

La protéine bHLH TAL-1 : un acteur clé dans les systèmes hématopoïétique et endothélial

Danièle Mathieu

Institut de Génétique Moléculaire, CNRS-UMR 5535, Universités de Montpellier 1 et Montpellier 2, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 1, France

Auteur correspondant : Danièle Mathieu, daniele.mathieu@igmm.cnrs.fr

Reçu le 20 janvier 2009

Résumé – La formation des cellules sanguines et des structures vasculaires se produit de façon simultanée au cours du développement embryonnaire, et ces deux systèmes restent étroitement liés tout au long de la vie adulte. Leur mise en place et leur renouvellement sont des processus très complexes qui requièrent l'intervention de nombreux acteurs moléculaires dont les activités sont fortement imbriquées les unes aux autres. Cette revue fait une mise au point sur le rôle de l'un de ces acteurs clés, TAL-1*, facteur de transcription de la famille *helix-loop-helix*, dans la mise en place et le fonctionnement des systèmes sanguin et endothélial. Elle décrit plus particulièrement les résultats récents qui associent TAL-1 à l'angiogenèse.

Mots clés : Facteurs bHLH/angiogenèse / hématopoïèse / cellules endothéliales / VE-cadhérine

Abstract – The bHLH TAL1 protein: a key molecule in the hematopoietic and endothelial systems.

The formation of blood cells and vascular networks occurs simultaneously during development, and both lineages remain in close association in all adult tissues. The functional setting of both systems within the embryo and their renewal during adult life are highly complex processes, and require the involvement of numerous molecular actors, the activities of which are often overlapping. Here, I review the activity of TAL-1, a basic-helix-loop-helix transcription factor, which plays a key role in the formation and functioning of both blood and endothelial systems, with a particular emphasis on recent data that associate TAL-1 with angiogenesis.

Key words: bHLH factors / angiogenesis / hematopoiesis / endothelial cells / VE-cadherin

Introduction

Les deux réseaux vasculaires (sanguin et lymphatique) occupent des fonctions physiologiques essentielles aussi bien au cours du développement que tout au long de la vie adulte. Les vaisseaux sanguins assurent un apport continu d'oxygène et de

nutriments à tous les tissus de l'organisme, alors que les vaisseaux lymphatiques interviennent dans la surveillance immunitaire, le recyclage de déchets issus des vaisseaux sanguins et l'absorption des lipides au niveau de l'intestin. La formation de nouveaux vaisseaux ou capillaires se produit à partir de vaisseaux préexistants sanguins, on parle d'angiogenèse, ou à partir de vaisseaux lymphatiques, c'est la lymphangiogenèse. Dans la plupart des tissus adultes, les facteurs angiostatiques majoritaires maintiennent l'endothélium en dormance; de rares événements angiogéniques se produisent de façon contrôlée dans

* La nomenclature HUGO (Human Gene Organisation) est suivie pour les symboles : TAL1 (en majuscules) : protéine ; *TAL1* (majuscules, italique) : gène humain ; *Tal1* (première lettre en majuscule, italique) : gène murin.

certaines situations physiologiques (cycle de la femme, grossesse et réparation tissulaire). Malheureusement, une angiogenèse dérégulée est un facteur aggravant de certaines pathologies chroniques inflammatoires (arthrite rhumatoïde, dégénérescence maculaire liée à l'âge...), et dans le cas de tumeurs où, en reliant directement la tumeur à la circulation sanguine générale et aux ganglions lymphatiques, elle favorise la formation de métastases dans d'autres tissus.

L'angiogenèse des vaisseaux sanguins ou lymphatiques, en réponse à un stimulus angiogénique quel qu'il soit, suit toujours la même séquence d'évènements (voir revue, Adams & Alitalo, 2007). Tout d'abord, des précurseurs endothéliaux circulants et des cellules myéloïdes spécialisées sont recrutés au niveau du site tumoral ou ischémique : c'est une étape essentielle pour initier le programme angiogénique réalisé par les cellules endothéliales (CE) des vaisseaux avoisinants (Lyden *et al.*, 2001 ; Nolan *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2008 ; Shojaei *et al.*, 2008). Suivent de multiples évènements de migration, prolifération, adhésion, et morphogenèse, finement régulés dans le temps, pour former un réseau de tubules interconnectés. Enfin, la maturation et la stabilisation des vaisseaux néoformés sont assurées par leur recouvrement par des cellules périvasculaires (péricytes ou cellules musculaires lisses). La réalisation d'un processus aussi complexe implique la coordination dans le temps et dans l'espace de multiples voies de signalisation et dépend en grande partie de la mise en place de programmes transcriptionnels spécifiques, sous l'action combinée de facteurs de transcription ubiquitaires et spécifiques de tissus. Parmi eux, on trouve certains membres de la famille ETS (pour revue, voir Dejana *et al.*, 2007), de la famille basique hélice-boucle-hélice, ou bHLH (Visvader *et al.*, 1998 ; Henderson *et al.*, 2001), et des protéines Id, leurs inhibiteurs de différenciation (Lyden *et al.*, 1999 ; Benezra *et al.*, 2001 ; Ruzinova *et al.*, 2003).

