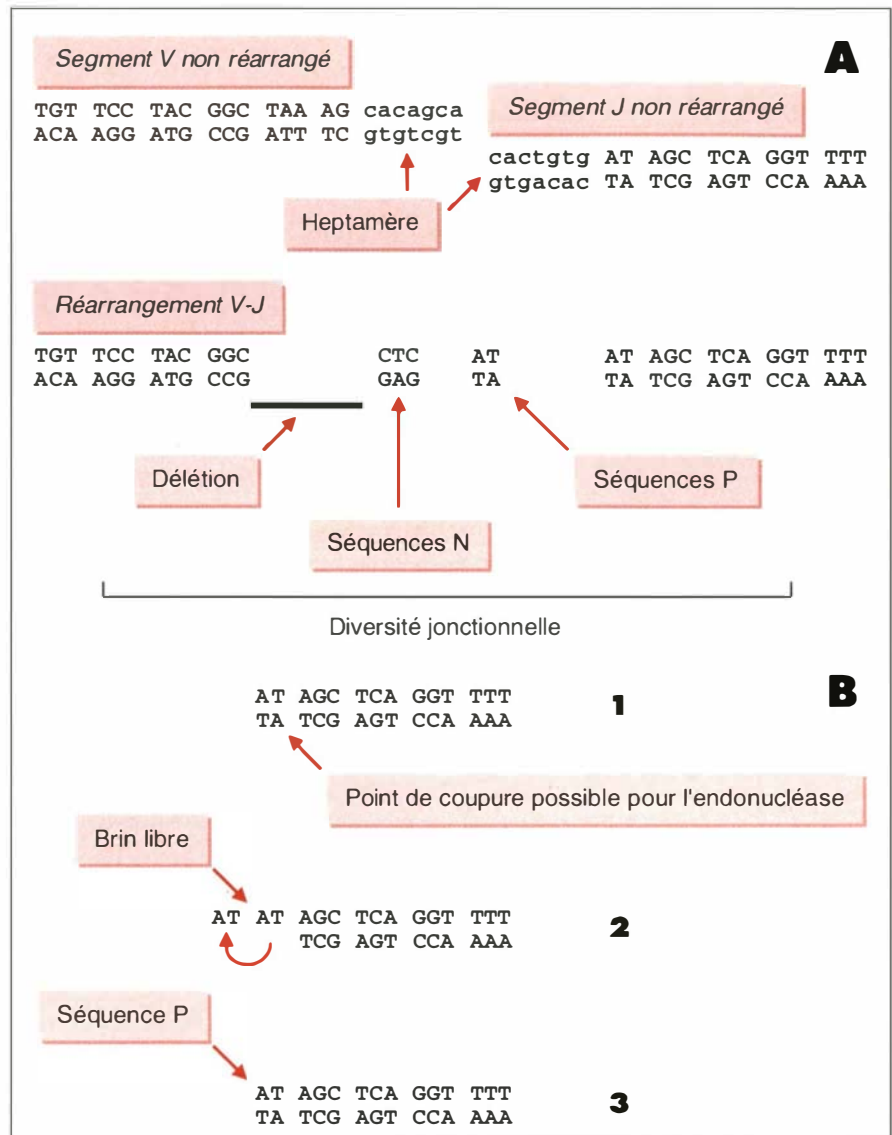


Figure 2. **Diversité jonctionnelle.** **A** : un réarrangement est montré. Les délétions, séquences N et séquences P contribuent à la diversité jonctionnelle. **B** : mécanisme possible de génération des séquences P [33]. **1** : Séquence avant la coupe par l'endonucléase. **2** : production du brin libre. **3** : séquence P obtenue après réparation.

RAG2 (*m/s n° 8, vol. 6, p. 820*), situés à quelques kb l'un de l'autre (en 11p12-11p13 chez l'homme [15]), dont la coexpression est capable d'induire, dans un fibroblaste, le réarrangement d'un substrat de recombinaison intégré dans le génome et comportant un gène de sélection [16, 17]. Ces deux gènes sont coexprimés dans les cellules lymphoïdes immatures. Le gène *RAG1*

est quantitativement plus exprimé que le gène *RAG2*. En fait, l'expression de ces gènes peut varier de façon importante d'une cellule à une autre, notamment dans les cellules pré-B murines transformées par le virus Abelson et communément utilisées pour analyser la recombinaison V(D)J [18]. La fonction précise des gènes *RAG1* et *RAG2* reste inconnue. Le gène *RAG2* ne présen-

