

Immunologie virologie

Contrôle de l'activité de recombinaison V(D)J dans les cellules lymphoïdes : un nouveau regard sur le rôle des éléments stimulateurs de la transcription

L'assemblage des exons codant pour les parties variables des molécules d'immunoglobulines (Ig) et du récepteur des cellules T (TCR) a lieu, respectivement, au cours de la différenciation des lymphocytes B et T par recombinaison somatique de deux ou trois types de segments géniques, V et J ou V, D et J [1, 2]. Les réactions de recombinaison font intervenir des séquences consensus désignées « séquences signal de recombinaison », adjacentes à chaque segment V, D et J, et fortement conservées entre les différents locus. Elles sont les cibles d'un complexe enzymatique de recombinaison, commun aux lymphocytes B et T, comprenant notamment les protéines RAG-1 et RAG-2, toutes deux nécessaires et suffisantes à la mise en route de la réaction proprement dite (*m/s* n° 8, vol. 6, p. 820). Ces recombinaisons sont strictement réglées selon le type de lymphocyte (B ou T) et le stade de différenciation dans une lignée donnée. De plus, pour la plupart de ces locus, l'assemblage d'un exon variable fonctionnel sur l'un des deux allèles entraîne l'arrêt des réarrangements sur l'allèle opposé (phénomène de l'exclusion allélique). La régulation des réarrangements est vraisemblablement réalisée par une modulation de l'accessibilité de chacun des locus ou parties de locus au complexe enzymatique de recombinaison, par le biais d'éléments régulateurs en *cis* [3]. La cor-

rélation observée entre transcription de segments géniques en configuration germinale et réarrangement de ces segments a clairement suggéré que les séquences impliquées dans la régulation de la transcription des locus Ig et TCR sont aussi des éléments réglant en *cis* le réarrangement. Cependant, et jusqu'à récem-

ment, le rôle primordial de ces séquences de régulation transcriptionnelle sur les recombinaisons V(D)J au niveau des locus endogènes restait à démontrer car la plupart des résultats publiés provenaient de l'étude de substrats artificiels de recombinaison intégrés dans le génome murin [2-4]. C'est mainte-

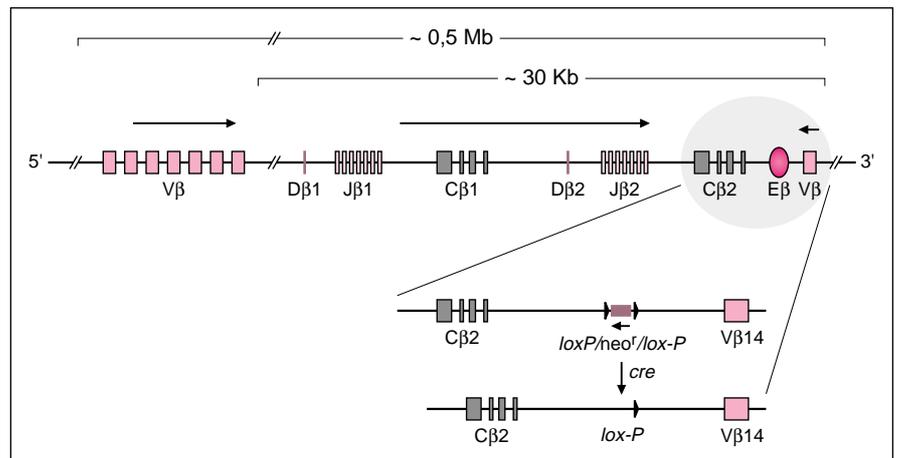


Figure 1. Organisation génomique du locus TCR β murin avant et après déletion de l'enhancer E β . Le locus TCR β murin s'étend sur environ 0,5 mégabase (Mb) au niveau du chromosome 6. Il comprend un ensemble de gènes V situés en 5' du locus (à l'exception du gène V β 14 qui se trouve à l'extrémité 3') et deux blocs formés chacun d'un segment D β , d'un groupe de segments J β et des exons d'une région constante C β (représentés par des rectangles). L'enhancer E β (ovale) est situé entre les séquences C β 2 et le gène V β 14 et ne représente qu'un court fragment de 560 paires de bases. La déletion de l'élément E β par recombinaison homologue dans des cellules ES suivie d'une recombinaison cre-loxP est décrite dans le texte. Les flèches horizontales indiquent le sens de la transcription.

nant chose faite avec la publication de deux études décrivant l'effet de la délétion de l'élément stimulateur de la transcription du locus TCR β ou *enhancer* E β murin sur les réarrangements de ce locus [5, 6].

