

## Un modèle d'étude de la différenciation lymphocytaire : les déficits immunitaires héréditaires liés au chromosome X

Cinq déficits immunitaires, dont la transmission est liée au chromosome X, se caractérisent par une anomalie de la différenciation lymphocytaire. Bien que l'anomalie moléculaire ne soit pas connue, des progrès récents ont été accomplis dans la caractérisation génétique de ces différents déficits. Les gènes en cause ont été localisés et leur nature ainsi que le stade de différenciation des cellules les exprimant ont été en partie élucidés. La description de déficits immunitaires de phénotype atténué suggère l'existence de mutations hétérogènes à un même *locus*. L'identification de ces gènes permettra de mieux connaître les mécanismes de la différenciation lymphocytaire et ouvrira sans doute de nouvelles possibilités thérapeutiques.

---

**Geneviève  
de Saint Basile  
Alain Fischer**

---

### ADRESSE

---

G. de Saint Basile : *chargée de recherche à l'Inserm, A. Fischer : professeur des universités, praticien hospitalier.* Développement normal et pathologique du système immunitaire, Inserm U. 132, hôpital des Enfants-Malades, 149, rue de Sèvres 75743 Paris Cedex 15, France.

**U**ne soixante de déficits immunitaires héréditaires ont été identifiés. Fort peu sont aujourd'hui caractérisés sur le plan moléculaire. En dehors des déficits en fractions du complément, de certaines anomalies métaboliques enzymatiques (adénosine désaminase, purine nucléoside phosphorylase) et du défaut d'expression des protéines d'adhérence leucocytaire (anomalie de la chaîne  $\beta$  des intégrines de la famille  $\beta 2$ ), plus récemment caractérisé, les gènes responsables et leurs mutations ne sont pas connus. Sept déficits immunitaires sont transmis de façon récessive liée au chromosome X. Il s'agit de la forme la plus fréquente de granulomatose sep-

tique chronique (GSC), du déficit en properdine (composé de la voie alterne du complément) et de cinq déficits immunitaires affectant les lignées lymphoïdes : une forme de déficit immunitaire combiné sévère (DICS), l'agammaglobulinémie de Bruton, le syndrome hyper-IgM avec défaut d'IgA et d'IgG (XHM), le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) et le syndrome lymphoprolifératif décrit par Purtilo. Ces maladies sont rares, leur prévalence variant d'environ 1 : 200 000 (DCIS) à 1 : 1 à  $2 \cdot 10^6$  (XHM, Purtilo, Omaha, NE, USA) naissances.

Dans les deux premiers cas, le gène est connu et certaines mutations caractérisées. La GSC se caractérise par un défaut de destruction des

micro-organismes ingérés par les cellules phagocytaires. Ce défaut est secondaire à une incapacité de production de radicaux d'oxygène libre par la chaîne oxydative membranaire de transport d'électrons. La forme liée à l'X de GSC correspond à une anomalie du gène codant pour la chaîne lourde du cytochrome b, un des éléments de la chaîne de transport d'électrons. L'identification de ce gène représente le premier exemple d'utilisation de la génétique inverse. En effet, il avait été observé, chez un patient, l'association morbide d'une GSC, d'une rétinite pigmentaire, d'une anémie avec phénotype MacLeod et de la myopathie de Duchenne de Boulogne. Il existait chez ce sujet une délétion interstitielle en Xp21. Une stratégie de clonage de segments de cette délétion [1] a permis d'identifier, entre autres, le gène codant pour la chaîne lourde du cytochrome b [2].

Bien que, pour l'instant, les gènes dont les anomalies sont responsables des cinq déficits immunitaires affectant la différenciation des lymphocytes T et/ou B ne soient pas connus, un certain nombre d'informations génétiques et immunologiques significatives ont été recueillies au cours de ces dernières années. L'analyse de ces déficits immunitaires est évidemment importante sur un plan pratique, mais aussi parce qu'elle apparaît potentiellement riche en nouvelles données sur les mécanismes de différenciation des lymphocytes T et B.

### Aspects cliniques et immunologiques des déficits immunitaires lymphocytaires de transmission liée à l'X

- L'absence totale de lymphocytes T, aussi bien mûrs qu'immatures, caractérise le déficit immunitaire combiné sévère (DICS). La lignée lymphocytaire B, au contraire, est préservée (figure 1). Les lymphocytes B sont parfois même présents en nombre augmenté, mais il existe toujours une hypogammaglobulinémie. Ce déficit est curable par greffe de moelle osseuse, ce qui démontre le caractère intrinsèque de l'anomalie causale à la lignée hématopoïétique. Après greffe de moelle HLA compatible, seules les

cellules T du donneur se développent chez l'hôte, les cellules B demeurant celles du receveur. L'observation, après transplantation d'une réponse anticorps normale suggère que les lymphocytes B ne sont pas affectés par cette anomalie génétique. Nous verrons que cette affirmation doit être nuancée. Dans tous les cas, la description de ce DICS indique que, pour l'essentiel, la différenciation des lymphocytes B ne requière pas la présence de lymphocytes T. Ce déficit immunitaire diffère de celui décrit chez la souris SCID [3], et qui existe sans doute chez l'homme [4] où une mutation de transmission autosomique récessive affecte à la fois la différenciation lymphocytaire T et B à cause d'une anomalie de la recombinaison des gènes du récepteur T et

des immunoglobulines.

- Une anomalie de la différenciation lymphocytaire B a été décrite chez l'homme par O. C. Bruton. Ce déficit, connu sous le nom d'agammaglobulinémie liée à l'X, correspond à un défaut de synthèse de tous les isotypes d'immunoglobulines dû à une absence de cellules B mûres. La différenciation lymphocytaire B est bloquée au stade dit pré-B (figure 1). Les lymphocytes pré-B présents dans la moelle osseuse se caractérisent par le réarrangement des segments géniques variables (V, D et J) des chaînes lourdes d'immunoglobulines et par la transcription et la traduction de l'ARN messenger correspondant, en chaîne lourde  $\mu$ . Une fraction de la chaîne  $\mu$  est exprimée à la membrane cellulaire en association avec