RÉFÉRENCES

38. Serwe M, Sablitzky F. V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer. *EMBO J* 1993 ; 12 : 2321-7.
39. Anderson S, Levin S, Perlmutter R. Protein tyrosine kinase p56^{lck} controls allelic exclusion of T-cell receptor β -chain genes. *Nature* 1993 ; 365 : 552-4.
40. Hsieh CL, Lieber MR. CpG methylated minichromosomes become inaccessible for V(D)J recombination after undergoing replication. *EMBO J* 1992 ; 11 : 315-25.
41. Engler P, Weng A, Storb U. Influence of CpG methylation and target spacing on V(D)J recombination in a transgenic substrate. *Mol Cell Biol* 1993 ; 13 : 571-7.
42. Hsieh CL, McCloskey RP, Lieber MR. V(D)J recombination on minichromosomes is not affected by transcription. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 15613-9.
43. Schwarz K, Hansen-Hagge T, Knobloch C, Friedrich W, Kleihauer E, Bartram K. Severe combined immunodeficiency (SCID) in man : B cell-negative (B-) SCID patients exhibit an irregular recombination pattern at the Jh locus. *J Exp Med* 1991 ; 174 : 1039-48.
44. Tawa A, Hozumi N, Minden M, Mak T, Gelfand E. Rearrangement of the T-cell receptor β -chain gene in non-T-cell, non-B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood. *N Engl J Med* 1985 ; 313 : 1033-7.
45. Chen Z, Le Paslier D, Dausset J, Degos L, Flandrin G, Cohen D, Sigaux F. Human T-cell rearranging genes gamma are frequently rearranged in B-lineage acute lymphoblastic leukemias but not in chronic B-cell proliferations. *J Exp Med* 1987 ; 165 : 1000-15.
46. Loiseau P, Guglielmi P, Le Paslier D, McIntyre E, Gessain A, Bories JC, Flandrin G, Chen Z, Sigaux F. Rearrangements of the T-cell receptor δ gene in T-acute lymphoblastic leukemia cells are distinct from those occurring in B-lineage acute lymphoblastic leukemia and preferentially involve one V δ gene segment. *J Immunol* 1989 ; 142 : 3305-11.
47. Dombret H, Loiseau P, Bories J, Sigaux F. Unexpected consistent involvement of V β gene segments in inappropriate T-cell receptor β gene rearrangements occurring in B-lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 1992 ; 80 : 2614-21.
48. Aurias A. Ataxie-télangiectasie : aspects cliniques, épidémiologiques et génétiques. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 957-62.
- te d'homologie avec aucun gène connu. La séquence protéique déduite du gène *RAG1* a une homologie limitée avec celle déduite du gène de levure *HPR-1* dont la perte de fonction augmente le taux de recombinaison homologue. Le gène *HPR-1* a, lui-même, une homologie avec le gène codant pour une topoisomérase 1. Le tiers amino-terminal de la molécule *RAG1* et le domaine acide de *RAG2* ne sont pas indispensables pour l'activité recombinase. Inversement, la délétion de la partie carboxy-terminale de *RAG1*, homologue de *HPR-1*, abolit cette activité. Cette constatation plaide pour un rôle direct de *rag1* dans la machinerie de recombinaison [19]. Le rôle majeur de ces gènes dans la recombinaison V(D)J a été démontré par la création de souris chez lesquelles l'activité de *rag1* [20] ou *rag2* [21] a été supprimée par recombinaison homologue. Dans les deux cas, un déficit immunitaire majeur lié à l'absence de cellules T ou B matures est observé. Ce déficit est lié à l'impossibilité de recombiner les gènes *Ig* et *TCR* ainsi que le montrent l'analyse des tissus lymphoïdes de ces animaux et l'analyse de lignées B dérivées de foie fœtal et de moelle osseuse par transformation par le virus A-MuLV. Un transgène *TCR* complet permet de restaurer le développement T normal chez les souris *rag2*^{-/-} [22], confirmant l'importance de l'expression du TCR pour le déroulement normal de la maturation thymique. Les souris *rag2*^{-/-} sont viables, fertiles et constituent un réceptacle idéal pour l'implantation de cellules embryonnaires comportant l'inactivation homozygote d'un gène dont l'influence sur le développement B ou T veut être étudiée : les cellules lymphoïdes apparaissant dans ce contexte proviennent exclusivement des cellules embryonnaires implantées qui expriment les gènes *rag*, contrairement aux autres tissus qui constituent des chimères [23]. Le rôle dans la différenciation lymphoïde de gènes dont la suppression empêche l'embryogenèse peut également être étudié chez ces souris. Le rôle éventuel des gènes *rag1* et *rag2* dans d'autres mécanismes, comme la commutation isotypique ou l'hypermutation somatique, reste à démontrer chez les mammifères. La régulation de l'activité des gènes *RAG1* et *RAG2* fait intervenir des événements transcriptionnels et post-transcriptionnels. Les gènes *RAG* ne sont coexprimés de façon significative que dans une fraction des cellules lymphoïdes immatures normales [16, 17] ou néoplasiques [24]. Leur expression peut être diminuée en induisant un signal approprié au sein de ces cellules. Dans les cellules B immatures, les signaux induisant une augmentation de l'AMPc augmentent la transcription de ces gènes. L'activation par l'intermédiaire du récepteur de l'antigène des cellules B a un effet inverse [25]. L'étude de l'expression des gènes *rag*, dans le thymus normal ou chez des souris comportant un fond génétique et un transgène *TCR* appropriés, suggère qu'une inhibition physiologique surviendrait au moment de la sélection positive des thymocytes. Elle pourrait être la conséquence de l'activation du TCR par l'association (peptide + CMH). La sélection positive inhibe la possibilité de réarrangements successifs des gènes *TCR*, stabilisant ainsi la spécificité des cellules lymphoïdes T avant leur passage en périphérie [26-28]. Les régions de régulation en *cis* et les facteurs pouvant agir en *trans* sur la transcription des gènes *RAG* ne sont pas encore connus. L'activité des gènes *RAG* est également réglée par des mécanismes post-transcriptionnels qui pourraient fixer le moment où survient la recombinaison au cours du cycle cellulaire. La protéine *RAG2* murine est phosphorylable au niveau de la tyrosine 490 par une ou plusieurs kinases associées aux cyclines (notamment par p34^{cdc2} *in vitro*). Cette phosphorylation pourrait être un mécanisme important de régulation de l'activité de *RAG2* puisqu'elle aboutit à une rapide dégradation de la protéine [29]. Des travaux récents ont montré que, dans une lignée B immature et dans les thymocytes, la protéine *RAG2* s'accumule préférentiellement dans la phase G0-G1 et décline de façon très importante avant l'entrée en phase S, le taux restant bas durant les phases S, G2 et M. Il est donc possible que la diminution rapide de

la quantité de protéine RAG2 soit la conséquence d'une phosphorylation *in vivo* de Thr-490. Le taux de RAG1 reste relativement stable durant le cycle [30]. Compte tenu du rôle essentiel des gènes *RAG*, ces résultats suggèrent que la recombinaison V(D)J pourrait être restreinte par ce mécanisme à la phase G1 du cycle cellulaire.