TAL-1 est essentiel au cours du développement pour la formation des systèmes hématopoïétique et vasculaire

Le gène bHLH *TAL-1*, également appelé *SCL*, a été identifié grâce à son implication dans des réarrangements chromosomiques spécifiques de leucémies aiguës lymphoblastiques de type T chez l'homme (voir revue, Lécuyer & Hoang, 2004). Au cours de l'embryogenèse, *Tal-1* est un des premiers marqueurs détectés dans les cellules du mésoderme qui donnent naissance aux angioblastes (précurseurs endothéliaux), puis son expression est fortement diminuée dans l'endothélium des vaisseaux matures

(Drake *et al.*, 1997 ; Drake & Fleming, 2000). Les expériences de recombinaisons homologues chez la souris ont révélé le rôle crucial de *Tal-1* dans le développement embryonnaire ; les embryons *Tal-1*^{-/-} meurent *in utero* au jour 8,5 pc, par suite d'une absence complète d'hématopoïèse dans le sac vitellin (Shivdasani *et al.*, 1995 ; Porcher *et al.*, 1996). Le rétablissement de l'expression de *Tal-1* dans les tissus hématopoïétiques des embryons *Tal-1*^{-/-} par transduction rétrovirale n'est pas suffisant pour sauver les embryons ; ceux-ci meurent un jour plus tard, en raison d'une absence de remodelage du réseau vasculaire primitif dans le sac vitellin, qui a été corrélée à un défaut intrinsèque des cellules endothéliales (Visvader *et al.*, 1998). *Tal-1* est requis pour la spécification des cellules hématopoïétiques primitives à partir d'un précurseur issu du mésoderme du sac vitellin, l'hémangioblaste, à l'origine des cellules sanguines et endothéliales (Robertson *et al.*, 2000 ; D'Souza *et al.*, 2005). La surexpression de *Tal-1* dans les embryons de poisson zèbre conduit à une augmentation des marqueurs hématopoïétiques et endothéliaux (Gering *et al.*, 1998). L'activité de *Tal-1* est ensuite fondamentale dans les processus cellulaires qui conduisent à la spécification des cellules souches hématopoïétiques définitives dans l'embryon proprement dit. Des délétions conditionnelles, permettant de contourner la létalité embryonnaire de *Tal-1*, ont révélé qu'il n'est pas nécessaire pour le maintien à long terme des cellules souches hématopoïétiques, et qu'il agit chez l'adulte uniquement dans les étapes tardives de production des cellules rouges et des plaquettes (Hall *et al.*, 2003 ; Mikkola *et al.*, 2003). *Tal-1* est donc un acteur majeur au cours du développement pour la formation des deux systèmes hématopoïétique et endothélial.

La protéine TAL-1 agit au sein d'un complexe multi-protéique incluant LMO2

TAL-1 code pour un membre de la famille basique hélice-boucle-hélice de classe II, dont le prototype est la protéine MyoD impliquée dans le contrôle de la myogenèse (Massari & Murre, 2000). Les protéines bHLHs possèdent en commun le module HLH structuralement très conservé, constitué de deux hélices amphipathiques séparées par une boucle (figure 1A). Le motif HLH est nécessaire d'une part à la structuration et au repliement des monomères, d'autre part à leur dimérisation avec les protéines E, bHLHs de classe I, telles que les produits du gène *E2A* dont l'expression tissulaire est très étendue. Les hétérodimères sont capables, *via* leur domaine basique situé à proximité du motif HLH de chacun des monomères, d'interagir avec