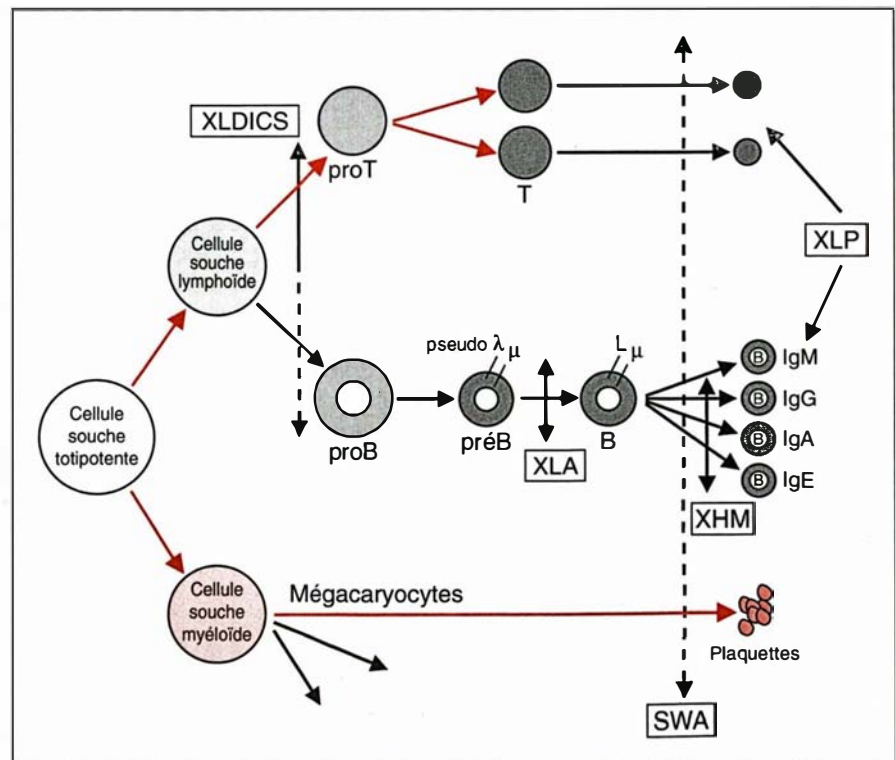


Figure 1. Schéma de la différenciation hématopoïétique et lymphoïde. Niveaux approximatifs d'atteinte des diverses lignées au cours des déficits immunitaires lymphoïdes liés à l'X chez l'homme. XL DICS : déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X ; XLA : agammaglobulinémie de Bruton ; SWA : syndrome de Wiskott-Aldrich ; XLP : syndrome de Purtilo ; XHM : syndrome d'hyper IgM, hypo-IgG et IgA.  $\mu$  : chaînes lourdes  $\mu$  ; L : chaînes légères ; pseudo  $\lambda$  : pseudo-chaînes légères ou  $\lambda$ -like.

## RÉFÉRENCES

1. Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ; 82 : 4778-82.
2. Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, et al. Cloning the gene for an inherited human disorder chronic granulomatous disease on the basis of its chromosomal location. *Nature* 1986 ; 322 : 32-8.
3. Lieber MR, Hesse JE, Lewis S, et al. The defect in murine severe combined immune deficiency: joining of signal sequences but not coding segments in (V(D)J recombinations. *Cell* 1988 ; 55 : 7-11.
4. Schwarz K, Hansen-Hagge TE, Knobloch C, Friedrich W, Kleihauer E, Bartram CR. Severe combined immunodeficiency (SCID) in man: B cell-negative (B<sup>-</sup>) SCID patients exhibit an irregular recombination pattern at the J<sub>H</sub> locus. *J Exp Med* 1991 ; 174 : 1039-48.
5. Schiff C, Milili M, Bossy D, et al. Lambda-like and V pre-B genes expression: an early B lineage marker of human leukemias. *Blood* 1992 (sous presse).
6. Campana D, Farrant J, Inambar N, Webster ADB, Janosy G. Phenotypic features and proliferative activity of B cell progenitors in X-linked agammaglobulinemia. *J Immunol* 1990 ; 145 : 1675-80.
7. Schwaber J, Molgaard H, Orkin SH, Gould HJ, Rosen FS. Early pre-B cells from normal and X-linked agammaglobulinemia produce C $\mu$  without an attached V<sub>H</sub> region. *Nature* 1983 ; 304 : 355-9.
8. Mayer L, Kwan SP, Thompson C, et al. Evidence for a defect in « switch » T cells in patients with immunodeficiency and hyperimmunoglobulinemia M. *N Engl J Med* 1986 ; 314 : 409-13.
9. Remold-O'Donnell E, Rosen FS. Sialophorin (CD43) and the Wiskott-Aldrich syndrome. *Immunodef Rev* 1990 ; 2 : 151-74.

des équivalents de chaîne légère dits  $\lambda$  -like\* [5]. De telles cellules sont présentes, parfois en quantité réduite, chez les patients atteints d'agammaglobulinémie. Leur capacité proliférative paraît altérée [6]. On n'observe habituellement pas l'étape suivante de la différenciation lymphocytaire B, c'est-à-dire le réarrangement génique des éléments variables (V et J) des chaînes légères d'immunoglobulines [7]. Aucune anomalie lymphocytaire T n'est détectée dans ce déficit.

Le syndrome caractérisé par la production d'un excès d'IgM et d'IgD et l'absence d'IgA, d'IgG et d'IgE correspond à un défaut apparent de commutation isotypique des lymphocytes B. La même anomalie est constatée aussi bien pour les immunoglobulines produites que pour les immunoglobines membranaires des lymphocytes B (figure 1). La commutation de la synthèse des IgM et IgD aux IgG et éventuellement IgE et IgA, molécules conservant toutes la même région V<sub>H</sub>D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>, est fondée sur un processus de recombinaison homologue entre des zones S (zone de commutation ou *switch*) localisée en 5' du segment C $\mu$  et de tous les autres segments constants  $\gamma$ ,  $\epsilon$  et  $\alpha$  (*m/s suppl. au n° 5, vol. 5, p. 5*). Les segments géniques « S » ne sont pas en cause puisque ceux-ci sont situés avec les gènes codant pour les parties constantes des chaînes lourdes d'immunoglobulines, sur le chromosome 14. Il n'est pas possible, au vu des données immunologiques, de déterminer si le déficit est intrinsèque aux lymphocytes B ou secondaires à un défaut d'un élément extérieur inducteur de la commutation. Deux fragiles notions plaident en faveur de la seconde hypothèse: certains patients souffrent d'infections opportunistes qui suggèrent l'existence d'un déficit de la fonction des lymphocytes T, bien que celui-ci n'ait pas été démontré. L. Mayer et al. ont montré, il y a plusieurs années, qu'un surnageant de lignée tumorale T exerçait une activité non caractérisée capable d'induire la production d'IgG et d'IgA par les lymphocytes B de ces patients [8].

\* Le produit des gènes  $\lambda$ -like s'associe avec Vpré-B et la chaîne  $\mu$  pour former le complexe  $\mu$  -chaîne légère, exprimé spécifiquement dans les cellules pré-B.

## \* GLOSSAIRE \*

**CpG** : 5' cytosine phosphate-guanine-3' ; « îlot CpG » ou « îlot HTF » [28].

**YAC** : chromosome artificiel de levure comportant tous les signaux spécifiques d'un chromosome de levure (origine de réplication, centromère, télomères) et qui permet le clonage et la propagation stable de grands fragments d'ADN exogène (500 kb en moyenne) dans cet eucaryote unicellulaire.

**CD43 ou gp115** : glycoprotéine membranaire dont la glycosylation est modifiée au cours de l'activation des lymphocytes T. Elle pourrait jouer un rôle dans cette activation.