Un travail récent, basé sur la stratégie des doubles hybrides, a montré que RAG1 s'associe à l'homologue humain de la protéine de levure SRP1 [31]. Le produit du gène *SRP1* est localisé à la périphérie du noyau, en association avec la membrane nucléaire. Il est possible que le gène humain homologue de *SRP1* ait pour fonction d'adresser RAG1 à la membrane nucléaire dans des régions privilégiées pour la recombinaison V(D)J.

Altération de la recombinaison dans les souris SCID

L'étude de souris immunodéficientes comportant des anomalies de la recombinaison (souris SCID) a constitué une voie importante de l'étude de la recombinaison V(D)J. Ces souris présentent un déficit immunitaire combiné sévère dû à une incapacité de constituer des jonctions codantes fonctionnelles. Cette anomalie s'intègre dans un défaut plus général de réparation de l'ADN dû à l'anomalie d'un gène distinct des gènes *RAG1* et *RAG2*. Chez ces souris, les jonctions non codantes sont présentes mais comportent fréquemment des délétions de nucléotides non vues chez les souris normales. Les rares jonctions codantes comportent des délétions majeures des séquences codantes. Une étude récente a montré que les extrémités codantes des segments tentant de se réarranger ont en fait une structure en épingle qui est stable chez ces souris [32]. Le déficit serait dû à l'incapacité de couper ces structures, étape préalable à la réparation puis à la ligation des extrémités codantes. La transposition de ces résultats à la souris normale fournit un modèle qui intègre toutes les données structurales observées à ce jour [33]. Ce modèle reste spéculatif : on suppose que ces épingles existent chez les individus normaux et qu'elles sont résolues par une acti-

tivité endonucléasique simple-brin qui coupe l'ADN au voisinage de l'extrémité de la boucle ; la jonction codante est créée par alignement, réparation et ligation. Ce modèle explique la génération des séquences P. L'activité TdT peut, dans ce modèle, modifier la jonction dans les étapes précédant la réparation. Dans ce modèle, les délétions des séquences codantes ne sont pas dues à une activité exonucléasique mais sont la conséquence de la variabilité du site de coupure des structures en épingle et des contraintes dues à l'appariement des deux extrémités.

Implication de gènes contrôlant l'excision/réparation dans la recombinaison V(D)J

La voie d'étude la plus récente du mécanisme de la recombinaison V(D)J a consisté à caractériser des composants non spécifiques du tissu lymphoïde mais indispensables au bon déroulement de la recombinaison. Le principe de la méthode consiste à étudier l'influence d'anomalies de l'excision ou de la réparation de l'ADN sur la recombinaison V(D)J, en utilisant des lignées mutantes de cellules ovariennes de hamster chinois, présentant des anomalies de la réparation de l'ADN et transfectées par des vecteurs permettant l'expression des gènes *RAG*. L'étude de la recombinaison de substrats synthétiques introduits dans ces cellules permet de juger du retentissement de l'anomalie de l'excision/réparation sur la recombinaison V(D)J. Ces travaux ont suggéré que des anomalies portant sur des gènes importants pour la réparation de l'ADN et distincts de celui impliqué dans le phénotype SCID jouent un rôle dans la recombinaison V(D)J [34, 35].

Contrôle du ciblage de la recombinaison V(D)J

Le contrôle du ciblage de la recombinaison V(D)J est important pour comprendre la spécificité de lignée des recombinaisons (Ig dans les cellules B et TCR dans les cellules T) et, probablement, pour comprendre aussi d'autres phénomènes, comme la recombinaison préférentielle de certains segments ou l'exclusion allélique. Elle ne fait pas intervenir les

gènes *RAG*, dont l'expression est partagée par les cellules B et T, et ne permet pas, après transfection, d'entraîner la recombinaison des gènes endogènes d'*Ig* et de *TCR* dans les fibroblastes. Des facteurs importants, mais non exclusifs, de la régulation de cette accessibilité pourraient être la méthylation des CpG présents dans les *loci Ig/TCR* et la transcription des segments avant le réarrangement [1].

La majorité des résultats expérimentaux qui confortent l'idée que la transcription et/ou la fixation de facteurs sur des régions de régulation de la transcription contrôlent l'accessibilité des *loci* à la recombinaison V(D)J provient d'études d'animaux transgéniques et de lignées capables de réarrangements *in vitro*. De nombreuses études ont montré une corrélation entre la transcription des segments non réarrangés et leurs réarrangements. L'existence de recombinaisons préférentielles de certains segments V γ au cours de l'ontogénie murine a permis d'observer *in vivo* des corrélations identiques, suggérant que le ciblage pourrait être précis [36]. Les informations les plus directes ont été obtenues dans des conditions transgéniques. Le réarrangement d'un *minilocus TCR β* est dépendant de la présence en *cis* d'un élément de régulation (*enhancer* des gènes *IgH* ou *TCR β*) [37]. Récemment, des expériences de délétion *in situ* des *enhancers* par recombinaison homologue ont montré des résultats analogues pour le *locus IgH* [38]. Il est possible qu'*in vivo*, pour les gènes comportant des segments D, le contrôle de l'accessibilité à la recombinaison fasse intervenir des régions différentes pour les réarrangements DJ et VDJ. Les *enhancers*, situés généralement au voisinage des régions C, pourraient contrôler les réarrangements DJ. Des éléments encore inconnus seraient, quant à eux, responsables du contrôle du réarrangement V sur DJ dont la spécificité cellulaire est très étroite. Un exemple intéressant de contrôle du ciblage de la recombinaison V(D)J est fourni par l'exclusion allélique. Pour certains gènes (*IgH* et *TCR β* notamment), la production d'une protéine complète V(D)J (ou même tronquée de sa partie amino-termi-