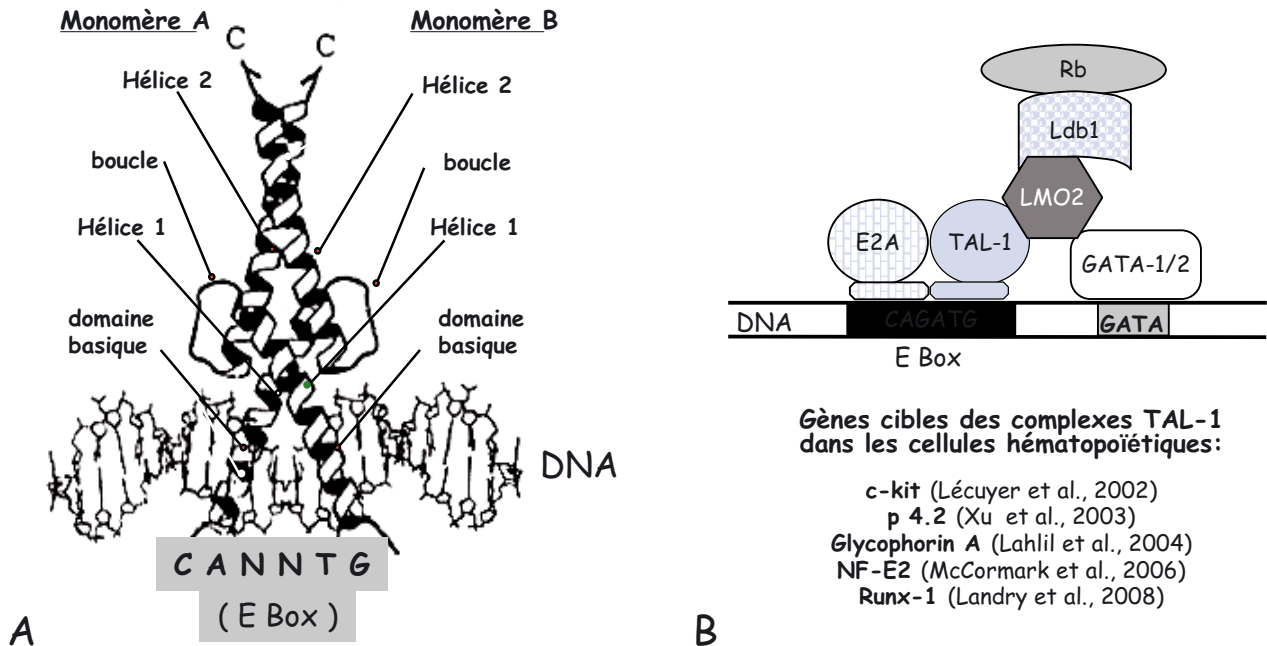


Fig. 1. *TAL-1* code pour un facteur de transcription bHLH qui agit au sein d'un complexe multi-protéique. (A) Modélisation des hétérodimères TAL-1-E47 au niveau de leur domaine HLH; l'interaction des dimères avec l'ADN s'effectue par la région basique des monomères qui fixe chacun la moitié du site CANNTG appelé boîte E. (B) TAL-1 interagit avec le promoteur de ses gènes cibles au niveau d'un motif constitué par une boîte E et un site de fixation pour les facteurs GATA. LMO2 en interagissant à la fois avec *TAL-1* et les facteurs GATA permet la constitution d'un complexe multi-protéique au niveau de ce motif.

des séquences spécifiques d'ADN dites « boîtes E » (CANNTG) présentes dans les régions cis régulatrices de nombreux gènes (Massari & Murre, 2000).

Comme la plupart des protéines bHLHs de classe II, TAL-1 exerce des fonctions cellulaires qui dépendent de la nature des interactions qu'elle établit avec d'autres facteurs nucléaires. Dans le système hématopoïétique, l'interaction de TAL-1 avec la protéine LMO2 semble requise dans toutes les fonctions de TAL-1 connues. D'ailleurs, les deux gènes *TAL-1* et *LMO2* ont un schéma d'expression pratiquement identique dans les lignées hématopoïétiques et endothéliales, aussi bien au cours du développement que chez l'adulte (Patterson et al., 2007). De plus, tout comme les embryons *Tal-1*^{-/-}, les embryons déficients pour *Lmo2* manifestent une létalité précoce consécutive à l'absence d'hématopoïèse primitive (Warren et al., 1994) et à une angiogenèse défectueuse au niveau du sac vitellin (Yamada et al., 2000). De nombreuses études ont montré que, dans les cellules hématopoïétiques, TAL-1 agit au sein de complexes multi-protéiques incluant entre autres les facteurs E47, LMO2, Ldb1 et un facteur GATA (GATA-1 ou GATA-2), qui contrôlent l'expression de gènes spécifiques (Lécuyer et al., 2002; Xu et al., 2003;

Lahlil et al., 2004; McCormack et al., 2006; Landry et al., 2008). L'activité transcriptionnelle du complexe passe par le recrutement de TAL-1 et de ses cofacteurs au niveau d'un motif présent dans le promoteur de ces gènes, constitué par une boîte E consensus associée à un ou deux motifs de reconnaissance des facteurs GATA (figure 1B).

