

Ikaros, chromatine et contrôle du développement lymphocytaire

Les mécanismes moléculaires qui gouvernent la différenciation du système hématopoïétique à partir de cellules souches multipotentes restent largement inconnus. L'une des approches utilisées afin de les identifier est l'étude des facteurs de transcription réglant l'expression des gènes nécessaires à l'émergence des différentes lignées du système hématopoïétique.

Le gène *Ikaros* ou *LyF-1* [1, 2] a été caractérisé grâce à la capacité de la protéine produite de lier la région promotrice du gène *CD3d* et celle du gène de la TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*). Chez la souris, l'expression de ce gène est détectée dès 8 jours de développement (E8) dans le sac vitellin qui est le siège de l'hématopoïèse précoce. Il est aussi exprimé dans les thymocytes fœtaux et adultes ainsi que dans les lymphocytes T et B mûrs et dans les cellules NK (*natural killer*). Ce profil d'expression suggère un rôle prépondérant du facteur de transcription *Ikaros* au cours de la différenciation des cellules lymphoïdes. Cependant, les récentes analyses phénotypiques des souris mutantes pour *Ikaros* montrent que la fonction de ce gène n'est pas restreinte aux seules lignées lymphoïdes [3].

Le gène *Ikaros* code pour une protéine à « doigts de zinc » apparentée à la protéine Hunchback de drosophile [2]. Les 8 différentes isoformes d'*Ikaros* sont produites par épissage différentiel [4] et partagent deux domaines identiques: un domaine d'activation carboxy-terminal, deux domaines à doigts de zinc carboxy-terminaux responsables de la formation d'homodimères ou d'hétérodimères avec des protéines de la même famille multigénique, Aiolos [5] et Hélios [6] (*figure 1*). Cependant, chacune des 8 isoformes connues se distingue par une combinaison dif-

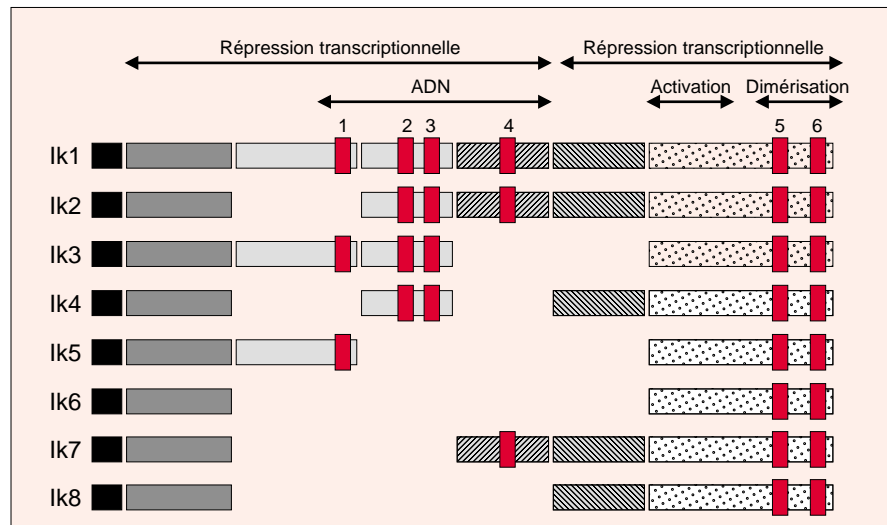


Figure 1. Représentation schématique des différentes isoformes de la protéine *Ikaros*. Les limites des exons sont indiquées. Les domaines codant pour les doigts de zinc sont en rouge et numérotés de 1 à 6. Les doigts F1 à F4 sont responsables de la capacité de liaison à l'ADN. Les doigts F5 et F6 permettent l'association avec les différents membres de la famille *Ikaros*. La fonction des différents domaines protéiques produits est indiquée. Les phénotypes des mutants correspondant à l'inactivation des différents domaines sont indiqués dans le Tableau I.

férente de 4 domaines à doigts de zinc dans le domaine amino-terminal de liaison à l'ADN [5, 7]. Comme au moins 3 des 4 domaines à doigts de zinc sont nécessaires pour la liaison à l'ADN, seules les isoformes 1, 2 et 3 d'*Ikaros* peuvent lier le motif consensus 5'-GGGAA-3'.