Le syndrome de Wiskott-Aldrich est une maladie complexe. Sur le plan immunologique, il existe des anomalies fonctionnelles mal caractérisées des lymphocytes T : défaut de fonction cytotoxique, et des lymphocytes B : défaut de production d'IgM et d'anticorps dirigés contre les antigènes polysaccharidiques, mais aussi contre d'autres antigènes. Le déficit immunitaire s'aggrave progressivement chez la majorité des patients avec une hypoplasie croissante des organes lymphoïdes. Les conséquences cliniques du déficit immunitaire sont multiples : infections bactériennes et virales, allergie, auto-immunité et lymphomes. La relation causale avec le SWA est démontrée par la disparition de toutes ces complications après greffe de moelle osseuse. Le SWA provoque également une thrombopénie associée à une petite taille des plaquettes et une thrombopathie. Les plaquettes et les lymphocytes de ces patients exprimeraient, en plus, une faible quantité des sialoglycoprotéines (gp115 plaquettaire et CD43 lymphocytaire) [9, 10]. Ces résultats sont cependant controversés. D'autres auteurs ont observé une anomalie de la glycosylation de CD43 [11]. La relation de ces observations avec la nature du déficit immunitaire reste obscure. Le cinquième déficit immunitaire lié à l'X se traduit de façon élective par une susceptibilité anormale à l'infection par le virus d'Epstein-Barr. Au

cours de ce déficit immunitaire, l'infection des lymphocytes B provoque une réponse inappropriée (excessive, durable et inefficace) des lymphocytes T, incapables de contrôler l'infection. Les conséquences cliniques sont très sévères : mononucléose infectieuse chronique mortelle, hépatite grave, aplasie médullaire, lymphomes B ou hypogammaglobulinémie. Aucune anomalie immunologique indiscutable ne peut être mise en évidence chez les sujets affectés avant d'avoir rencontré le virus d'Epstein-Barr. On ne sait si le mécanisme du déficit immunitaire réside dans une anomalie B, les rendant insensibles aux effecteurs cytotoxiques qui détruisent normalement les lymphocytes B infectés ou si, au contraire, il s'agit d'un déficit de la fonction de ces effecteurs.

### Modèles animaux des déficits immunitaires liés au chromosome X

- Un DICS est connu dans la race canine, en partie semblable au DICS de l'homme [11, 12]. On y retrouve associés une aplasie thymique, un défaut de maturation des lymphocytes T et des anomalies fonctionnelles des lymphocytes B. Cependant, contrairement à la situation chez l'homme, quelques thymocytes immatures avec un phénotype CD4(-) CD8(-) sont encore présents à l'âge de 8 semaines. Une étude plus approfondie devrait permettre de définir si les DICS humain et canin sont liés à l'atteinte d'un même gène. Un DICS lié à l'X a également été observé chez le cheval arabe. Le phénotype paraît équivalent à celui de la maladie humaine.

- Chez la souris, la mutation *xid* a été identifiée dans la souche CBA/N. Elle se caractérise par une anomalie sélective de la maturation des lymphocytes B, un défaut de production d'anticorps vis-à-vis des antigènes thymo-indépendants de type 2\*, et une faible concentration sérique en IgM et IgG3. Les cellules B de la souris *xid* ne répondent pas à l'inter-

leukine 10 (IL-10) par une augmentation de l'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, à leur surface [13]. La mutation *xid* ne trouve pas d'équivalent dans les déficits immunitaires liés à l'X chez l'homme.

### Génétiques des déficits immunitaires lymphoïdes liés à l'X

Deux types d'approche ont permis de progresser dans la connaissance génétique de ces différents déficits.

#### • Localisation des gènes

La première, devenue classique, est fondée sur l'utilisation des polymorphismes de longueur des fragments d'ADN après coupure par des enzymes de restriction. Il s'agit de définir des marqueurs génétiques dont la ségrégation intrafamiliale est liée génétiquement à la transmission de la

maladie et donc à son *locus* (figure 2). Des études collaboratives, réalisées sur un nombre important de familles à risques pour ces différents déficits, ont permis de définir les régions du chromosome X contenant les différents gènes en cause (figure 3, p. 566). L'ensemble de ces études a montré qu'à chaque déficit immunitaire correspond une seule région, et que ces cinq *loci* appartiennent tous à des régions différentes du chromosome X. Pour l'un de ces déficits, le syndrome de Purtilo, la localisation génétique vient d'être confirmée par la découverte, chez un patient, d'une délétion interstitielle cytogénétique en Xq25 [14].

#### • Expression des gènes

Le deuxième type d'approche cherche à définir les populations cellulaires affectées par l'anomalie génétique. L'étude du profil d'inactivation du chromosome X chez les femmes con-

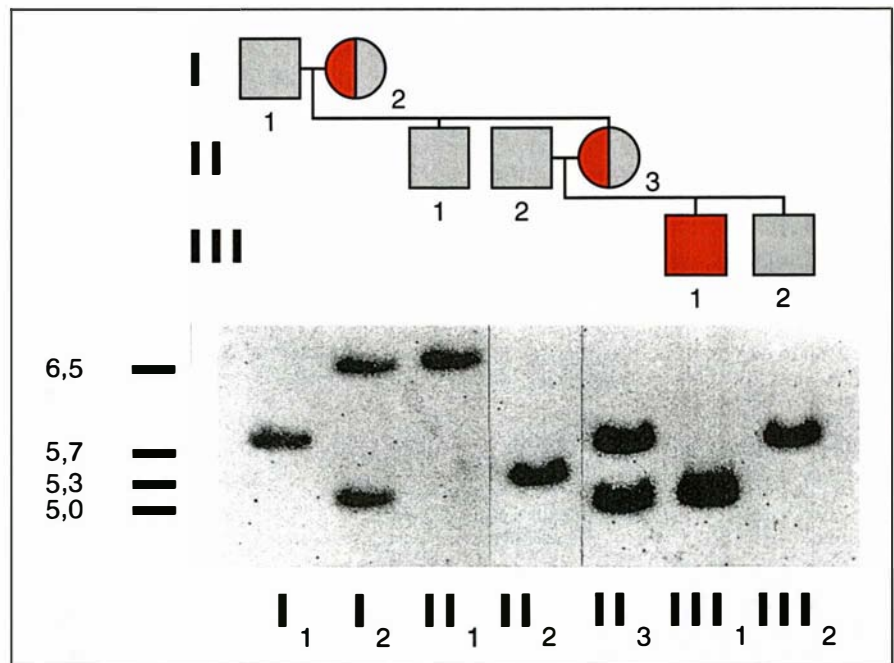


Figure 2. **Ségrégation du marqueur hypervariable DXS255 dans une famille présentant plusieurs cas de syndrome de Wiskott-Aldrich.** La femme  $I_2$  a eu un garçon atteint de ce syndrome, décédé avant l'étude. L'ADN de chaque individu a été coupé avec l'enzyme *Pst*1, les fragments séparés par migration électrophorétique, et transférés sur filtre. L'hybridation avec la sonde *M27 $\beta$*  au locus *DXS255*, connu pour être étroitement lié au locus du syndrome de Wiskott-Aldrich, révèle quatre allèles. L'allèle de taille 5 kb est l'allèle lié au gène portant la mutation *WA* dans cette famille.