L'activité de TAL-1 est corrélée avec le phénotype angiogénique des cellules endothéliales adultes

Dans les tissus adultes, en dehors de certaines cellules hématopoïétiques immatures de la moelle osseuse, l'expression de TAL-1 n'est observée que dans les vaisseaux en formation ou nouvellement formés (Kallianpur et al., 1994; Pulford et al., 1995). De plus, TAL-1 est fortement activé dans les tumeurs vasculaires (Chetty et al., 1997), et une étude récente de tumorigenèse induite chez la souris montre une expression de TAL-1 dans les cellules endothéliales (CEs) de capillaires lymphatiques ayant infiltré la tumeur (Tang et al., 2006). L'ensemble de ces observations

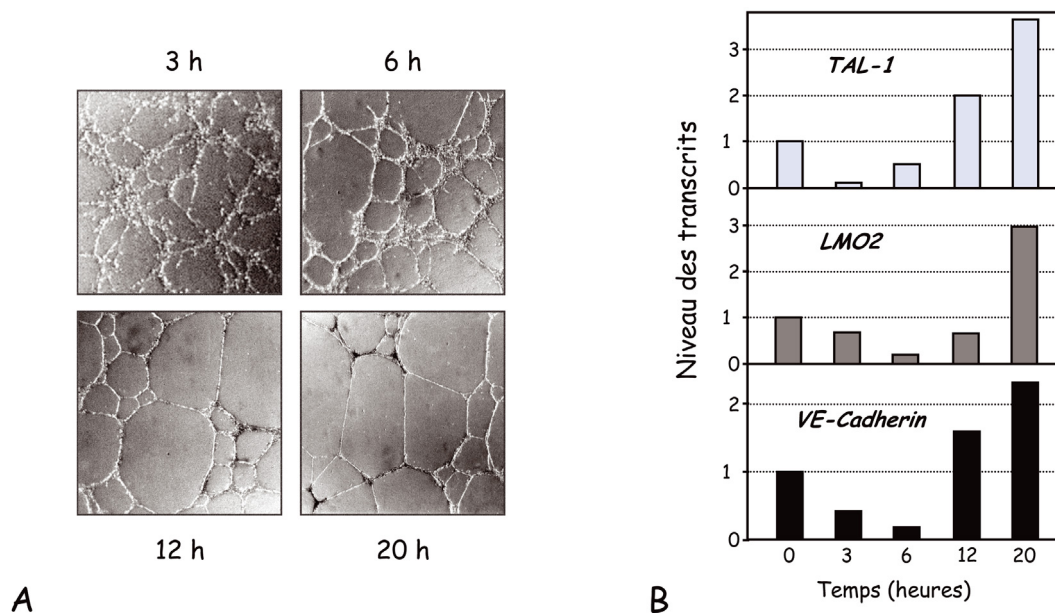


Fig. 2. Cinétique de l'expression de *TAL-1*, *LMO2* et *VE-Cadhérine* au cours de l'angiogenèse. (A) Morphogenèse bidimensionnelle des cellules HUVEC sur une matrice de Matrigel. (B) Les cellules ont été récupérées aux temps indiqués et analysées pour l'expression des transcrits *TAL-1*, *LMO2* et *VE-Cadhérine* par RT-PCR quantitative. Les niveaux sont normalisés par rapport aux transcrits *GAPDH*. La valeur 1 a été établie de façon arbitraire pour le niveau des transcrits des cellules au moment de l'ensemencement.

faites dans les tissus établit une corrélation entre l'expression de *TAL-1* et un état activé de l'endothélium.

La formation d'un nouveau réseau de tubules interconnectés débute par la rupture protéolytique de la membrane basale bordant un capillaire, qui conduit à la migration des CE habituellement quiescentes dans l'espace interstitiel. Une prolifération se produit à la base de la colonne des CE migrantes et allonge les cordons cellulaires. Quand le cordon atteint la taille appropriée, une lumière est formée au sein de chaque cordon, et ces nouveaux tubes fusionnent avec les vaisseaux préexistants pour créer des anastomoses fonctionnelles. Plusieurs modèles expérimentaux reproduisant certains de ces événements angiogéniques permettent d'aborder l'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu.

