

**Immuno-  
hématologie  
Virus**

**Un nouveau déficit immunitaire  
humain primitif non-XLA,  
caractérisé par un blocage précoce  
de la différenciation  
des lymphocytes B au stade proB**

La différenciation des cellules souches de la moelle osseuse en cellules B mûres est caractérisée par une succession d'étapes (figure 1) qui implique le réarrangement des locus H (chaînes lourdes) puis L (chaînes légères) des gènes des immunoglobulines et leur expression. Cette différenciation peut être aussi suivie par l'étude de l'expression en surface d'un ensemble de protéines répertoriées en *clusters*

de différenciation (CD). Ainsi, le CD34 est un marqueur des cellules souches hématopoïétiques humaines et l'apparition des marqueurs CD10 puis CD19 reflète l'engagement des précurseurs hématopoïétiques dans la lignée lymphoïde B. Au stade préB, les cellules CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> ont réarrangé le locus H des chaînes lourdes des immunoglobulines et synthétisent des chaînes  $\mu$  intracytoplasmiques qui

peuvent s'associer à des pseudo-chaînes légères ( $\Psi$ L) constituées de deux protéines  $\lambda$ -like (ou  $\lambda$ 5 chez la souris) et VpréB. Une faible proportion des complexes  $\mu$ - $\lambda$ -like-VpréB peut alors être exprimée à la surface des cellules en association avec les modules de transduction  $Ig\alpha/Ig\beta$ . L'importance des différentes molécules qui constituent le récepteur préB a pu être clairement analysée