Dans les deux études citées ci-dessus, le *enhancer* E β situé dans la partie 3' du locus TCR β (figure 1) a été remplacé par le gène de résistance à la néomycine (*neo^r*) flanqué de deux séquences *loxP*, par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires (cellules ES) murines. Le gène *neo^r* a été éliminé du génome des clones de cellules ES recombinantes par la transfection ultérieure dans ces cellules d'un vecteur d'expression codant pour la recombinase *cre* du bactériophage P1 [7, 8]. Les cellules ES ainsi modifiées (E β ^{-/-}) ont été injectées soit dans des blastocystes de souris dont le gène *Rag-2* est inactivé (blastocystes *Rag-2*^{-/-}) [5], soit dans des blastocystes de souris normales [6]. Les souris *Rag-2*^{-/-} étant totalement dépourvues de lymphocytes en raison de leur incapacité de réarranger leur locus Ig ou TCR, les lymphocytes présents dans les chimères *Rag-2*^{-/-} dérivent exclusivement des cellules ES injectées [9]. Ce système de complémentation a permis une analyse de l'effet de la délétion de E β sur les réarrangements du locus TCR β directement sur les chimères *Rag-2*^{-/-}-E β ^{-/-} [5]. Dans la seconde étude, les analyses ont été réalisées après transmission germinale de la mutation, et production d'animaux hétérozygotes (souris E β ^{+/-}) et homozygotes (souris E β ^{-/-}) [6]. Quelle que soit l'approche expérimentale utilisée, les analyses génomiques effectuées sur les lymphocytes de souris hétérozygotes (souris chimères *Rag-2*^{-/-}-E β ^{+/-} et souris E β ^{+/-}) ou homozygotes (souris E β ^{-/-}) n'ont pas mis en évidence de produits de recombinaison D-J et V-DJ du locus TCR β muté. La délétion de E β affecte également la transcription germinale en *cis*, bien que celle-ci ne soit pas totalement abolie. Aucun transcrit TCR β mûr (c'est-à-dire produit à partir d'un exon variable réarrangé) n'est cependant détecté dans les organes lymphoïdes des souris homozygotes E β ^{-/-}. Enfin, si les différentes populations de lymphocytes

sont normalement représentées chez les souris E β ^{+/-} (un allèle TCR β restant fonctionnel), les souris E β ^{-/-} sont, en revanche, sélectivement dépourvues de lymphocytes exprimant des molécules TCR β à leur surface. L'ensemble de ces résultats constitue la première démonstration qu'un élément *enhancer* de transcription est absolument requis pour la mise en route et/ou le déroulement des phénomènes de recombinaison V(D)J du locus auquel il est associé. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus lors d'études similaires portant sur la délétion d'éléments *enhancers* de transcription des locus *IgH* et *IgLK* [10-12]. Dans ces études (et à la condition que le gène *neo^r* ait été éliminé), les inhibitions de réarrangement observées au niveau de l'allèle muté par rapport à l'allèle sauvage ne sont pas totales, bien qu'il existe des différences importantes selon le locus et le type de segment. En accord avec ces observations, la délétion à l'état homozygote de ces éléments *enhancers* n'entraîne pas l'absence de la lignée lymphocytaire B [11, 12]. Ces résultats suggèrent que des éléments régulateurs additionnels sont présents dans les locus d'Ig, participant à des degrés divers au contrôle des réarrangements de ces locus. Dans ce contexte, il faut souligner que plusieurs éléments *enhancers* ont effectivement été décrits dans les locus *IgH* et *IgLK*.