Les études génétiques entreprises afin de comprendre la fonction du gène *Ikaros* au cours du développement lymphoïde ont consisté à produire des souris mutantes. Deux types de mutations ont été produites par le même laboratoire. Le premier mutant a été produit par délétion des doigts de zinc 3 et 4 du domaine de liaison à l'ADN [8] : les souris mutantes ne présentent ni cellules T, B et NK ni leurs précurseurs les plus

précoces connus [8] alors que les autres lignages hématopoïétiques ne sont pas affectés par la mutation. Ces résultats mettaient en avant la nécessité de la protéine *Ikaros* pour la différenciation et/ou la prolifération d'un précurseur lymphoïde et suggéraient une intervention précoce de la protéine *Ikaros* au cours du développement lymphoïde.

Toutefois, l'analyse approfondie de ces souris mutantes révélait l'expression d'une forme dominante négative (DN) du gène *Ikaros*. Le domaine amino-terminal de dimérisation étant conservé, cette protéine peut encore interagir avec les protéines du groupe *Ikaros* (dont Aiolos, Hélios et Dédalos). Mais comme l'hétérodimère ne peut pas se lier à l'ADN, le

Tableau I
PHÉNOTYPE DES SOURIS AYANT UNE INACTIVATION
DU GÈNE *IKAROS*

Mutation	Phénotype
<i>Ikaros</i> ^{-/-} (doigts de zinc 1-4)	<ul style="list-style-type: none"> - Absence de Ly B, NK et T fœtaux - Différenciation préférentielle de Ly CD4⁺ chez l'adulte - Diminution des cellules dendritiques thymiques et des Ly T $\alpha\beta$ - Expansion de clones T
<i>Ikaros-DN</i> ^{-/-} (doigts de zinc 5-6)	<ul style="list-style-type: none"> - Absence de Ly T, B, NK et de cellules dendritiques
<i>Ikaros DN</i> ^{+/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Développement T normal - Prolifération accrue en réponse à l'activation du TCR - Émergence d'hémopathies lymphoïdes T

DN: dominant négatif; TCR: T cell receptor; Ly: lymphocytes.

phénotype de ces souris reflète donc probablement la perte de fonction de plusieurs membres de la famille Ikaros.

Une seconde mutation délétant l'exon 7 codant pour la partie amino-terminale d'Ikaros entraîne la perte totale de la protéine, et un réel phénotype nul. Le développement lymphocytaire y est également perturbé, mais moins que chez les souris DN. Il est probable que des protéines de la famille Ikaros compensent la perte d'Ikaros. Si les fœtus sont dépourvus de précurseurs T, une population de cellules T se développe en période post-natale, grâce à la fonction probable de la protéine Hélios. Enfin, un taux réduit de la protéine Ikaros (hétérozygotes DN^{+/-} ou homozygotes nuls) entraîne le développement d'hémopathies lymphoïdes T chez 100% des animaux, de même que l'absence de Aiolos conduit au développement de lymphomes B [9]. Tout l'intérêt de l'étude de la fonction de la protéine Ikaros vient de ce qu'elle est bifonctionnelle. Elle peut en effet fonctionner comme activateur transcriptionnel, rôle que l'étude des mutants lui avait initialement attribué, mais aussi comme répresseur transcriptionnel, ce que révèlent les études récentes, notamment du groupe de K. Georgopoulos [10].

Les premières indications suggérant un rôle d'Ikaros dans la répression

transcriptionnelle viennent d'expériences d'immunolocalisation. Ces expériences ont montré en microscopie confocale que la protéine est localisée principalement à proximité de l'hétérochromatine centromérique. Curieusement, cette distribution évolue au cours du cycle cellulaire. Le positionnement centromérique est mis en évidence aux cours des phases G1 et G2, et est perdu pendant la phase S du cycle cellulaire, la protéine Ikaros étant alors répartie uniformément dans le noyau [11]. Dès le début de la mitose, la protéine Ikaros n'est plus détectée jusqu'à l'anaphase. La présence d'une protéine clé du développement au niveau du centromère est surprenante compte tenu de la fonction de celui-ci dans la ségrégation des chromosomes [12]. Une autre constatation faite par le même groupe [11] suggère une corrélation entre le repositionnement nucléaire de certains locus et l'activité transcriptionnelle, les gènes inactifs étant localisés à proximité immédiate des domaines centromériques. Ces auteurs ont montré que dans les cellules B en phase G1/G2 du cycle cellulaire, les gènes réprimés (*CD4* et *CD8a*) sont associés aux régions centromériques alors que les gènes activement transcrits (*CD19* et *CD45*) sont associés à des régions euchromatiques. Cette observation s'est également révélée exacte pour deux gènes