RÉFÉRENCES

49. Stern M, Lipkowitz S, Aurias A, Griscelli C, Thomas G, Kirsch I. Inversion of chromosome 7 in Ataxia Telangiectasia is generated by a rearrangement between T-cell receptor β and T-cell receptor γ genes. *Blood* 1989 ; 74 : 2076-80.
50. Hsieh CL, Arlett CF, Lieber MR. V(D)J recombination in ataxia telangiectasia, Bloom's syndrome, and a DNA ligase I-associated immunodeficiency disorder. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 20105-9.
51. Lipkowitz S, Garry VF, Kirsch IR. Interlocus V-J recombination measures genomic instability in agriculture workers at risk for lymphoid malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 5301-5.
52. Aster JC, Sklar J. Interallelic V(D)J transrearrangement within the beta T cell receptor gene is infrequent and occurs preferentially during attempted D beta to J beta joining. *J Exp Med* 1992 ; 175 : 1773-82.
53. Stary A. La recombinaison illégitime dans les cellules de mammifère. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 986-94.
54. Fuscoe JC, Zimmerman LJ, Lippert MJ, Nicklas JA, O'Neill JP, Albertini RJ. V(D)J recombinase-like activity mediates *HPRT* gene deletion in human fetal T-lymphocytes. *Cancer Res* 1991 ; 51 : 6001-5.
55. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce C. The t(14 ; 18) translocation involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985 ; 229 : 1390-3.
56. Wyatt RT, Rudders RA, Zelenetz A, Delellis RA, Krontiris TG. *BCL2* oncogene translocation is mediated by a chi-like consensus. *J Exp Med* 1992 ; 175 : 1575-88.
57. Jaeger U, Purtscher B, Karth GD, 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.
58. Bernard O, Lecoite N, Jonveaux P, Souyri M, Mauchauffe M, Berger R, Larsen CJ, Mathieu-Mahul D. Two site-specific deletions and t(1 ; 14) translocation restricted to human T-cell acute leukemias disrupt the 5' part of the *TAL-1* gene. *Oncogene* 1991 ; 6 : 1477-88.
59. Deane M, Norton J. Detection of immunoglobulin gene rearrangement in B cell neoplasias by polymerase chain reaction gene amplification. *Leuk Lymphoma* 1991 ; 5 : 9-22.
60. Taylor J, Rowe D, Williamson I, Christmas S, Proctor S, Middleton P. Detection of T-cell receptor γ chain V gene rearrangements using the polymerase chain reaction : application to the study of clonal disease cells in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1991 ; 77 : 1989-95.

nale) inhibe le réarrangement V(D)J, notamment au niveau du deuxième chromosome homologue. Des expériences de transgénèse ont montré que cette inhibition est associée à une diminution de l'expression de transcrits non réarrangés. On peut donc supposer que la production d'une chaîne complète inhibe, *via* un mécanisme transcriptionnel, l'accessibilité du *locus*. Les signaux responsables de cette inhibition restent inconnus. Il est cependant intéressant de noter que l'exclusion allélique au niveau du *locus TCR β* est perdue dans des souris transgéniques dont la tyrosine kinase *lck* est inhibée par un transgène codant pour un mutant dominant négatif *lck* [39]. On pourrait donc supposer que l'expression d'une chaîne complète *TCR β* pourrait, à l'inverse, activer la tyrosine kinase *lck*. La cible transcriptionnelle potentielle de *lck* reste inconnue. Le candidat devrait être un facteur permettant d'éteindre spécifiquement la transcription germinale des segments *V β* . Un modèle voisin peut être construit pour l'exclusion allélique des réarrangements des chaînes lourdes d'Ig dans les cellules B. L'influence de la méthylation des résidus CpG sur la recombinaison V(D)J a été très fortement suggérée par des expériences étudiant le réarrangement de substrats de recombinaison [40], ainsi que par des expériences de transgénèse [41]. Globalement, l'hyperméthylation inhibe la recombinaison et l'hypométhylation exerce un effet inverse. L'effet de l'hyperméthylation est plus net après réplication du substrat qui fige la chromatine hyperméthylée dans un état de moindre accessibilité [40]. Bien que la méthylation soit, elle-même, reliée à l'état transcriptionnel, il est possible que la méthylation, *per se*, soit un facteur indépendant de régulation de la recombinaison. Au total, la fixation de protéines liant l'ADN sur des régions de régulation des gènes *Ig/TCR* peut donc potentiellement contrôler la recombinaison par de multiples voies incluant la transcription des segments et le maintien de la chromatine dans une position ouverte. Bien que, dans de nombreux modèles, la

transcription soit un corollaire de la recombinaison V(D)J, il est envisageable de dissocier ces deux phénomènes [42] puisque la transcription n'est qu'un des mécanismes qui permettent l'ouverture chromatinienne.