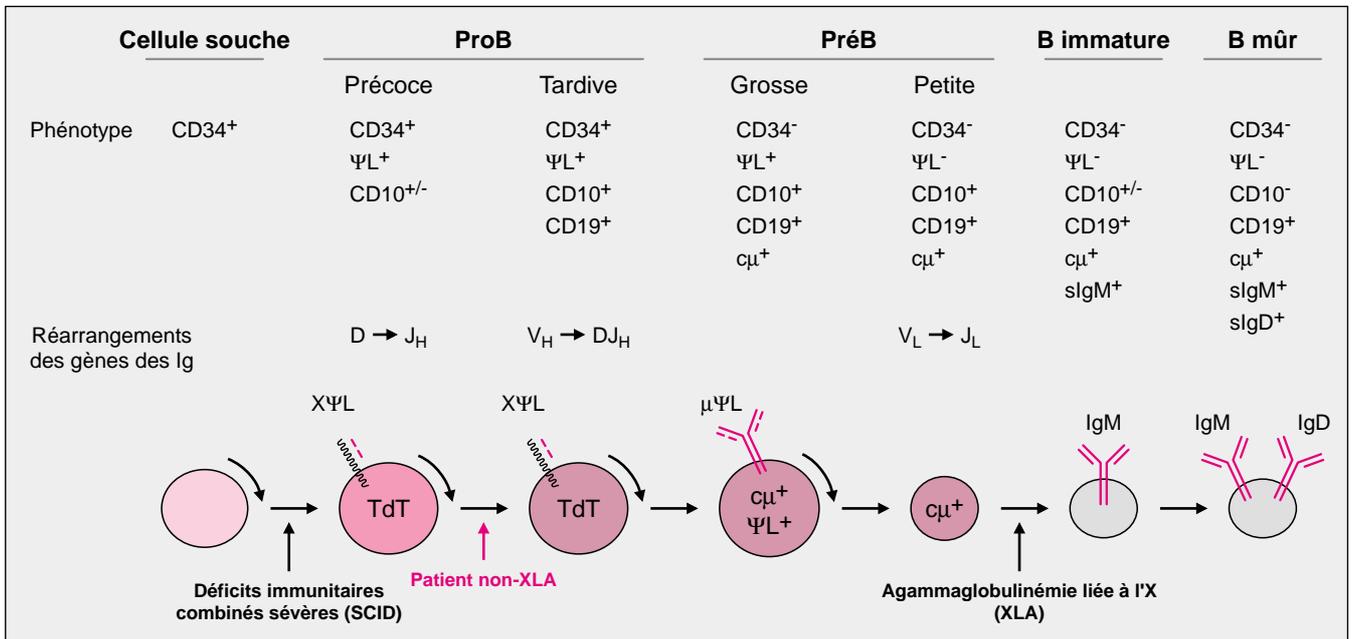


Figure 1. Principales étapes de la différenciation des lymphocytes B chez l'homme et différents niveaux de blocage dans les déficits immunitaires touchant la lignée B. Les étapes sont caractérisées (1) par l'expression de marqueurs de surface comme CD34, la pseudo-chaîne légère ( $\Psi$ L), CD10, CD19, IgM (slgM) ou IgD (slgD), ainsi que par l'expression de protéines intracytoplasmiques comme la terminal-désoxy-transférase (TdT) ou la chaîne lourde  $\mu$  d'Ig ( $c\mu$ ); (2) par l'état des réarrangements des gènes des Ig, d'abord ceux de la chaîne lourde (D-J<sub>H</sub> et V<sub>H</sub>-DJ<sub>H</sub>) puis ceux des chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$  (V<sub>L</sub>-J<sub>L</sub>). Cette différenciation peut être bloquée à différents stades, comme le montre l'étude de déficits immunitaires primitifs, soit au niveau des cellules souches (formes autosomiques de SCID), soit des petits lymphocytes préB (XLA), soit, comme nous le présentons ici, au niveau des cellules proB (déficit non-XLA).

chez la souris par inactivation génique et ces expériences ont montré que l'expression membranaire du complexe  $\mu$ - $\Psi$ L est nécessaire à la transition du stade préB au stade B. Récemment, nous avons identifié au sein de la fraction CD34<sup>+</sup> de la moelle osseuse des sous-populations proB, caractérisées par la présence en surface de la  $\Psi$ L en absence de la chaîne  $\mu$ , et qui expriment ou non les marqueurs CD10 et CD19 [1]. L'expression précoce de la  $\Psi$ L à ce stade pourrait constituer un marqueur d'engagement dans la différenciation B sans que la fonction d'un tel « récepteur proB » soit encore démontrée.

Parallèlement aux inactivations géniques chez la souris, l'étude de déficits immunitaires humains constitue une autre approche de l'analyse des molécules impliquées dans la différenciation lymphocytaire B (figure 1). Parmi ces immunodéficiences, l'agammaglobulinémie liée au chromosome X (XLA pour *X-linked agammaglobulinemia*), appelée aussi maladie de Bruton, a été l'une des premières immunodéficiences décrites et, *a priori*, la seule qui affecte chez l'homme spécifiquement et exclusivement les cellules B [2, 3]. Les malades atteints de ce syndrome souffrent d'infections récurrentes pyogéniques (otites, sinusites, conjonctivites...) et ont des concentrations d'immunoglobulines sériques très diminuées, conséquence d'une quasi-absence de lymphocytes B circulants (moins de 1% de cellules CD19<sup>+</sup> contre 5% à 15% chez les individus normaux). Chez ces patients, on ne détecte pas non plus de centres germinatifs dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions ou rate). L'étude des précurseurs B médullaires a révélé que si le compartiment des cellules proB CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> ne semble pas affecté et peut même être amplifié, il existe généralement un blocage de la différenciation B au stade préB CD34<sup>-</sup>CD10<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>c $\mu$ <sup>+</sup>sIgM<sup>-\*</sup>, avant l'expression d'une IgM à la surface des cellules et après l'arrêt de l'expression de la terminal-désoxytransférase (TdT) (figure 1). Ce blocage n'est pas dû à un défaut du micro-environnement stromal mais bien à un défaut

intrinsèque des lymphocytes B, comme cela a été démontré par l'analyse de l'inactivation de l'X chez les mères vectrices. En effet, alors que les cellules T ou granulocytaires de ces mères montrent une inactivation aléatoire d'un chromosome X, les cellules B utilisent systématiquement le chromosome X qui ne porte pas la mutation, démontrant que les cellules B qui possèdent le chromosome muté sont contre-sélectionnées. Le gène impliqué dans cette maladie a été identifié et code pour une protéine tyrosine kinase cytoplasmique appelée *btk* (*Bruton tyrosine kinase*) (*m/s n° 3, vol. 9, p. 332*). Cette kinase est impliquée dans les cascades d'activation induites, entre autres par les récepteurs préB ou B, et conditionnerait les étapes de prolifération des précurseurs B. L'analyse des immunodéficiences de type XLA a révélé que 10% des patients sont des filles [4]. Il est très improbable que ces filles soient homo-

zygotes pour une mutation du gène *btk*, car l'incidence de cette mutation dans la population est faible (1/300 000) et qu'il n'existe pas de garçon atteint de XLA dans les familles de ces filles immunodéficientes. Les analyses chromosomiques des cellules de ces patientes n'ont révélé aucune translocation ni délétion ou insertion sur le chromosome X. Ces patientes semblent donc affectées par des déficits autosomiques dont les gènes mutés induiraient un phénotype semblable à celui du XLA. L'identification de ces gènes permettrait de découvrir d'autres molécules importantes dans la différenciation médullaire B humaine. Nous avons étudié le cas d'une fillette (18 mois) née de parents consanguins qui présentait tous les symptômes d'un XLA, c'est-à-dire des infections récurrentes, une sévère agammaglobulinémie et une absence de lymphocytes B CD19<sup>+</sup> périphériques alors que les autres compartiments cellulaires san-