différentiellement exprimés au cours du développement B: *15*, exprimé uniquement dans les cellules B immatures et *CD2*, d'expression restreinte aux cellules mûres. La co-localisation de ces gènes avec la protéine Ikaros et l'hétérochromatine centromérique n'est observée que dans les cellules dans lesquelles le gène n'est pas exprimé. Par ailleurs, Il est intéressant de constater qu'en l'absence d'Ikaros, l'expression de trois gènes liés au développement lymphoïde (deux récepteurs à activité tyrosine-kinase, c-kit et Flk-2, et le facteur de transcription GATA-3) est abolie. La localisation de la protéine Ikaros à proximité de domaines centromériques de cellules lymphoïdes en association avec des gènes réprimés suggère que la protéine Ikaros pourrait jouer un rôle répresseur en repositionnant les promoteurs des gènes cibles aux centromères [13]. Il est donc clair que la protéine Ikaros ne peut pas être considérée comme un simple activateur de la transcription comme cela avait initialement été décrit [2].

Cette fonction répressive des protéines Ikaros et Aiolos sur la transcription est accompagnée par l'hypoacétylation des histones dans les régions promotrices des gènes cibles. Par ailleurs, une fraction importante des protéines Ikaros et Aiolos est associée, dans le noyau des cellules T mûres, avec l'ATPase Mi-2 et les co-répresseurs mSin3, ainsi qu'avec des protéines du complexe SWI/SNF et des protéines ayant une activité histone désacétylase (HDAC-1, HDAC-2 et Rbp48) (*m/s* 1998, n° 4, p. 455-7; 1997, n° 10, p. 12105-11) probablement dans des complexes multimériques distincts participant à divers processus moléculaires (figure 2). Dans les cellules T activées, les complexes Ikaros-Mi2-HDAC, de par les propriétés de remodelage de la chromatine du complexe Mi2-HDAC, pourraient contrôler l'état d'acétylation des histones se liant à l'ADN néosynthétisé au cours de la phase S dans des régions hétérochromatiques inaccessibles. Ce mécanisme de répression transcriptionnel, associé au recrutement centromérique pourrait constituer l'une des bases moléculaires de la « mémoire » transcrip-