Anomalies de la recombinaison chez l'homme

Quatre types d'anomalies de la recombinaison V(D)J ont été décrits chez l'homme.

Absence de recombinaison V(D)J due à des anomalies du gène *RAG2* transmises génétiquement

Comme cela a été cité plus haut, la suppression homozygote du gène *RAG2* par recombinaison homologue entraîne, chez la souris, un déficit combiné sévère (DICS) dû à l'absence de recombinaisons V(D)J. Des résultats préliminaires suggèrent qu'une forme rare de DICS familial humain pourrait être due à des anomalies génétiques touchant le gène *RAG2* (K. Bartram, communication personnelle).

Anomalie du mécanisme de la recombinaison : le SCID (B-) humain

Une autre forme rare de déficit immunitaire est caractérisée par l'absence complète de cellules B. Une étude récente a caractérisé les réarrangements chez six malades SCID (B-). Des délétions importantes ont été observées. Cette anomalie moléculaire est proche de celle du SCID murin [43].

Perte de la spécificité de lignée de la recombinaison V(D)J

Il est généralement admis que les recombinaisons complètes des gènes d'Ig et de *TCR* sont spécifiques des lignées B et T respectivement. Cette spécificité est perdue dans les proliférations lymphoïdes immatures de la lignée B (leucémie aiguë lymphoblastique (LAL-B)). Les gènes *TCR β* , *TCR γ* et *TCR δ* sont remaniés sur au moins un allèle dans 30, 50 et 80 % des cas respectivement [44-46]. Ces réarrangements utilisent les mécanismes normaux de la recombinaison V(D)J. Dans la plupart des cas, ils impliquent des segments qui réarrangent précocement, au cours de l'ontogénie thymique. Les réarrange-

ments des gènes *TCRβ* sont des exceptions notables. Ils consistent en des réarrangements complets *Vβ(Dβ)Jβ* [47]. Le réarrangement des segments *Vβ* est un événement relativement tardif très finement réglé ainsi que le montre l'étude des cellules B de certains modèles transgéniques. Cette perte de spécificité évoque une anomalie de la régulation de l'accessibilité des *loci* à la recombinaison *V(D)J*. Ces anomalies pourraient être dues à une expression anormale de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la transcription germinale des segments du TCR. La dérégulation de ces facteurs pourrait, en outre, jouer un rôle dans l'oncogenèse de ces cellules.

Recombinaisons illégitimes

Les recombinaisons *V(D)J* inter-*loci* (ou *trans*-réarrangements) intéressent deux *loci* *Ig/TCR* distincts codant pour des chaînes de récepteurs de l'antigène. Elles engendrent des anomalies chromosomiques qui sont détectables par l'étude cytogénétique. L'anomalie la plus fréquente est l'inversion *inv(7)(p15,q35)*. La fréquence de ces anomalies cytogénétiques est très faible dans le sang d'individus normaux. Ces réarran-

gements sont détectables avec une fréquence appréciable chez les individus atteints d'ataxie-télangiectasie [48]. Cette maladie génétique rare, autosomique, récessive, est caractérisée par des troubles neurologiques, des télangiectasies, une instabilité chromosomique et une prédisposition aux cancers et, notamment, aux proliférations lymphoïdes (*m/s n°1, vol. 9, p. 100*). Ces réarrangements intergéniques font appel aux mécanismes habituels de la recombinaison *V(D)J* [49]. La recombinaison de substrats est normale dans l'ataxie-télangiectasie [48] ainsi que dans le syndrome de Bloom (*m/s n° 5, vol. 3, p. 304*) et dans le déficit en ADN ligase I [50]. Les réarrangements intergéniques peuvent potentiellement coder pour des chaînes hybrides (*Vγ-Jβ-Cβ* par exemple). Ils pourraient être le témoin d'une prédisposition (génétique et/ou épigénétique) aux hémopathies lymphoïdes. Cette hypothèse est confortée par la fréquence des hémopathies lymphoïdes chez les patients ataxiques et par une étude récente montrant l'augmentation de la fréquence de ces recombinaisons chez des agriculteurs exposés aux pesticides dans une région des États-Unis où la pré-

valence des cancers lymphoïdes est particulièrement élevée [51].

Les réarrangements trans-alléliques d'un même *locus* utilisant les deux chromosomes homologues témoignent d'un mécanisme voisin de celui impliqué dans les réarrangements inter-*loci*. La fréquence de ces événements a été analysée pour le *locus TCR* murin : ils sont très rares [52].

Translocations et autres remaniements chromosomiques impliquant des oncogènes putatifs

On estime qu'environ 10^5 heptamères pouvant servir de cibles à la recombinaison *V(D)J* sont répartis sur l'ensemble du génome. Il existe donc un risque d'instabilité du génome dans les cellules lymphoïdes immatures. Le risque de recombinaisons illégitimes ciblées sur ces heptamères est cependant réduit par la faible efficacité des RSS ne comportant qu'un heptamère et par la mise en jeu des mécanismes qui contrôlent l'accessibilité de la chromatine à la recombinaison (transcription, méthylation des CpG, sites d'attachement à la matrice nucléaire, etc.). L'efficacité de la recombinaison peut également être réduite lorsque les pseudo-RSS s'écartent du consen-