Dans la publication de Bories *et al.* [5], sont également présentées les analyses de souris chimères obtenues après introduction, dans des blastocystes *Rag-2*^{-/-}, de cellules ES dans lesquelles E β a été remplacé par le *enhancer* intronique E μ du locus *IgH*. Le *enhancer* E μ présente la propriété de pouvoir activer la transcription à partir de promoteurs Ig ou TCR, dans les cellules des lignées lymphoïdes B et T. Deux types de chimères ont été engendrées selon que le gène *neo^r* a été éliminé ou non des cellules ES recombinées. Dans le premier cas, et dans ce cas seulement, le remplacement de E β par E μ permet l'obtention de réarrangements de l'allèle TCR β muté dans des lymphocytes de la lignée T. En revanche, ce même allèle ne présente pas de réarrangements dans les lymphocytes B,

et cela bien qu'une transcription germinale TCR β soit détectée. Comme dans le cas des expériences de ciblage génique des *enhancers* Ig citées plus haut, ces résultats suggèrent l'existence d'éléments régulateurs additionnels au niveau du locus TCR β , intervenant ici dans le contrôle de la spécificité tissulaire (T contre B) des recombinaisons V(D)J. Cependant, l'effet drastique de la délétion de E β au niveau des réarrangements TCR β tendrait à prouver qu'il n'y a pas de redondance fonctionnelle entre ces éléments et le *enhancer* E β .

La compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels ces éléments *enhancers* contrôlent les recombinaisons V(D)J reste cependant limitée. Dans tous les cas, l'effet s'exerce en *cis* puisque seuls les réarrangements de l'allèle muté sont affectés, et que la présence d'un *enhancer* sur l'allèle sauvage de souris hétérozygotes ne permet pas de restaurer les réarrangements sur l'allèle muté [6]. L'observation dans plusieurs études [3, 5, 6] d'une activité de transcription germinale sans induction obligatoire de réarrangement, semble éliminer une action qui serait déterminée par le seul biais du rôle stimulateur de la transcription classiquement reconnu à ces séquences. Une hypothèse serait que par l'intermédiaire des facteurs protéiques se fixant sur les *enhancers*, des modifications conformationnelles des séquences adjacentes ou des changements de localisation dans les sous-compartiments nucléaires soient induits, modifiant l'accessibilité du locus au complexe enzymatique de recombinaison. Enfin, les *enhancers* de transcription pourraient agir comme *enhancers* de recombinaison au niveau de la formation, de l'activation ou de la stabilisation des complexes [séquences signal de recombinaison/recombinase V(D)J], de façon analogue à certains *enhancers* de recombinaisons spécifiques de sites, décrits chez les procaryotes. Il faut souligner que ces différentes hypothèses ne s'excluent pas mutuellement. Par exemple, l'influence d'un même élément à la fois sur l'accessibilité aux enzymes de recombinaison des segments variables adja-

cents et sur la mécanique de la réaction V(D)J permettrait un contrôle d'autant plus rigoureux de ces réactions, tout en représentant une solution économique pour les cellules lymphoïdes.

F.W.
G.B.
P.F.

1. Sigaux F. Physiologie et pathologie de la recombinaison V(D)J. *Med Sci* 1994 ; 10 : 995-1005.
2. Lewis SM. The mechanism of V(D)J joining : lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv Immunol* 1994 ; 56 : 29-150.
3. Sleckman B, Gorman JR, Alt FW. Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements. *Annu Rev Immunol* 1996 ; 14 : 459-81.
4. Watrin F, Fernex C, Capone M, Horvat B, Caillol D, Ferrier P. Transgenic mouse models to study VDJ recombination. In: Bluethmann Horst, Ohashi Pam, eds. *Analysis of the immune system of mice utilizing transgenesis and targeted mutagenesis*. Florida : Academic Press, 1994 : 1-14.
5. Bories JC, Demengeot J, Davidson L, Alt FW. Gene-targeted deletion and replacement mutations of the T-cell receptor β -chain enhancer: the role of enhancer elements in controlling V(D)J recombinational accessibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 7871-6.
6. Bouvier G, Watrin F, Naspetti M, Verthuy C, Naquet P, Ferrier P. Deletion of the mouse T-cell receptor β gene enhancer blocks $\alpha\beta$ T-cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 7877-81.
7. Viville S. Recombinaison homologue : nouveaux vecteurs, nouvelles perspectives. *Med Sci* 1995 ; 11 : 735-46.
8. Babinet C. Un nouveau pas dans l'utilisation du système Cre-LoxP chez les cellules souches embryonnaires de souris : la création de remaniements chromosomiques. *Med Sci* 1995 ; 11 : 1154-7.
9. 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.
10. 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.
11. Xu Y, Davidson L, Alt FW, Baltimore D. Deletion of the Igk light chain intronic enhancer/matrix attachment region impairs but does not abolish V κ J κ rearrangement. *Immunity* 1996 ; 4 : 377-85.
12. Gorman JR, van der Stoep N, Monroe R, Cogné M, Davidson L, Alt FW. The Igk 3' enhancer influences the ratio of Igk versus Ig λ B lymphocytes. *Immunity* 1996 ; 5 : 241-52.