\* Antigène thymo-indépendant de type 2 : antigène polysaccharidique induisant une réponse dépendante de la sécrétion de lymphokines Y.

## RÉFÉRENCES

10. Néel P, Aubéry M, Derappe C. Glycobiologie et cellules sanguines. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 233-8.
11. Piller F, Le Deist F, Weinberg KI, Parkman R, Fukuda A. Altered O-glycan synthesis in lymphocytes from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *J Exp Med* 1991 ; 173 : 1501-10.
12. Jczyk PF, Felsburg PJ, Haskins ME, Patterson DF. X-linked severe combined immunodeficiency in the dog. *Clin Immunol Immunopathol* 1989 ; 52 : 173-89.
13. Go NF, Castle BE, Barrett R, et al. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor : unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* 1990 ; 172 : 1625-31.
14. Sanger WG, Grierson HL, Skare J, et al. Partial Xq25 deletion in a family with the X-linked lymphoproliferative disease (XLP). *Cancer Genet Cytogenet* 1990 ; 47 : 163-9.
15. Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol Rev* 1972 ; 47 : 1-35.
16. Gilgenkrantz H. Inactivation de l'X : un gène actif spécifique de l'X inactif ? *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 375-7.
17. Conley ME, Lavoie A, Briggs C, Brown P, Guerra C, Puck JM. Non random X chromosome inactivation in B cells from carrier X chromosome-linked severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 3090-4.
18. Fearon ER, Winkelstein JA, Civin CI, Pardoll DM, Vogelstein B. Carrier detection in X-linked agammaglobulinemia by analysis of X-chromosome inactivation. *N Engl J Med* 1987 ; 316 : 427-31.
19. Hendriks RW, Kraakman MEM, Craig IW, Espanol T, Schuurman RKB. Evidence that in X-linked immunodeficiency with hyperimmunoglobulinemia M the intrinsic immunoglobulin heavy chain class switch mechanism is intact. *Eur J Immunol* 1990 ; 20 : 2603-8.

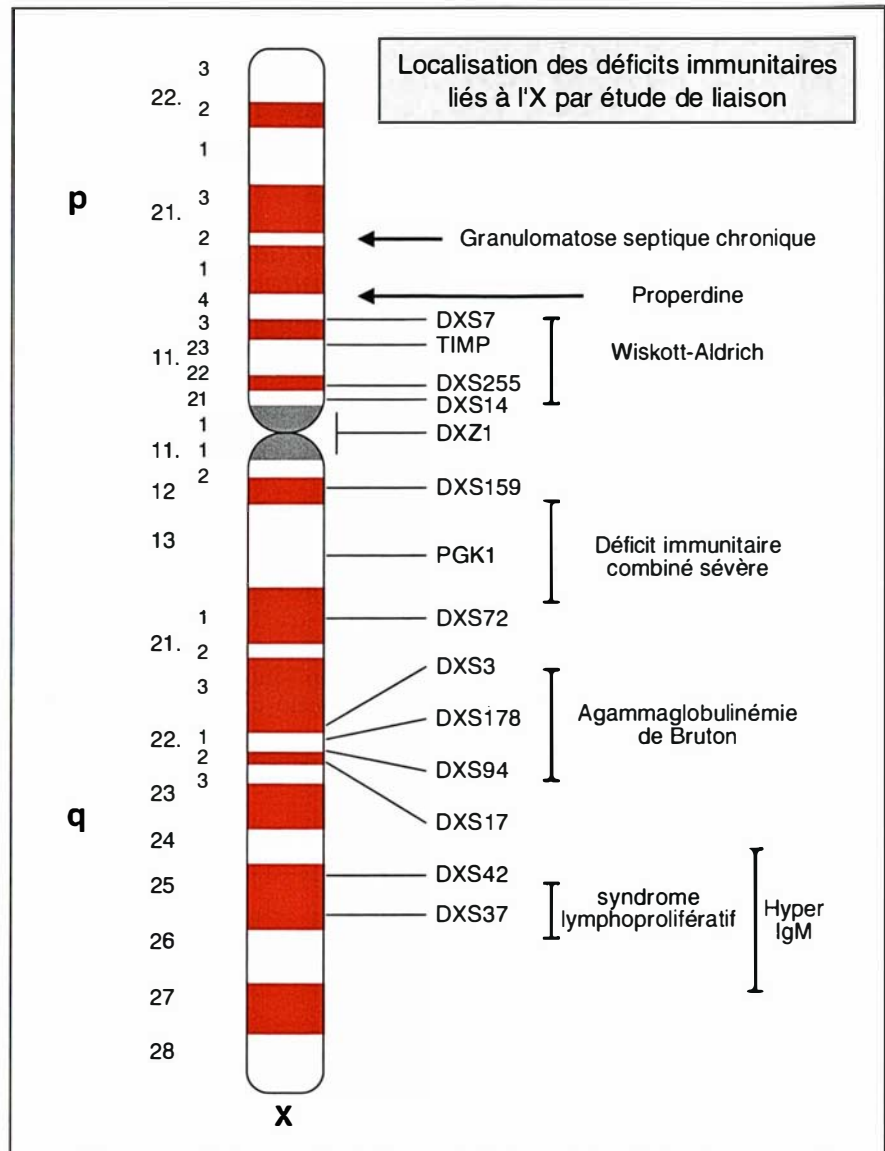


Figure 3. Localisation des différents déficits immunitaires humains sur le chromosome X. Des marqueurs polymorphiques liés sont figurés. La correspondance avec la carte cytogénétique est indiquée sur la gauche.

ductrices de ces déficits en a été l'une des clés. Conformément à l'hypothèse de Mary Lyon, un seul des deux chromosomes X, déterminé de façon aléatoire, est actif chez la femme, l'inactivation de l'autre chromosome X survenant de façon précoce au cours de l'embryogenèse [15]. Le chromosome X inactivé l'est de façon stable, et cette inactivation est transmise tout au long des divisions somatiques cellulaires [16]. Ainsi, si cha-

que chromosome X, dans chaque cellule, a la même probabilité d'être inactivé, une population cellulaire donnée présentera un profil d'inactivation au hasard. Toutefois, dans les populations cellulaires dont l'ontogénie dépend de l'expression normale d'un des gènes du chromosome X, les cellules dont l'X actif est l'X normal vont être sélectionnées préférentiellement. Il en résultera un profil d'inactivation particulier dans ces popula-