- *Angiogenèse in vitro en deux dimensions.* Les CE primaires, telles les HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial cells*), ensemencées sur une matrice tumorale extracellulaire (Matrigel) s'organisent en 24 h en un réseau pseudo-capillaire; ce test *in vitro* reproduit les étapes de migration, d'alignement, et de morphogenèse des cellules.
- *Tubulogenèse in vitro en trois dimensions.* Les CE insérées dans un gel de collagène I s'arrêtent de proliférer et l'addition de facteurs pro-angiogéniques déclenche un programme de différenciation tubulaire qui inclut la formation de jonctions adhérentes au niveau des contacts inter-

cellulaires et l'apparition de vacuoles intracellulaires, étape initiale dans la formation des lumières vasculaires. L'ensemble de ces événements conduit à l'élaboration d'un réseau tubulaire interconnecté en 2–3 jours.

- *Angiogenèse et lymphangiogenèse ex vivo à partir de l'aorte ou du canal thoracique de souris.* Des anneaux découpés à partir de l'aorte ou du canal thoracique de jeunes souris, placés au sein d'un gel de collagène en présence de sérum de l'animal, sont capables de former de nouveaux vaisseaux sanguins ou lymphatiques ramifiés entre 6 à 11 jours après la mise en culture (Masson *et al.*, 2002; Bruyère *et al.*, 2008).
- *Implants de Matrigel chez la souris.* Dans ce modèle, on implante en sous-cutanée un volume défini de matrice extracellulaire issue d'une tumeur (Matrigel) qui, en présence de cytokine pro-angiogénique (bFGF ou VEGF-C), recrute les CE de la souris et déclenche la formation de vaisseaux sanguins ou lymphatiques.

Les études de l'expression de *TAL-1* réalisées sur des cellules endothéliales primaires en culture corroborent les observations faites dans les tissus. La protéine *TAL-1* est observée dans toutes les CE en prolifération quelle que soit leur origine, et est fortement réduite lorsque les cellules sont placées en condition de quiescence; à l'inverse, une augmentation de *TAL-1* est corrélée à la formation *in vitro* d'un réseau

bidimensionnel de pseudo-capillaires (figure 2) ou tri-dimensionnel de tubules interconnectés (Deleuze *et al.*, 2007). Des études de perte de fonction, soit par interférence par les petits ARNs *in vitro* dans les CEs soit par l'expression dans les implants de Matrigel chez la souris d'un mutant de TAL-1 dominant négatif, démontrent que l'activité de TAL-1 est absolument requise dans les premiers événements morphogéniques. Les CEs déficientes pour TAL-1 ont gardé la capacité de migrer et de s'organiser en cordons cellulaires, mais sont incapables de générer des structures tubulaires (Lazrak *et al.*, 2004; Deleuze *et al.*, 2007). Inversement, l'expression ectopique de TAL-1 entraîne une très forte augmentation de la vascularisation des implants chez la souris, qui sont alors souvent saturés de sang; l'examen histologique montre une augmentation générale du diamètre des structures vasculaires formées, dont certaines évoquent de grandes lacunes vasculaires (Lazrak *et al.*, 2004). *L'ensemble de ces études montrent que TAL-1 agit comme facteur positif de l'angiogenèse aussi bien au cours du développement que chez l'adulte, et qu'il semble contrôler une ou des étapes précoces de la morphogenèse endothéliale.*

TAL-1 contrôle le processus de tubulogenèse en activant le gène codant pour la VE-cadhérine

La formation de la lumière vasculaire (ou tubulogenèse) se produit par canalisation intracellulaire et intercellulaire; les cellules assemblées en chaînettes génèrent des vésicules intra-cytoplasmiques qui fusionnent pour former une grande vacuole qui s'étend progressivement sur toute la longueur de la cellule. La vacuole rejoint alors celle de la cellule voisine pour former une lumière vasculaire continue (Kamei *et al.*, 2006). Par une approche d'interférence aux petits ARNs (siRNA), nous avons montré que la déplétion en TAL-1 inhibe la tubulogenèse des CEs *in vitro*; contrairement aux cellules témoins, les CEs déficientes en TAL-1 n'établissent pas de contact avec leurs voisines et ne forment plus aucune structure tubulaire. Au cours de ce processus, la VE-cadhérine joue un rôle essentiel dans l'établissement des jonctions intercellulaires et dans l'adhésion à la matrice extracellulaire (Dejana, 2004), ce qui en fait une cible candidate. De manière remarquable, l'extinction de TAL-1, ou d'un de ses cofacteurs E47 ou LMO2, conduit à une disparition de la VE-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes consécutive à une réduction globale de l'expression du gène *VE-Cadhérine (VE-CAD)*. La transcription de *VE-CAD*, constitutive dans les CEs proliférantes ou quiescentes est fortement activée dans les toutes premières étapes de la morphogenèse, de