■■■ **Expression du ligand de Fas dans la thyroïde et maladie de Hashimoto.** La thyroïdite de Hashimoto est considérée comme une maladie auto-immune entraînant une destruction progressive de la thyroïde avec insuffisance hormonale. Cependant, l'infiltration lymphocytaire est pratiquement inexistante dans ces thyroïdes, si bien que les mécanismes de la destruction du tissu endocrine restent mystérieux. Plusieurs équipes italiennes associées de Palerme, Rome et Gênes (Italie) viennent de montrer que les cellules endocrines de la thyroïde expriment à leur surface, de manière constitutive, le ligand de Fas (Fas-L), mais pas ou peu le récepteur Fas. En revanche, ce récepteur Fas est retrouvé à la surface des cellules des malades atteints de thyroïdite de Hashimoto et les auteurs supposent que la synthèse par les mêmes cellules ou par des cellules adjacentes du récepteur pro-apoptotique Fas et de son ligand Fas-L est responsable de l'induction d'une apoptose, entraînant progressivement une destruction du tissu glandulaire [1]. Expérimentalement, il est possible d'induire la synthèse du récepteur Fas dans des thyrocytes en culture par un traitement à l'aide d'interleukine -1 β (IL-1 β). Les auteurs supposent, par conséquent, que de l'IL-1 β produit par une légère infiltration macrophagique, voire par des cellules endothéliales activées, entraîne l'apparition du récepteur Fas à la surface des thyrocytes qui possèdent déjà le Fas-L, ce qui induit la cascade apoptotique et entraîne la perte cellulaire. Cependant, l'apoptose relayée par Fas est habituellement un processus explosif et la destruction des thyrocytes par activation du récepteur Fas est, *ex vivo*, un phénomène rapide, ce qui contraste avec la très lente évolution de la thyroïdite de Hashimoto. Tout n'est donc pas dit dans la physiopathologie de cette maladie. Cependant, ces travaux ont le mérite d'attirer l'attention sur le fait que des processus auto-immuns

peuvent ne pas être le résultat d'une attaque tissulaire directe par des lymphocytes T cytotoxiques. Dans le cas présent, des lymphocytes T activés seraient d'ailleurs vraisemblablement éliminés, le Fas-L des thyrocytes activant le récepteur Fas lymphocytaire (*m/s n° 11, vol. 9, p. 1279 ; n° 2, vol. 10, p. 234 ; n° 12, vol. 11, p. 1756*).

[1. Giordano C, *et al. Science* 1997 ; 275 : 960-3.]

■■■ **Le succès de la greffe de cornée: encore le ligand de Fas!** La greffe de cornée est non seulement la transplantation d'organe la plus fréquente [1] mais aussi la plus riche en succès. Les explications n'ont pas manqué: le greffon n'est pas vascularisé, le tissu comporte peu de cellules présentatrices de l'antigène, la cornée élabore des molécules immunosuppressives... Mais la mise en avant du rôle du système Fas-ligand de Fas dans la tolérance immune a fait rechercher l'implication du système dans la tolérance à la greffe de cornée. La cornée humaine synthétise le ligand de Fas, et permettrait ainsi l'apoptose des lymphocytes T cytotoxiques exprimant Fas à leur membrane. Une étude de greffe de cornée allogénique chez la souris transgénique dépourvue, soit de gène *Fas*, soit du gène codant pour le ligand de Fas a permis de vérifier tout à fait cette hypothèse [2]. Les greffons *FasL⁺* sont acceptés pour 45 %, alors que les greffons *FasL⁻* ou les greffons normaux transplantés sur des souris *Fas⁻* sont rejetés à 100 %. Ces faits ne sont pas sans rappeler les défenses du testicule greffé (*m/s n° 12, vol. 11, p. 1756*)

[1. Houssin D. *Med Sci* 1997 ; 13 : 364-5.]

[2. Stuart PM, *et al. J Clin Invest* 1997 ; 99 : 396-402.]