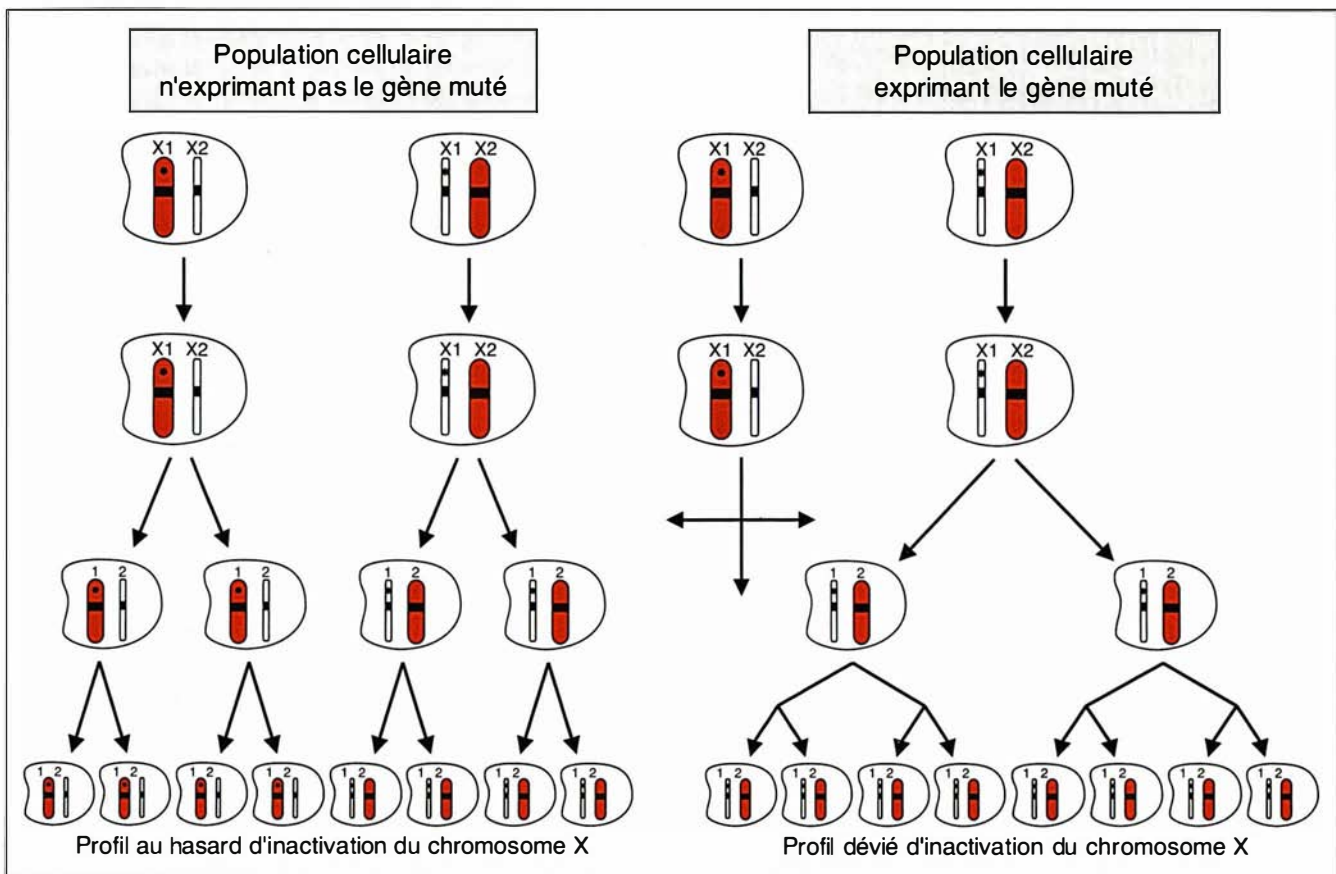


Figure 4. **Différence de profil d'inactivation du chromosome X de deux populations cellulaires selon que l'expression d'un gène muté sur ce chromosome est ou non nécessaire à leur différenciation** : X actif en rouge ; X inactif en blanc ; \* : mutation.

tions cellulaires, l'X qui porte la mutation étant systématiquement l'X inactivé (figure 4). La mise en évidence d'un tel profil d'inactivation indique que le gène anormal s'exprime dans cette population cellulaire, que son produit est nécessaire à son développement et ne diffuse pas hors de la cellule pour agir sur des cellules voisines.

Plusieurs méthodes ont été développées pour analyser le profil d'inactivation du chromosome X chez les femmes conductrices de déficits liés au chromosome X. L'une de ces méthodes s'appuie sur le dosage d'enzyme dont un polymorphisme est identifiable (migration en gel), telle la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD), mais très peu de femmes sont hétérozygotes pour cette enzyme.

Une autre méthode consiste en l'établissement d'hybrides somatiques entre lymphocytes humains et cellules de hamster déficientes en hypoxanthine phosphoribosyltransférase (HPR T). Ces hybrides sont ensuite cultivés en milieu sélectif (HAT) où seuls ceux exprimant le gène HPRT présent sur le chromosome X pourront se développer. L'analyse d'un nombre suffisamment important d'hybrides à l'aide de marqueurs polymorphiques permet d'identifier l'X actif et ainsi de repérer les populations cellulaires dont toujours le même X a été retenu dans la cellule hamster [17]. La troisième étude, la plus couramment employée, repose sur l'analyse des différences de méthylation de certains gènes selon qu'ils sont portés par le

chromosome X actif ou inactivé. Ces gènes ne sont pas nécessairement associés au déficit étudié. Les sondes spécifiques de la région 5' de ces gènes, tel le gène de la phosphoglycérate kinase (PGK1) ou de l'HPRT, permettent de distinguer les deux chromosomes X, par analyse des polymorphismes, et d'identifier l'X actif en fonction de la méthylation de ces gènes (figure 5, p. 568). En général, la région 5' des gènes ubiquitaires est méthylée sur le chromosome X inactif, alors que la méthylation d'autres loci, telle la séquence anonyme DXS255, survient sur le chromosome X actif. Il apparaît cependant qu'un profil d'inactivation normal peut dévier sensiblement de la situation 50 %/50 % théorique attendue et que, chez environ 5 % des

## RÉFÉRENCES

20. Cohen DI, Hedrick SM, Nielsen EA, *et al.* Isolation of a cDNA clone corresponding to an X-linked gene family (XLR) closely linked to the murine immunodeficiency disorder *xid*. *Nature* 1985 ; 314 : 369-72.
21. Garchon HJ. The Xlr (X-linked lymphocyte regulated) gene family (a candidate locus for an X-linked primary immune deficiency). *Immunodef Rev* 1991 ; 2 : 283-302.
22. Journet O, Durandy A, Doussau M, *et al.* Carrier detection and prenatal diagnosis of X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet.*
23. Arveiler B, De Saint Basile G, Fischer A, Griscelli C, Mandel JL. Germ-line mosaicism simulates genetic heterogeneity in Wiskott-Aldrich syndrome. *Am J Hum Genet* 1990 ; 46 : 906-11.
24. Donner M, Schwartz M, Carlsson KU, Holmberg L. Hereditary X-linked thrombocytopenia maps to the same chromosomal region as the Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 1988 ; 72 : 1849-52.
25. De Saint Basile G, Schlegel N, Caniglia M, *et al.* X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome : similar regional assignment but distinct X-inactivation pattern in carriers. *Ann Hematol* 1991 ; 63 : 107-10.
26. De Saint Basile G, Le Deist F, Caniglia M, Le Branchu Y, Griscelli C, Fischer A. Genetic study of a new X-linked recessive immunodeficiency syndrome. *J Clin Invest* 1992 (sous presse).
27. Ziv Y, Rotman G, Frydman M, *et al.* The ATC (ataxia telangiectasia complementation group C) locus localizes to 11q22-q23. *Genomics* 1991 ; 9 : 373-5.
28. Jordan BR. Ilots HTF : le gène annoncé. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 153-60.
29. Van Beusechem VW, Kukler A, Eicherhand MPW, *et al.* Expression of human adenosine deaminase in mice transplanted with hemopoietic stem cells infected with amphotropic retroviruses. *J Exp Med* 1990 ; 172 : 729-35.