Tableau I

PRINCIPALES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DE STRUCTURE IMPLIQUANT LES GÈNES *Ig/TCR*

Anomalie	Prolifération	Oncogène potentiel	Segment des gènes <i>Ig/TCR</i>
Hémopathies de la lignée B			
t(8;14) (q24;q32)*	Proliférations de type Burkitt	<i>C-MYC</i>	J_{Hr}, S
t(11;14) (q23.3;q32)	Lymphomes malins (du manteau)	<i>BCL1</i>	J_H
t(14;18) (q32;q21)	Lymphomes centrofolliculaires	<i>BCL2</i>	J_H
t(14;19) (q32;q13.1)	LLCB	<i>BCL3</i>	J_H
Hémopathies de la lignée T			
t(1;14) (p32;q11)	LAL-T	<i>TAL1</i>	Dδ
t(7;9) (q35;q34)	LAL-T	<i>TAN-1</i>	$J_β$
t(7;19) (q35;q13)	LAL-T	<i>LYL-1</i>	$J_β$
t(8;14) (q24;q11)	LAL-T	<i>C-MYC</i>	$V_{αr}, J_α$
t(10;14) (q24;q11)	LAL-T	<i>Hox-11</i>	Dδ
t(11;14) (p13;q11)	LAL-T	<i>Rhom-1</i>	Dδ
t(11;14) (p15;q11)	LAL-T	<i>Rhom-2</i>	Dδ
t(X;14) (p15;q11)	Leucémies prolymphocytaires T	MTCP-1	$J_{αr}, Dδ$
<i>inv(14;14) (q11;q32.1)</i>	Leucémies prolymphocytaires T	14q32	$J_α$

* variantes impliquant les chaînes légères.

LLC : leucémie lymphoïde chronique ; LAL : leucémie aiguë lymphoblastique.

RÉFÉRENCES

61. Beldjord K, Beldjord C, Macintyre E, Even P, Sigaux F. Peripheral selection of V δ 1+ cells with restricted T cell receptor δ gene junctional repertoire in the peripheral blood of healthy donors. *J Exp Med* 1993 ; 178 : 121-7.
62. d'Auriol L, Sigaux F. The detection of minimal residual disease (MRD) in acute lymphoblastic leukemia using clone-specific probes directed against V(D)J junctional sequences. In : Mullis K, Ferré F, Gibbs R, eds. *The polymerase chain reaction*. Boston : Birkhauser, 1994.
63. Potter MN. The detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev* 1992 ; 6 : 68-82.
64. d'Auriol L, Macintyre E, Galibert F, Sigaux F. *In vitro* amplification of T-cell γ genes rearrangements : a new tool for the assessment of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 1989 ; 3 : 155-8.
65. Macintyre E, d'Auriol L, Duparc N, Leverger G, Galibert F, Sigaux F. Use of oligonucleotide probes directed against T cell antigen receptor gamma delta variable-(Diversity)-joining junctional sequences as a general method for detecting minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias. *J Clin Invest* 1990 ; 86 : 2125-35.
66. Tycko B, Palmer JD, Link MP, Smith SD, Sklar J. Polymerase chain reaction amplification of rearranged antigen receptor genes : possible application for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. In : Furth M, Greaves M, eds. *Molecular diagnosis of human cancer*. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 : 47-52.
67. Yamada M, Hudson S, Tournay O, Bittenbender S, Shane S, Lange B, Tsujimoto Y, Caton A, Rovera G. Detection of minimal disease in hematopoietic malignancies of the B-cell lineage by using third-complementarity-determining region (CDR-III)-specific probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 5123-7.
68. Beishuizen A, Verhoeven M, van Wering E, Hahlen K, Hooijkaas H, van Dongen J. Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis and subsequent relapse : implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. *Blood* 1994 ; 83 : 2238-47.
69. Bird J, Galli N, Link M, Sites D, Sklar J. Continuing rearrangement but absence of somatic hypermutation in immunoglobulin genes of human B cell precursor leukemia. *J Exp Med* 1988 ; 168 : 229-45.

sus ou lorsque la distance entre elles n'est pas favorable. Il n'existe pas actuellement d'estimation de la fréquence des recombinaisons illégitimes de ce type dans les cellules lymphoïdes. Dans un certain nombre de cas, ces recombinaisons sont probablement tolérées et n'affectent que peu les fonctions cellulaires [53]. Un exemple de ce type est la recombinaison survenant au sein du gène *HPRT* (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase) et détectée dans les lymphocytes T [53, 54]. Dans d'autres cas, il est probable que les réarrangements interrompant des gènes vitaux pour la cellule sont incompatibles avec sa survie. De tels événements sont en pratique difficiles à mettre en évidence. Enfin, de telles recombinaisons peuvent entraîner un avantage sélectif pour la cellule. Cette situation est celle qui est observée dans le cas des anomalies cytogénétiques associées aux tumeurs lymphoïdes. A ce jour, de très nombreuses translocations impliquant les gènes *Ig* et *TCR* ont été décrites dans les cellules lymphoïdes malignes. Les principales sont données dans le *Tableau I*. Des analyses moléculaires détaillées de ces anomalies chromosomiques ont montré qu'il s'agit d'anomalies de structures qui font intervenir la recombinaison V(D)J au moins pour l'implication de l'un des partenaires. L'étude du point de translocation au niveau du partenaire *Ig/TCR* montre que la recombinaison se fait au voisinage des RSS, et s'associe à des délétions et des additions de séquences N. Dans un certain nombre de cas, des séquences compatibles avec des RSS fonctionnelles ont été retrouvées à proximité du point de cassure de l'oncogène présumé [55]. Cette situation n'est pas constante. D'autres séquences favorisant la recombinaison ont été trouvées dans d'autres cas (notamment séquences homopurines-homopyrimidines [56] ressemblant aux séquences CHI de *E. coli* et pouvant lier des protéines [57]). Une conformation particulière de l'ADN (ADN Z) pourrait, elle aussi, favoriser le réarrangement. Le réarrangement chromosomique ne correspond pas toujours à la ligation des extrémités correspondant à deux points de cassure mais pourrait être

expliqué par une triple coupure. Deux points de cassure correspondraient alors à une tentative de recombinaison D-J, par exemple, au sein du locus *Ig/TCR* et le troisième serait situé au sein de l'oncogène. Dans ce cas, la translocation peut ne pas être équilibrée, la recombinaison V(D)J normale aboutissant à une boucle d'excision qui serait secondairement perdue.