**Tableau I**  
ANALYSES PHÉNOTYPIQUES ET TRANSCRIPTIONNELLES  
DES CELLULES MÉDULLAIRES DU PATIENT NON-XLA COMPARÉES  
À CELLES D'UN ENFANT DU MÊME ÂGE

	Patient non-XLA	Témoin
<b>Phénotypes</b>		
<b>% des cellules lymphoïdes</b>		
CD34	13	15
$\Psi$ L	2	4
CD10	7	42
CD19	2,5	47
CD20	1	27
sIgM	0	22
<b>Transcrits (RT-PCR)</b>		
<i><math>\lambda</math>-like/VpréB</i>	++	++
Rag-1/Rag-2	++	++
TdT	+++	+++
Id	+++	+++
IL-7R $\alpha$	+++	+++
Btk	++	++
E2A	+	++
CD10	+	+++
Syk	+	++
Pax-5	+/-	+++
CD19	+/-	+++
Ig $\alpha$ /Ig $\beta$	+/-	+++
V <sub>H</sub> -C $\mu$	+/-	+++
V <sub>K</sub> -C $\kappa$	-	+++

\* c $\mu$ : chaîne lourde  $\mu$  d'Ig intracytoplasmique; sIgM: IgM de surface.

$\Psi$ L: pseudo-chaîne légère; Rag: recombination activating gene; TdT: terminal-désoxy-transférase, IL-7R: récepteur de l'interleukine 7; Btk: Bruton protein kinase; Syk: protéine tyrosine kinase.

guins n'étaient affectés ni dans leurs phénotypes, ni dans leurs fonctions [5]. Le caryotype normal excluait un syndrome de Turner ou une translocation autosomique de l'X. L'analyse de l'inactivation du chromosome X chez la mère montra une inactivation aléatoire de ce chromosome dans les lymphocytes B. La mère de cette patiente n'était donc pas vectrice du XLA et, comme le père n'était pas affecté par cette maladie, l'hypothèse d'un XLA pour cette patiente était exclue. La consanguinité des parents plaide en faveur d'une origine autosomique récessive de ce nouveau syndrome. L'analyse des compartiments cellulaires de la moelle osseuse chez cette patiente (Tableau I) a révélé que, si le niveau d'expression de la  $\Psi$ L était normal sur les cellules médullaires CD34<sup>+</sup>, on ne retrouvait pas de cellules  $\Psi$ L<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> et quasiment pas de progéniteurs B CD19<sup>+</sup>. Les rares cellules CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> attestent cependant que l'engagement des cellules souches dans la lignée B se produit bien mais que le développement des progéniteurs B est bloqué très précocement, au stade proB, en l'absence de chaîne  $\mu$ . L'étude par RT-PCR (*reverse transcriptase-PCR*) de la transcription des gènes exprimés séquentiellement au cours de la différenciation B a confirmé la précocité du blocage (Tableau I). La transcription des gènes du premier groupe ( $\lambda$ -like, *VpreB*, *Rag-1*, *Rag-2*, *TdT*...) (*Rag*: complexes à activité de recombinase) (*m/s n° 8, vol. 6, p. 820*) qui sont exprimés très précocement au cours de l'ontogenèse B, ne semble pas diminuée. En revanche, la transcription des gènes du second groupe (*E2A*, *CD10*, *syk*,

*Pax-5*, *CD19*, *Ig $\alpha$* , *Ig $\beta$* , *V<sub>H</sub>-C $\mu$* , *V<sub>K</sub>-C $\kappa$* ...)\*) qui sont exprimés plus tardivement dans la différenciation lymphocytaire B est affectée à des degrés divers. L'absence de tout réarrangement des gènes des chaînes lourdes ou des chaînes légères des Ig démontre encore la précocité de ce blocage qui se produit donc bien au stade proB. Le phénotype observé chez notre patiente ressemble à celui des souris *Pax-5*<sup>-/-</sup> (*m/s n° 3, vol. 11, p. 482*) [5], mis à part le fait qu'elle ne souffre apparemment d'aucun problème du système nerveux central. L'analyse de la séquence codante du gène *Pax-5* chez cette enfant n'a cependant révélé aucune anomalie. L'implication de *Pax-5* dans ce déficit n'est toutefois pas exclue, soit directement en faisant intervenir une mutation dans des séquences régulatrices non codantes de ce gène, soit indirectement par le biais d'une autre protéine qui réglerait l'expression de *Pax-5*. La redondance d'autres protéines Pax, comme Pax-2, pourrait alors suppléer l'absence de molécules Pax-5 fonctionnelles dans le système nerveux central. Très récemment, l'inactivation du gène *Ig $\beta$*  (B29) chez la souris a aussi révélé un blocage de la différenciation B au stade proB et une implication potentielle d'Ig $\beta$  dans la régulation des réarrangements *V<sub>H</sub>-D<sub>J<sub>H</sub></sub>* [7]. Un défaut d'expression d'Ig $\beta$ , ou par analogie d'Ig $\alpha$ , pourrait donc peut-être engendrer un phénotype analogue à celui de notre patiente. Le clonage et le séquençage de ces transcrits permettront de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