façon parallèle à l'activation de *TAL-1* et *LMO2* (figure 2). Des expériences de transfections transitoires, de mutagenèse et d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que TAL-1, au sein d'un complexe multi-protéique incluant E47, LMO2 et GATA2, active directement le promoteur *VE-CAD* au cours de l'angiogenèse, en interagissant avec l'ADN au niveau d'un motif très conservé, comportant une boîte E associée à une séquence GATA (figure 3). Ces résultats identifient *VE-CAD* comme le premier gène cible de TAL-1 dans la lignée endothéliale et démontrent que TAL-1 agit avec les mêmes cofacteurs que dans les cellules hématopoïétiques (Deleuze *et al.*, 2007).

Ces données sont confirmées par la similitude des phénotypes vasculaires observés chez les embryons invalidés pour *Tal-1* (Visvader *et al.*, 1998), *Lmo2* (Yamada *et al.*, 2000) ou *VE-cadherin* (Carmeliet *et al.*, 1999); dans les trois cas, les embryons, incapables de remodeler leur vaisseaux primitifs par angiogenèse, meurent à un stade très précoce (E9-E10).

L'activité de TAL-1 est régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel

Nous avons vu précédemment qu'une modification du niveau d'activité de *TAL-1* (perte ou gain de fonction) perturbe fortement les propriétés angiogéniques des cellules endothéliales adultes. Le fait que *TAL-1* doit être actif à un moment donné dans la cascade angiogénique implique qu'il existe un (des) mécanisme(s) efficace(s) pour contrôler son activité. Des données de la littérature, il ressort que l'activité de *TAL-1* peut être régulée aussi bien au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel.

La transcription de *TAL-1* est très finement régulée par le jeu de trois promoteurs indépendants et spécifiques de tissus (Ia, Ib et IV), dont l'activité est elle-même sous le contrôle de différents modules activateurs répartis dans les régions 5' et 3' du locus, ainsi que de facteurs spécifiques de tissus. Une étude récente identifie le rôle essentiel des facteurs FLI-1, ERG et GATA-2 pour l'expression de *TAL-1* dans la lignée endothéliale (Chan *et al.*, 2007). La régulation de la transcription de *TAL-1* étant très complexe, elle ne sera pas décrite plus en détail ici (pour revue, Lécuyer & Hoang, 2004).

Deux isoformes de TAL-1 ont été identifiées dans les cellules (figure 4) : la forme p48, majoritaire, contenant les résidus 1-331 et une forme tronquée p24, qui ne possède que les résidus 176-331 (Bernard *et al.*, 1991; Elwood *et al.*, 1994). L'isoforme p24 résulte soit d'une initiation interne de la traduction d'un transcrite complet, c'est ce qui se produit au cours de la maturation érythroïde (Calkhoven *et al.*, 2003), soit de la traduction d'un transcrite tronqué en 5'