Une situation particulière est réalisée par la recombinaison *SIL-TALI* qui survient dans 10-20 % des LAL de la lignée T [58]. Dans ce cas, le réarrangement correspond à une délétion survenant entre deux séquences de recombinaisons localisées sur le chromosome 1 à 90 kb l'une de l'autre en dehors de tout locus impliqué dans la recombinaison V(D)J normale.

Quel que soit le mécanisme de l'anomalie chromosomique, sa conséquence est l'activation du gène transloqué. Celle-ci peut être due à l'action d'un *enhancer* de gène *Ig/TCR* sur le promoteur du gène ou à un découplage de ce promoteur de ses régions normales de régulation. A l'extrême, cette situation aboutit à une expression ectopique du gène.

L'implication de la recombinaison V(D)J dans la genèse des remaniements chromosomiques suggère que ceux-ci ont lieu dans les cellules lymphoïdes immatures. De tels réarrangements sont observés dans les proliférations lymphoïdes immatures mais également dans certaines proliférations chroniques lorsque l'activation du gène transloqué et les autres événements oncogéniques précoces éventuels n'empêchent pas la différenciation cellulaire (par exemple, *BCL2*).

Caractérisation des séquences jonctionnelles V(D)J pour l'étude de la clonalité et de la maladie résiduelle dans les proliférations lymphoïdes

Le caractère aléatoire des séquences jonctionnelles a été utilisé pour construire des outils moléculaires permettant d'évaluer la clonalité ou

la polyclonalité des proliférations lymphoïdes et de détecter la maladie résiduelle.

Analyse de la clonalité

Lorsqu'une expansion clonale se développe à partir d'une cellule qui a réarrangé une chaîne d'Ig/TCR et en l'absence de modification secondaire du réarrangement, toutes les cellules du clone partagent ce même remaniement et donc la même séquence jonctionnelle. Cette constatation est à la base de l'étude de la clonalité par électrophorèse des jonctions V(D)J après PCR [59, 60]. Ces techniques exploitent la taille des jonctions après une amplification utilisant des amplimères reconnaissant des séquences localisées sur les séquences codantes V ou J, et situées à distance du point de jonction. Dans des cellules polyclonales, les altérations aléatoires de séquences (délétions et additions) rendent les tailles de jonctions hétérogènes. Un clone se caractérise par une homogénéité de taille des jonctions. Les meilleurs marqueurs pour ce type d'étude sont les réarrangements VH(DH)JH pour les cellules B et les réarrangements V γ -J γ pour les cellules T. La technique peut être simplifiée par l'utilisation d'oligonucléotides consensus reconnaissant plusieurs segments V ou J. En fonction des amplimères utilisés, la méthode détecte entre 75 % et 85 % des réarrangements clonaux des chaînes lourdes d'Ig (toutes maladies confondues). L'existence de mutations somatiques dans les régions reconnues par les amplimères et des délétions extensives des extrémités codantes expliquent une part des 15-25 % faux négatifs. Les amplimères V γ -J γ détectent plus de 90 % des clones T ($\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$).

La sensibilité de détection après migration sur gel d'acrylamide et coloration au bromure d'éthidium se situe entre 1 % et 10 %. Une meilleure sensibilité peut être obtenue en marquant les produits d'amplification par un isotope, en effectuant une migration sur gel mince d'acrylamide en conditions dénaturantes et en autoradiographiant le gel. Une alternative efficace consiste à utiliser l'électrophorèse capillaire. Des variantes techniques prenant en compte, outre la taille des jonctions, leurs séquences nucléotidiques ont

été décrites. Elles font appel à l'étude de la conformation des ADN simple-brin sur gel non dénaturant [61] ou à la migration d'ADN double-brin sur un gel comportant un gradient de dénaturation.

Étude de la maladie résiduelle

Une avancée spectaculaire dans l'étude de la maladie résiduelle des proliférations lymphoïdes a été permise par les techniques basées sur des sondes spécifiques de séquences jonctionnelles V(D)J [62, 63]. Cette stratégie consiste à caractériser les réarrangements des gènes *Ig/TCR* dans les cellules tumorales prélevées au moment du diagnostic, à construire des sondes spécifiques après amplification par PCR des jonctions et séquençage, puis à utiliser ces sondes pour détecter des produits d'amplification obtenus à partir d'échantillons prélevés au cours de la maladie [64-67]. La spécificité de cette méthode est quasi absolue et la sensibilité est de l'ordre de $10^{-4}/10^{-5}$. De nombreuses variantes techniques ont été publiées.

Une des difficultés de cette stratégie réside dans la possibilité de réarrangements secondaires qui, pour les LAL et pour chaque chaîne, est de l'ordre de 15-20 % [68]. Il est donc préférable d'utiliser au moins deux sondes spécifiques pour chaque patient. L'existence de réarrangements de gènes d'Ig oligoclonaux dans certaines LAL de la lignée B [69] est un obstacle pour utiliser les réarrangements VH(DH)JH comme cibles uniques dans l'étude par PCR de la maladie résiduelle au cours de cette maladie.