\* *E2A*: facteur de transcription de la famille bHLH; *syk*: tyrosine kinase.

Un autre cas d'agammaglobulinémie sévère non-XLA touchant une petite fille a été rapporté par De la Morena *et al.* et semble assez similaire au nôtre dans la mesure où des transcrits  $\mu$  complets sont très peu exprimés [8]. Ces agammaglobulinémies pourraient constituer un nouveau type de déficit immunitaire primitif rare qui affecterait spécifiquement la différenciation des lymphocytes B médullaires au stade proB avant le stade préB où s'exprime le défaut du XLA.

C.S.

1. Meffre E, Fougereau M, Argenson JN, Aubaniac JM, Schiff C. Cell surface expression of surrogate light chain ( $\Psi$ L) in the absence of  $\mu$  on human pro-B cell lines and normal pro-B cells. *Eur J Immunol* 1996; 26: 2172-80.
2. Sideras P, Smith CI. Molecular and cellular aspects of X-linked agammaglobulinemia. *Adv Immunol* 1995; 59: 135-223.
3. De Saint-Basile G, Fischer A. Un modèle d'étude de la différenciation lymphocytaire: les déficits immunitaires héréditaires liés au chromosome X. *Med Sci* 1992; 8: 562-71.
4. Conley ME, Parolini O, Rohrer J, Campana D. X-linked agammaglobulinemia: new approaches to old questions based on the identification of the defective gene. *Immunol Rev* 1994; 138: 5-21.
5. Meffre E, LeDeist F, De Saint-Basile G, Deville A, Fougereau M, Fischer A, Schiff C. A human non-XLA immunodeficiency disease characterized by blockage of B cell development at an early proB cell stage. *J Clin Invest* 1996; 98: 1519-26.
6. Urbanek P, Wang ZQ, Fetka I, Wagner EF, Busslinger M. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* 1994; 79: 901-12.
7. Gong S, Nussenzweig MC. Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig $\beta$ . *Science* 1996; 272: 411-4.
8. De la Morena M, Haire RN, Ohta Y, Nelson RP, Litman RT, Day NK, Good RA, Litman GW. Predominance of sterile immunoglobulin transcripts in a female phenotypically resembling Bruton's agammaglobulinemia. *Eur J Immunol* 1995; 25: 809-15.

## LE COMITÉ CONSULTATIF NATIONAL D'ÉTHIQUE POUR LES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

a été créé en 1983 par le président de la République et est désormais inscrit dans la loi. Il rassemble une quarantaine de membres venant d'horizons très variés, qui réfléchissent aux dangers que les avancées de la science peuvent susciter. Organisme purement consultatif, sa mission est de « donner des avis sur les problèmes éthiques soulevés par les progrès de la connaissance dans les domaines de la biologie, de la médecine et de la santé et de publier des recommandations sur ces sujets ».

- Le Comité souhaitant participer à l'information du public et de toutes les professions intéressées publie, chaque trimestre, « **Les Cahiers du Comité consultatif national d'éthique** ».
- Chaque numéro des « **Cahiers du Comité** » est centré sur un thème ayant fait l'objet d'un avis récent du Comité. Il diffuse le texte intégral de l'avis accompagné de son rapport. Il présente une bibliographie, une étude de la situation à l'étranger et de libres propos d'intervenants extérieurs au Comité. Cette présentation des travaux du Comité faisant place à des données internationales, à de libres opinions permet d'avoir une appréciation plus globale des problèmes abordés.

**L'abonnement aux « Cahiers du Comité consultatif national d'éthique » (4 numéros par an) est de 185 F.**

Pour tout renseignement, s'adresser à madame Anne Bernard au Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé, 71, rue Saint-Dominique, 75007 Paris. Tél.: 01 44 42 48 52/53 - Fax: 01 44 42 48 48.