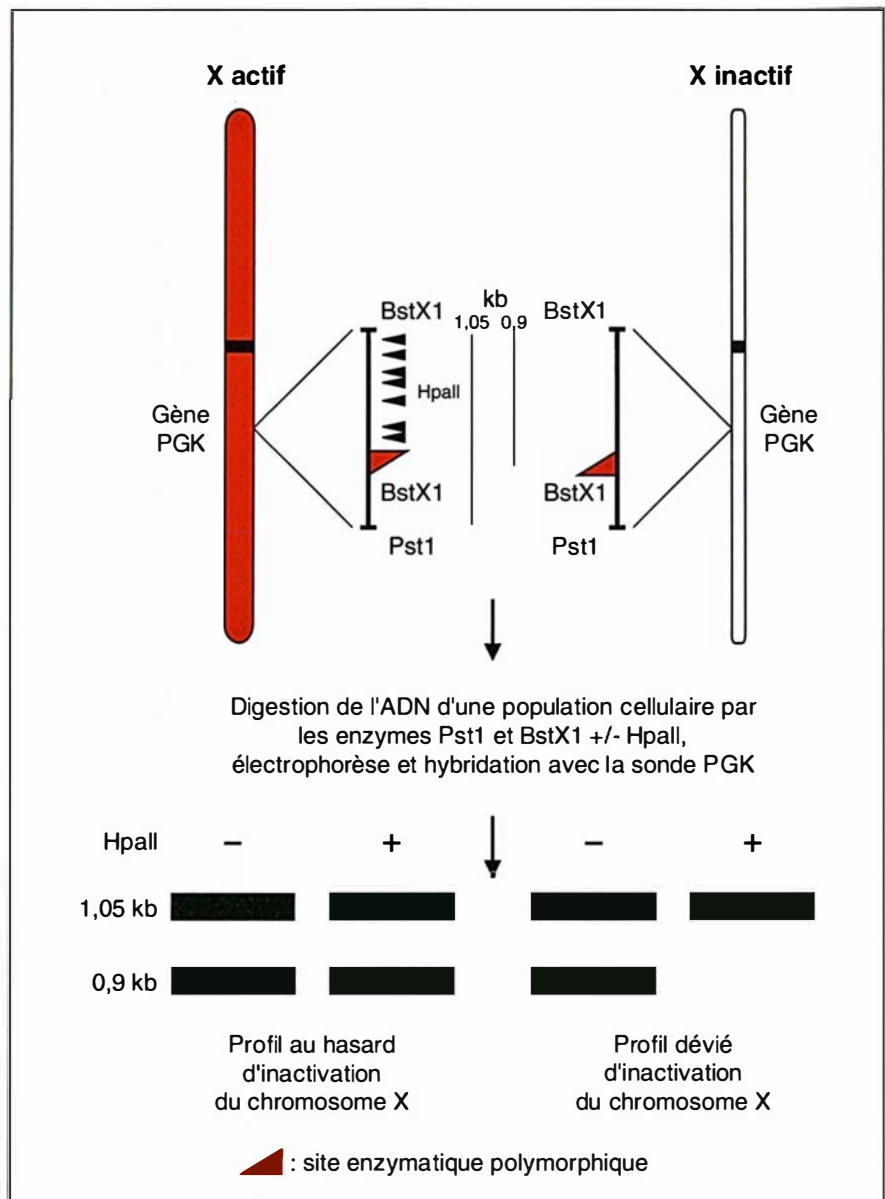


Figure 5. **Méthode d'étude du profil d'inactivation du chromosome X, utilisant le gène PGK.** La région 5' du gène PGK est représentée. La sonde PSpT 19.1 du gène PGK révèle un fragment de 1,05 kb en l'absence du site polymorphique BStX1 et un fragment de 0,9 kb lorsque ce site est présent. Une femme est hétérozygote lorsque ce site est présent sur l'un de ses chromosomes X et absent sur l'autre. La région 5' du gène PGK possède 7 sites HpaII qui sont tous méthylés sur l'X inactif et donc inaccessibles à l'enzyme HpaII. Sur l'X actif, ces sites HpaII sont en revanche tous déméthylés et l'enzyme HpaII peut digérer le fragment d'ADN correspondant en autant de très petits fragments souvent non visibles. Un profil au hasard d'inactivation du chromosome X est mis en évidence par la persistance, après la digestion HpaII, d'environ 50 % de chaque allèle correspondant à chaque chromosome X révélé par la sonde PSPT19.1, alors que dans un profil dévié, seul un des deux allèles persiste inchangé alors que le 2<sup>e</sup> allèle est totalement digéré par HpaII.

femmes normales, on observe une inactivation apparemment préférentielle de l'un des chromosomes X. Ce phénomène dépend probablement du nombre de cellules embryonnaires présentes au moment de l'inactivation des chromosomes X.

Ce type d'étude, mené chez les femmes conductrices de déficits immunitaires liés au chromosomes X, a montré (figure 6) que le gène du DICS est exprimé non seulement au cours de l'ontogénie du lymphocyte T, mais également au cours de l'ontogénie lymphocytaire B. Dans les lymphocytes B, le profil d'inactivation de l'X est d'autant plus dévié d'une répartition aléatoire que la cellule B est différenciée [17]. Ce résultat peut paraître surprenant, compte tenu du phénotype de ce déficit et de la capacité des lymphocytes B à coopérer, *in vivo*, avec les lymphocytes T après greffe de moelle osseuse. Il peut s'expliquer si l'on considère que le produit du gène du DICS exerce un rôle différent dans ces deux populations lymphocytaires. Il semble indispensable à un stade très précoce de la différenciation lymphocytaire T, alors que dans le lymphocyte B, son défaut soit influence peu la différenciation, soit peut être suppléée. Il reste difficile d'établir à quel stade de la maturation B intervient l'expression de ce gène. Elle pourrait avoir lieu à un stade très précoce, commun aux lymphocytes T et B, ou plus tard, voire tout au long de la maturation des lymphocytes B.

C'est au cours de la maturation du lymphocyte B que s'exprime le gène impliqué dans l'agammaglobulinémie de Bruton. Les lymphocytes B des femmes conductrices de cette maladie utilisent toujours le même chromosome X, celui ne portant pas la mutation génique [18] (figure 6). Le défaut génique intrinsèque à la cellule B bloque sa différenciation à un stade pré-B. Le réarrangement de la chaîne légère n'a pas lieu, et des chaînes  $\mu$  complètes ou tronquées, liées à un réarrangement incomplet des régions VDJ sont détectées. Ces différences phénotypiques peuvent correspondre à des mutations alléliques distinctes du locus XLA impliqué dans cette affection.