La recombinaison V(D)J tient une place majeure dans la différenciation des cellules lymphoïdes. La plasticité du génome nécessaire à la génération de la diversité des récepteurs pour l'antigène expose à des accidents chromosomiques qui, lorsqu'ils touchent des gènes critiques pour l'activation, la prolifération ou la différenciation cellulaire, peuvent participer à la transformation tumorale. La meilleure compréhension de la génération de la diversité de ces récepteurs a eu des retombées en hématologie clinique. Elle a permis la construction d'outils moléculaires nouveaux pour la caractérisation de la clonalité des proliférations lymphoïdes, et pour la

détection de la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës lymphoblastiques et les hémopathies lymphoïdes chroniques ■

Remerciements

L'auteur remercie Marc-Henri Stern pour sa lecture du manuscrit et ses suggestions.

Summary

Physiology and pathology of V(D)J recombination

V(D)J recombination involves gene segments which encode the amino terminal part of antigen receptor chains and is a fundamental event involved in the generation of mature B and T cells. Significant progress in the understanding of V(D)J recombination mechanisms was recently obtained by analyzing cells transfected with synthetic recombination substrates, studying SCID mice and cloning genes involved in gene rearrangements. In rare instances, recombination occurs between different *Ig/TCR* loci or involves genes distinct from those coding for Ig or TCR. In some cases, translocated genes activated by chromosomal rearrangement could be involved in the transformation of lymphoid cells. The randomness of the V(D)J junctional sequences has been used to design molecular tools allowing for the characterization of the clonal status of lymphoid disorders and that are of fundamental importance in detecting minimal residual disease.

TIRÉS À PART

F. Sigaux.

ERRATA

Physiologie et pathologie de la recombinaison V(D)J

François Sigaux

médecine/sciences n° 10, vol. 10, octobre 1994, pages 995-1005

La *figure 2* (p. 999) comportant une erreur, nous la republions dans ce numéro.

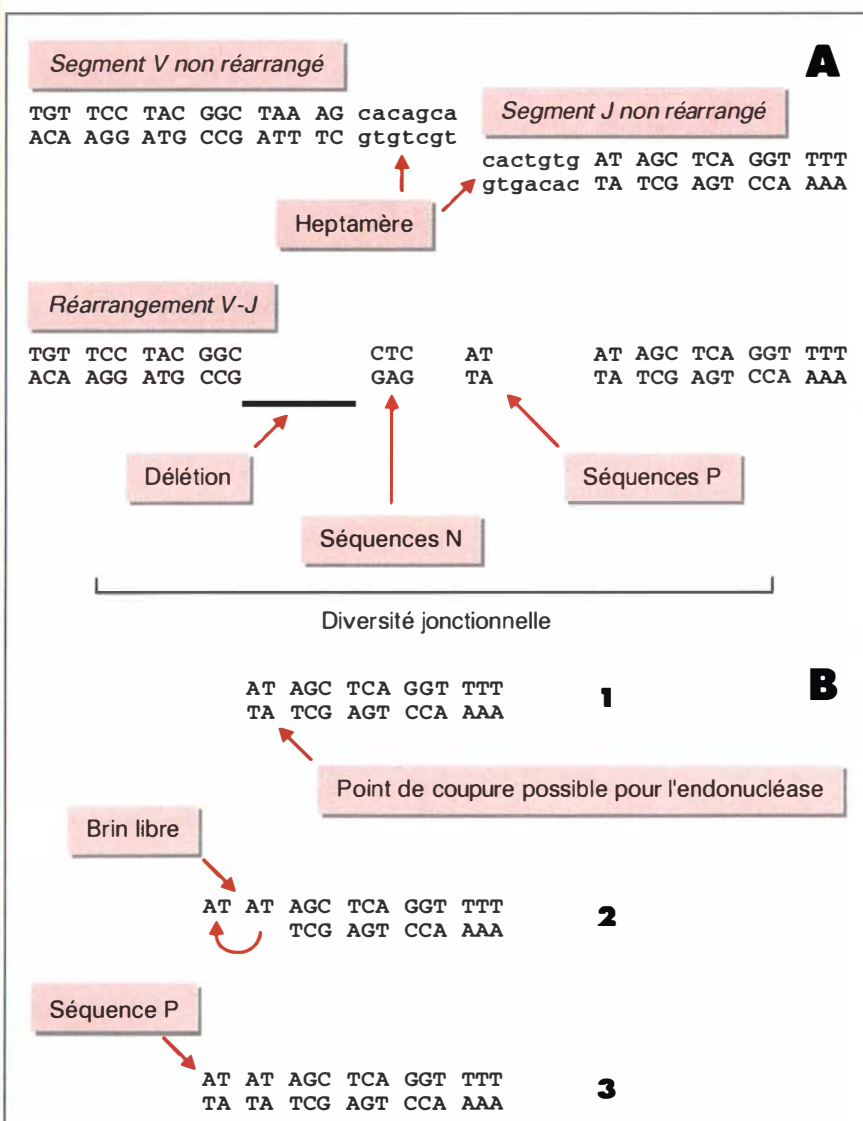


Figure 2. **Diversité jonctionnelle.** **A** : un réarrangement est montré. Les délétions, séquences N et séquences P contribuent à la diversité jonctionnelle. **B** : mécanisme possible de génération des séquences P [33]. **1** : Séquence avant la coupure par l'endonucléase. **2** : production du brin libre. **3** : séquence P obtenue après réparation.