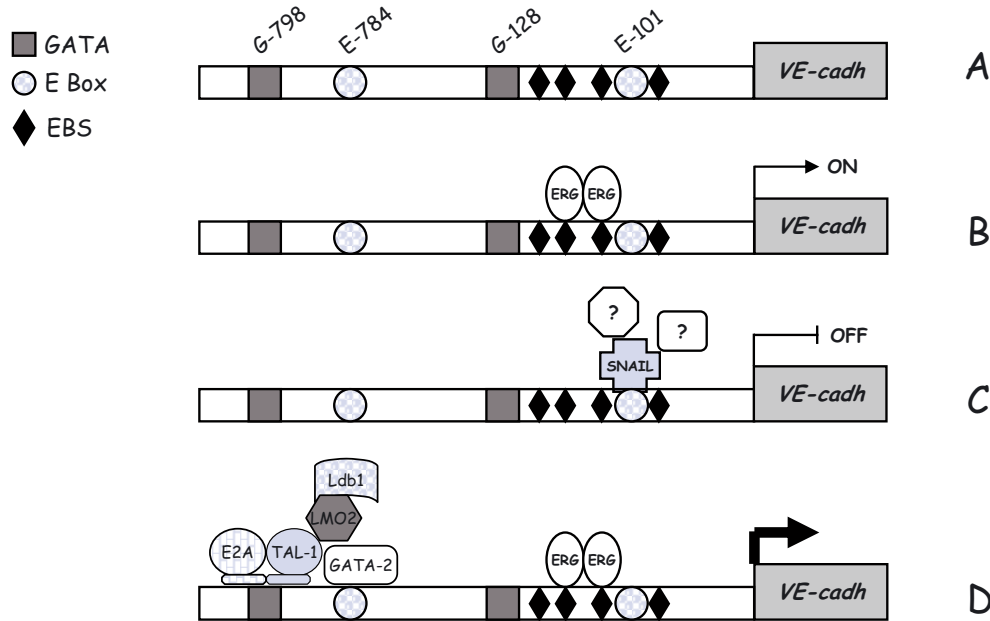


Fig. 3. Régulation complexe du gène *VE-Cadhérine* dans la lignée endothéliale. (A) Représentation schématique du promoteur *VE-Cadhérine* humain indiquant la position des sites de reconnaissance des facteurs de transcription GATA, bHLH (*E-box*) ou ETS (EBS). Noter que tous ces sites sont conservés chez les mammifères. (B) L'expression constitutive de *VE-Cadhérine* est dépendante de la fixation de deux sites ETS du promoteur proximal par le facteur ERG (Prandini *et al.*, 2005 ; Birdsey *et al.*, 2008). (C) SNAIL réprime le promoteur *VE-Cadhérine* via la boîte E du promoteur proximal, permettant la migration de certaines cellules endothéliales au moment de la formation de l'endocarde (Timmerman *et al.*, 2004). (D) TAL-1 active la transcription de *VE-cadhérine* au cours de l'angiogenèse au sein d'un complexe incluant LMO2 et GATA2 au niveau d'un motif constitué par une boîte E et un site GATA situé en amont du promoteur proximal (Deleuze *et al.*, 2007).

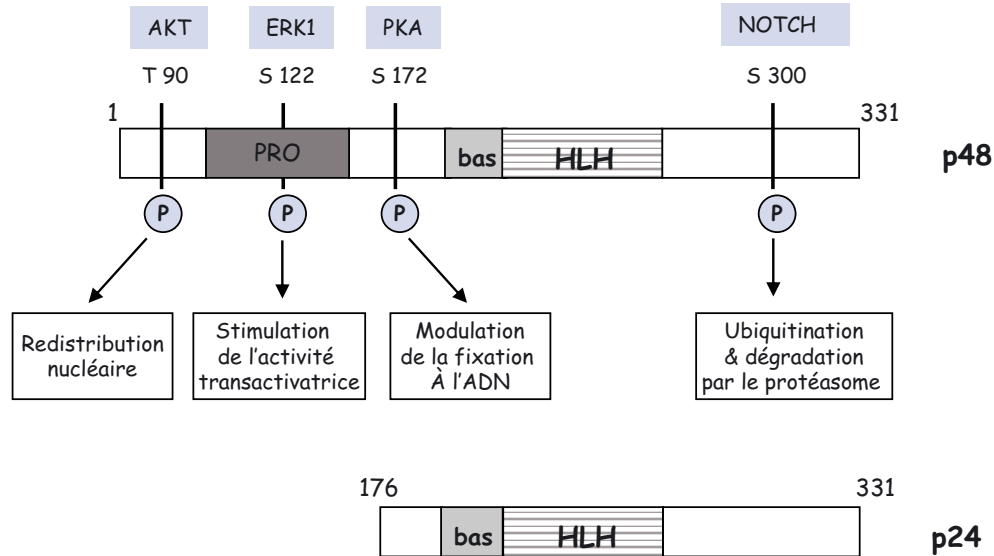


Fig. 4. Les activités de la protéine TAL-1 sont régulées par la phosphorylation de plusieurs résidus sérine (S) ou thréonine (T) par différentes voies de signalisation (AKT, ERK1, protéine Kinase A et NOTCH). PRO : domaine riche en résidus prolines possédant une activité de transactivation transcriptionnelle ; bas : domaine basique responsable de la localisation nucléaire et de la fixation à l'ADN ; HLH : motif hélice-boucle-hélice requis pour la dimérisation de TAL-1 avec une bHLH de classe I. L'isoforme p24, tronquée dans sa région aminotermine, ne contient pas le domaine régulateur de transcription.

initié à partir d'un promoteur interne dans les cellules leucémiques de type T (Bernard *et al.*, 1992). Les deux isoformes possédant le domaine bHLH interagissent avec les mêmes partenaires et les mêmes séquences d'ADN ; par contre, seule p48 contient dans sa région aminotermine un domaine riche en résidus prolines, potentiellement transactivateur ou répresseur. En effet, selon le contexte cellulaire et notamment le stade de différenciation, TAL-1 peut recruter au sein des complexes des coactivateurs comme p300 et p/CAF, (Huang *et al.*, 1999), ou des corépresseurs tels mSin3 (Huang & Brandt, 2000) ou ETO2 (Schuh *et al.*, 2005 ; Goardon *et al.*, 2006). Du fait de l'absence du domaine régulateur de transcription, l'isoforme tronquée de TAL-1 p24 pourrait, dans certains contextes, se comporter comme un dominant négatif de TAL-1, notamment en titrant les partenaires nucléaires de l'isoforme active p48.