Le troisième déficit immunitaire qui concerne également la lignée

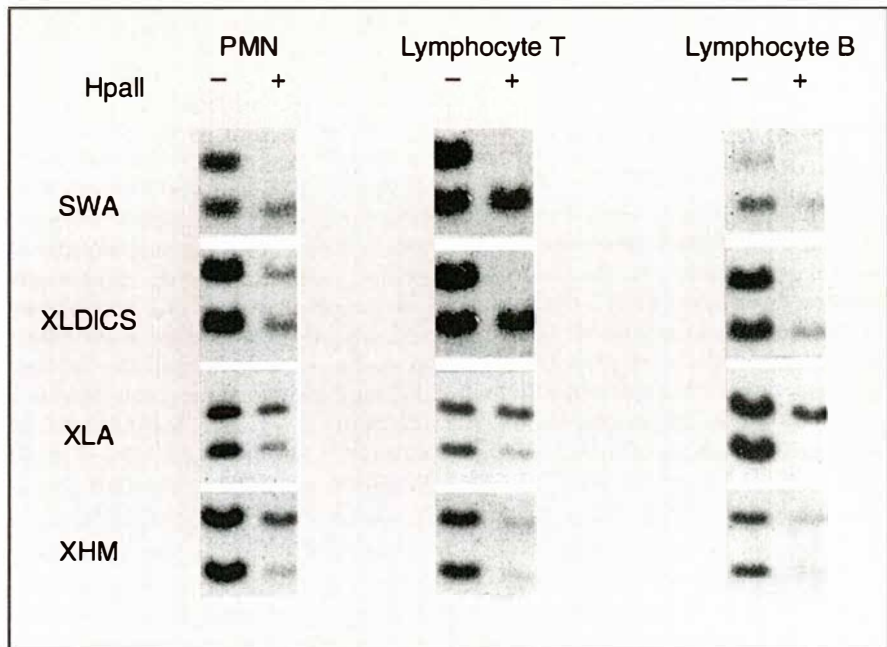


Figure 6. Profil d'inactivation du chromosome X retrouvé dans les polynucléaires neutrophiles (PMN), les lymphocytes T et les lymphocytes B des femmes conductrices de quatre déficits immunitaires liés à l'X. Dans chaque situation, l'ADN est digéré par les enzymes *Pst*1 et *Bst*XI  $\pm$  *Hpa*II et les fragments révélés par la sonde pSPT19.1 du gène PGK. XL DICS : déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X ; XLA : agammaglobulinémie de Bruton ; SWA : syndrome de Wiskott-Aldrich ; XLP : syndrome de Purtilo ; XHM : syndrome d'hyper IgM, hypo IgG et IgA.  $\mu$  : chaînes lourdes  $\mu$  ; L : chaînes légères ; pseudo  $\lambda$  : pseudo-chaînes légères ou  $\lambda$ -like.

lymphocytaire B, le syndrome hyper-IgM, ne présente pas de profil d'inactivation dévié du chromosome X, que ce soit au niveau des lymphocytes T ou des lymphocytes B des femmes conductrices (figure 6). Les lignées B qui produisent soit de l'IgG, soit de l'IgA, conservent également un profil d'inactivation au hasard : cela suggère que la machinerie intervenant dans la commutation isotypique est normalement présente dans les lymphocytes B de ces patients [19]. L'hypothèse la plus probable est que le défaut est bien intrinsèque au lymphocyte T, mais correspond à l'absence d'un produit diffusible. Cette hypothèse se trouve confortée par le fait qu'il est possible de corriger ce défaut par l'addition d'un surnageant de lymphome T de Sezary. Des travaux sont en cours, à la recherche d'une lymphokine capable d'induire cette commutation isotypique dans le lymphocyte

B. Il resterait ensuite à déterminer si le locus de l'X code pour cette lymphokine ou pour un gène impliqué dans sa régulation.

Ce sont toutes les cellules hématopoïétiques des femmes conductrices du syndrome de Wiskott-Aldrich qui présentent une inactivation préférentielle non aléatoire de l'un de leur chromosome X (figure 6). Ce même profil dévié a également été retrouvé par des études de polymorphisme enzymatique dans les globules rouges et les plaquettes, en accord avec le dysfonctionnement plaquettaire et lymphocytaire observé chez ces malades. Ce résultat suggère une expression génique très précoce au cours de l'hématopoïèse. Dans le cinquième déficit, le syndrome de Purtilo, les lymphocytes T et B des femmes conductrices utilisent indifféremment l'un ou l'autre chromosome X. Cette approche ne permet donc pas de définir si le déficit correspond à un défaut de la cel-



lule T cytotoxique ou à une insensibilité de la cellule B infectée au contrôle par les lymphocytes T.

### **Génétique du déficit immunitaire murin *xid***

L'étude du profil d'inactivation du chromosome X chez la souris femelle hétérozygote pour la mutation *xid* montre que le gène déficitaire s'exprime dans la cellule B. Cohen *et al.* [20] ont identifié un gène (reconnu par la sonde PM1) qui appartient à une famille de gènes situés sur le chromosome X (« XLR », 50-70 copies dont la quasi-totalité correspond à des pseudogènes). Ce gène n'est pas transcrit dans la cellule B mûre des souris *xid*, mais l'est dans les lymphocytes T de ces souris comme dans les lymphocytes T et B de souris normales [21]. Cela exclut que l'anomalie *xid* puisse être due à une mutation du gène révélée par la sonde PM1. Il reste possible, en revanche, que cette mutation concerne une séquence régulatrice spécifique de l'expression de XLR des cellules B. Il se peut aussi que l'absence d'expression de XLR dans les lymphocytes B des souris *xid* soit secondaire à un arrêt de maturation qui précède le stade de son expression. Les premières études de localisation avaient lié le *locus xid* à un membre non identifié de la famille des gènes XLR. Ce résultat n'a pas été confirmé. Le gène défini par PM1 code pour une protéine nucléaire de 24 kDa, qui a peu d'homologie avec d'autres protéines connues, autre que la lamine. L'équivalent humain du gène XLR n'a pas été identifié jusqu'à présent. Il est donc pour l'instant difficile de savoir si l'un des déficits immunitaires humains pourrait correspondre à une anomalie génétique comparable malgré l'absence d'identité phénotypique.

### **Application au conseil génétique**

Le diagnostic anténatal de deux de ces déficits, le DICS et l'agammaglobulinémie de Bruton, est possible, depuis plusieurs années, par l'étude immunologique des populations lymphocytaires sur le sang du cordon ombilical, à 4 mois de grossesse. La

liaison à des marqueurs génétiques des *loci* impliqués dans ces cinq différents déficits, permet théoriquement un diagnostic anténatal à 10 semaines de grossesse à partir d'une biopsie trophoblastique [22]. De même, la détection des conductrices peut être faite lorsque des marqueurs polymorphiques proches sont informatifs. Il existe suffisamment de marqueurs polymorphiques pour que le risque de recombinaison génétique entre marqueurs et *locus* de la maladie, et donc d'erreur diagnostique, soit toujours inférieur à 5%. L'existence de mosaïque germinale, c'est-à-dire de mutation au niveau des seuls gamètes, peut rendre ces diagnostics erronés, puisque, dans cette situation, un père asymptomatique peut en fait être conducteur d'un de ces déficits, si la mutation n'est présente qu'au niveau de ses cellules germinales [23]. De même, l'existence d'une mosaïque germinale chez une femme ne sera pas décelée par l'étude du profil d'inactivation du chromosome X de ses cellules hématopoïétiques.