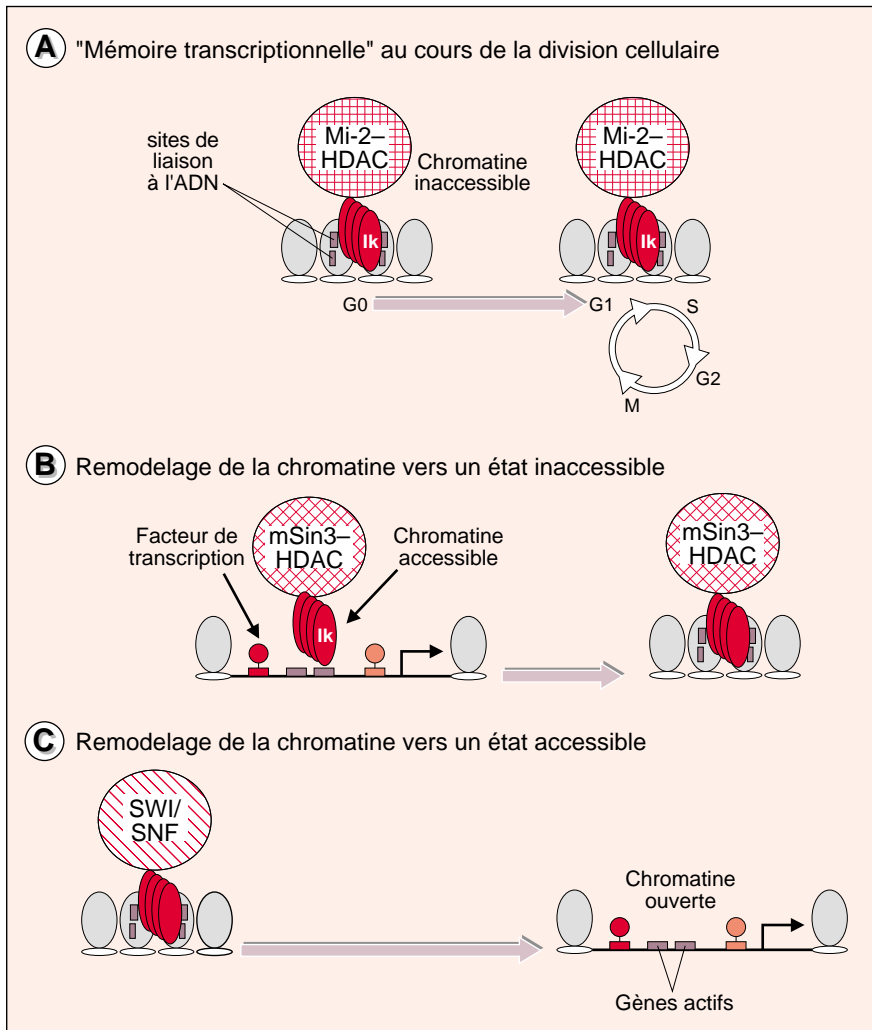


Figure 2. **Divers aspects de la fonction de remodelage chromatinien de la protéine Ikaros au sein de complexes moléculaires se liant à l'ADN.** Trois situations sont schématisées: **A.** la conservation de la chromatine dans un état d'inaccessibilité au cours du cycle cellulaire (= mémoire transcriptionnelle); **B.** répression transcriptionnelle par sa liaison au répresseur sin3 et à l'histone désacétylase (HDAC); **C.** création d'un état d'accessibilité chromatinienne par l'intermédiaire de sa liaison à SWI/SNF. (D'après [16].)

tionnelle au cours des cycles cellulaires [11, 14, 15]. Par ailleurs, les complexes Ikaros-Sin3-HDAC pourraient réprimer les gènes présents dans des régions chromatinienne plus accessibles, au niveau des promoteurs cibles [16].

La fonction des protéines de la famille Ikaros passerait donc par le recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine pour réprimer ou maintenir, au cours des cycles cellulaires, la répression de locus spécifiques du lignage lymphoïde. La participation d'Ikaros à des complexes

comprenant des histones désacétylases pourrait aussi expliquer le développement de tumeurs lymphoïdes chez les souris mutantes pour Ikaros, et peut-être dans le développement de LAL (leucémies aiguës lymphoïdes) chez des enfants exprimant des formes mutées d'Ikaros [17]. En effet, un recrutement anormal d'histone désacétylases a été observé dans diverses leucémies [18-21]. Les isoformes d'Ikaros incapables de se lier à l'ADN peuvent continuer à interagir avec les protéines mSin3 et HDAC. Une augmentation de l'expression de ces iso-

formes chez des patients atteints de LAL pourrait conduire, comme cela se produit chez les souris mutantes, à une titration des HDAC dans des complexes non fonctionnels, incapables de participer aux processus moléculaires normaux de transcription et/ou de réplication [10]. Des études dans les cellules T mutées dans *Ikaros* montrent par ailleurs des aberrations chromosomiques dont des délétions dans les régions centromériques [22] pouvant provenir d'un recrutement anormal d'HDAC à l'hétérochromatine centromérique, en l'absence d'Ikaros [10].

L'ensemble des résultats obtenus à ce jour, en particulier la localisation nucléaire d'Ikaros, et sa capacité d'activer la transcription, mais aussi de recruter des co-répresseurs transcriptionnels, et des désacétylases, indique que la protéine Ikaros est une protéine bifonctionnelle, et pourrait être un lien moléculaire entre la régulation de la structure de la chromatine et la différenciation lymphocytaire. Il paraît donc maintenant important de comprendre la fonction centromérique de la protéine Ikaros. L'identification de l'ensemble des protéines et des séquences d'ADN avec lesquelles Ikaros interagit devrait faciliter la compréhension de cette fonction ■

Rémi Terranova

Nathalie Coré

Malek Djabali

Centre d'immunologie Inserm-Cnrs de Marseille Luminy, Case 906, 13288 Marseille Cedex 9, France.

RÉFÉRENCES

1. Ernst P, Hahm K, Smale, ST. Both LyF-1 and an Ets protein interact with a critical promoter element in the murine terminal transferase gene. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 2982-92.
2. Georgopoulos K, Moore DD, Derfler B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* 1992; 258: 808-12.
3. Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Neben S, Friedrich C, Georgopoulos K. Defects in hematopoietic stem cell activity in *Ikaros* mutant mice. *J Exp Med* 1999; 190: 1201-13.