### **Existe-il différentes expressions phénotypiques de ces DI ?**

A côté des phénotypes caractéristiques des déficits immunitaires (DI) liés à l'X, d'autres formes moins sévères existent, qui pourraient refléter une hétérogénéité mutationnelle à un même *locus*. Une hypogammaglobulinémie, associée à la présence de cellules B immatures circulantes, a été décrite et pourrait correspondre à un phénotype mineur de l'agammaglobulinémie de Bruton. L'étude des marqueurs polymorphiques liés et l'analyse du profil d'inactivation de l'X chez les femmes conductrices confortent cette hypothèse. Une association entre le *locus* de la maladie de Bruton (XLA) et un déficit en hormone de croissance a également été décrit. Là encore, le doute persiste quant à l'unicité du *locus* affecté. L'association d'un déficit en hormone de croissance suggère, dans un cas comme dans l'autre, une délétion couvrant les *loci* impliqués qui n'a cependant pas été mise en évidence à ce jour.

Dans certaines familles, une thrombopénie liée à l'X a été décrite, présen-

tant les mêmes caractéristiques que celles observées dans le syndrome de Wiskott-Aldrich. Cependant, il ne s'y associe peu ou pas d'anomalies immunitaires. Récemment, l'étude des marqueurs polymorphiques du chromosome X a permis de localiser le(s) gène(s) impliqué(s) dans cette thrombopénie isolée, dans la même région que celle contenant le *locus* du SWA [24]. L'étude de l'inactivation du chromosome X chez les femmes conductrices montre que certaines lignées hématopoïétiques présentent également une inactivation sélective [25]. Il pourrait s'agir donc de mutations différentes du *locus* du SWA.

Enfin, en relation avec le DICS, un déficit partiel des lymphocytes T, de transmission liée au chromosome X, a été observé dans deux familles. Le déficit se caractérise par un nombre subnormal de lymphocytes T, mais un déficit fonctionnel de cette population, déficit qui s'accroît au cours du temps. Dans une de ces familles, l'étude des marqueurs polymorphiques situe le gène impliqué dans la région contenant le *locus* du DICS. Le profil d'inactivation retrouvé chez les femmes conductrices est identique à celui observé dans le DICS [26]. Même si, pour tous ces phénotypes, l'hypothèse de l'hétérogénéité mutationnelle d'un même gène est séduisante, on ne peut pas éliminer complètement la possibilité que plusieurs gènes localisés dans la même région soient impliqués. Une telle situation existe vraisemblablement dans l'ataxie télangiectasie où différents groupes de complémentation ségrègent avec des marqueurs de la même région q23 du chromosome 11 [27].

### **Perspectives**

Le clonage des gènes responsables de ces syndromes de déficits immunitaires liés à l'X contribuera à mieux comprendre leurs fonctions et leurs anomalies. Cela reste, en pratique, difficile pour plusieurs raisons. Aucun des produits des gènes impliqués dans ces cinq déficits immunitaires n'est connu. Si l'étude des profils d'inactivation de l'X a permis d'identifier certaines des lignées cellulaires concernées, le stade précis de différenciation où s'expriment ces gènes est mal

connu. De plus, l'expression génique et ses conséquences fonctionnelles peuvent être décalées dans le temps. Enfin, si pour certains déficits la distance entre marqueurs génétiques liés et *locus* de la maladie semble réduite, elle ne représente qu'une valeur statistique et peut ne pas être en rapport avec la distance physique.

Deux types de stratégies se dessinent pour tenter d'identifier ces gènes. La première est fondée sur l'expression différentielle de ces gènes et est applicable aux déficits pour lesquels des lignées cellulaires les exprimant sont connues. Le succès d'une telle stratégie dite soustractive, nécessite que l'expression spécifique soit suffisante, ne soit pas trop transitoire et ne soit pas ubiquitaire. La seconde option, fondée sur une approche physique, l'utilisation de librairie de YAC et l'alignement de cosmides de la région d'intérêt, peut se révéler plus fructueuse bien que longue. A l'heure actuelle, il n'a pas été possible, par cette méthode, de lier entre eux deux marqueurs flanquant le *locus* d'un de ces déficits immunitaires. L'analyse de nouveaux marqueurs et le clonage progressif de la région génétiquement définie sont donc nécessaires. La détermination des îlots CpG de ces régions, souvent présents en 5' de régions codantes du génome, peut aider au repérage de certains gènes, bien que ces séquences de reconnaissance méthylées ne soient pas toujours présentes dans la région 5' des gènes [28]. Les approches de génétique inverse peuvent être beaucoup plus rapides quand le déficit est dû à une large délétion entraînant l'association de plusieurs anomalies chez un même individu. Une telle association n'a pas encore été retrouvée dans les DI liés à l'X, en dehors d'une délétion en Xq25 décrite dans une famille présentant un syndrome de Purtilo.

En conclusion, l'ensemble de ces stratégies devrait progressivement conduire à l'identification des gènes en cause dans ces déficits immunitaires. Leur caractérisation permettra de mieux pénétrer les mécanismes de la différenciation cellulaire et pourront peut-être conduire à des possibilités de thérapie génique de la lignée hématopoïétique. Celle-ci s'avère cependant *a priori* difficile dans la

mesure où l'expression des gènes recherchés est probablement soumise à une régulation stricte, contrairement à celle du gène de l'adénosine désaminase impliqué dans un autre type de déficit immunitaire grave [29] ■

## Summary

### Primary X-linked immuno deficiencies : a model for lymphocyte differentiation

Five X-linked immunodeficiencies are characterized by impairment in lymphocyte differentiation (the XL severe combined immunodeficiency [XL SCID], the XL agammaglobulinemia [XLA], the XL hyper-IgM [XLHM], the Wiskott-Aldrich syndrome [WAS] and the X lymphoproliferative syndrome [XLP]). Although molecular bases of the diseases remain unknown, several recent approaches have been taken in the characterization of the genes involved : the localization of the defective genes on the X chromosome has been precisely defined and the cell lineages and stages of differentiation in which the genes are expressed have been in part identified. The study of the pattern of X-inactivation in obligatory carrier of the various diseases indicated that WAS gene is expressed in all the hematopoietic cells while XL SCID gene is expressed in T and B lymphocytes and XLA gene in B lymphocytes. The description of several attenuated phenotypes of these X-linked immunodeficiencies may reflect mutational heterogeneity. Identification of these genes will provide insight into basic processes of lymphocyte differentiation and open up the possibility of new therapy.

## TIRÉS A PART

G. de Saint Basile.