RÉFÉRENCES

4. Klug CA, Morrison SJ, Masek M, Hahn K, Smale ST, Weissman IL. Hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors express different Ikaros isoforms, and Ikaros is localized to heterochromatin in immature lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 657-62.
5. Molnar A, Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 8292-303.
6. Kelley CM, Ikeda T, Koipally J, et al. Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol* 1998; 8: 508-15.
7. Hahn K, Ernst P, Lo K, Kim GS, Turck C, Smale ST. The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 7111-23.
8. Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, et al. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 1994; 79: 143-56.
9. Georgopoulos K, Winandy S, Avitahl N. The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 155-76.
10. Koipally J, Renold A, Kim J, Georgopoulos K. Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO J* 1999; 18: 3090-100.
11. Brown KE, Guest SS, Smale ST, Hahn K, Merkschlager M, Fisher AG. Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* 1997; 91: 845-54.
12. Roizès G, Marçais B, Yurov Y. Les centromères des chromosomes de mammifères. *Med Sci* 1994; 10: 282-95.
13. Kim J, Sif S, Jones B, et al. Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* 1999; 10: 345-55.
14. Jeppesen P. Histone acetylation: a possible mechanism for the inheritance of cell memory at mitosis. *Bioessays* 1997; 19: 67-74.
15. Brown KE, Baxter J, Graf D, Merkschlager M, Fisher AG. Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell* 1999; 3: 207-17.
16. Cortes M, Wong E, Koipally J, Georgopoulos K. Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 167-71.
17. Sun L, Heerema N, Crotty L, et al. Expression of dominant-negative and mutant isoforms of the antileukemic transcription factor Ikaros in infant acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 19: 680-5.
18. Gelmetti V, Zhang J, Fanelli M, Minucci S, Pellici PG, Lazar MA. Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 7185-91.
19. Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 1998; 20: 615-26.
20. Wang J, Hoshino T, Redner RL, Kajigaya S, Liu JM. ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10860-5.
21. Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH Jr, Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998; 391: 811-4.
22. Avitahl N, Winandy S, Friedrich C, Jones B, Ge Y, Georgopoulos K. Ikaros sets thresholds for T cell activation and regulates chromosome propagation. *Immunity* 1999; 10: 333-43.

TIRÉS À PART

M. Djabali.

BRÈVES

■■■ **Mutation du gène CD45 et déficit immunitaire combiné sévère (DICS).** La tyrosine phosphatase CD45 exprimée par les cellules hématopoïétiques contrôle l'activation lymphocytaire T et B relayée par les Src kinases et induite en réponse à l'activation du récepteur de l'antigène. Un DICS lié à une mutation du gène CD45 vient d'être rapporté chez un enfant de 2 mois [1]. Les caractéristiques de ce déficit immunitaire sont une absence de centre germinatif dans les ganglions et l'absence d'expression de la molécule CD45. Le taux des lymphocytes T, ceux notamment qui expriment le récepteur T $\alpha\beta$, était effondré (8 % au lieu de 65 %). L'activation des lymphocytes T *in vitro* par les mitogènes habituels

était inefficace. Le taux des lymphocytes B était significativement augmenté (80 % des lymphocytes, au lieu de 20 % environ). Le taux des IgG, IgM et IgA, normal à l'âge de deux mois, s'effondrait au cours du temps. Le taux de lymphocytes NK (*natural killer*) était inférieur à la normale. Le patient est décédé à l'âge de 2 ans d'un lymphome. L'analyse du gène CD45 des deux parents et de l'enfant a montré, chez l'enfant, une délétion de la partie 3' du gène sur un allèle, retrouvée chez la mère, et une mutation au niveau d'un site d'épissage de l'exon 13 sur l'autre allèle, non retrouvée chez le père (comme le soulignent les auteurs, la paternité n'a pas été prouvée de manière génétique pour des raisons de pro-

tection de la vie privée). Le tableau clinique est tout à fait superposable à celui des souris ayant un gène CD45 inactivé : persistance d'une faible proportion de lymphocytes T non activables ; taux normal ou augmenté de lymphocytes B avec un taux d'immunoglobulines effondré, vraisemblablement lié à un défaut de maturation secondaire à l'absence d'activation par l'IgM de surface. La mutation du gène CD45 est donc une cause supplémentaire de DICS. Il s'agit de la première observation d'un déficit immunitaire lié à une anomalie d'une tyrosine phosphatase chez l'homme.

[1. Kung C, et al. *Nat Med* 2000; 6: 343-5.]