L'activité de TAL-1 peut être modulée par le niveau d'expression de la protéine elle-même ; deux études ont décrit sa dégradation par la voie ubiquitine-protéasome, médiée notamment par la phosphorylation de la sérine 122 par la voie ERK dans des cellules endothéliales en conditions d'hypoxie (Tang *et al.*, 2002), ou de la sérine 300 carboxyterminale par l'activation de la voie Notch (Nie *et al.*, 2008). De plus, au cours de la maturation érythroïde, la caspase 3 activée clive la protéine p48 pour produire une isoforme proche de p24 qui est ensuite rapidement dégradée (Zeuner *et al.*, 2003).

La phosphorylation de certains résidus présents uniquement dans l'isoforme p48 influence également certaines de ses activités (figure 4) ; la phosphorylation de la thréonine 90 par la voie PI3K-AKT modifie sa localisation intranucléaire et inhibe son activité de répression de la transcription (Palamarchuk *et al.*, 2005), alors que la phosphorylation de la sérine 122 par ERK1, en réponse à l'érythropoïétine, stimule son activité de transactivation dans les érythroblastes (Wadman *et al.*, 1994). Enfin, la phosphorylation de la sérine 172 par la PKA module son activité de fixation à l'ADN (Prasad & Brandt, 1997).

Perspectives

TAL-1 établit de nombreuses interactions protéines-protéines essentielles pour la plupart des ses fonctions cellulaires, et nous avons vu que *LMO2* suit la même régulation que *TAL-1* au cours de l'hématopoïèse et au cours de l'angiogenèse. *LMO2*, interagissant à la fois avec TAL-1 et les facteurs GATA-1 ou -2, est essentiel pour la constitution de ces complexes multiprotéiques.

De même, la variation du niveau d'expression de certains facteurs HLHs endothéliaux peut modifier la

composition des complexes TAL-1 ou empêcher leur formation. Les travaux du groupe de Benezra ont identifié le rôle majeur des gènes *Id1* et *Id3* dans l'angiogenèse embryonnaire et tumorale (Benezra, 2001 ; Ruzinova *et al.*, 2003). Les gènes *Id* codent pour des facteurs HLHs dépourvus d'un domaine de fixation à l'ADN, qui forment des dimères inactifs avec les protéines bHLHs de classe I. Le niveau d'expression des transcrits *Id1* varie assez peu dans les cellules endothéliales, mais la protéine ID1 fait la navette entre le noyau et le cytoplasme ; lorsque les CEs sont placées en conditions angiogéniques, ID1 quitte rapidement le noyau pour rejoindre le cytoplasme (Nishiyama *et al.*, 2007) ; cette navette nucléocytoplasmique de ID1 pourrait contrôler la concentration des facteurs E libres dans le noyau, et de ce fait la formation des hétérodimères actifs TAL-1-E47 (figure 5B).

TAL-1 fait partie d'un sous-groupe de facteurs bHLHs défini par la conservation de leurs domaines bHLHs (figure 5A). Parmi eux, le facteur LYL est particulièrement intéressant car son domaine bHLH est pratiquement identique à celui de TAL-1 ; notamment, les résidus identifiés comme essentiels pour certaines activités spécifiques de TAL-1 (Schlaeger *et al.*, 2004) sont conservés et retrouvés à la même position dans le domaine HLH de LYL. De ce fait, TAL-1 et LYL interagissent avec les mêmes partenaires E47 et LMO2, et les mêmes séquences E-box. D'ailleurs, leurs domaines bHLHs sont fonctionnellement interchangeable, puisque le seul domaine bHLH de LYL est capable de rétablir l'hématopoïèse primitive dans les cellules ES *Tal-1*^{-/-} (Porcher *et al.*, 1999). Cependant, en dehors du domaine bHLH, LYL diffère totalement de TAL-1 ; LYL contracte des interactions spécifiques avec p105 NF- κ B1 (Ferrier *et al.*, 1999) et, *via* sa région aminotermine, avec le facteur de transcription CREB-1 (San-Marina *et al.*, 2008) et module l'activité de ces deux facteurs dans les cellules hématopoïétiques. Étant donné que NF- κ B et CREB1 sont tous deux actifs dans la plupart des cellules, il est vraisemblable que ces interactions se produisent également dans un environnement endothélial.

Contrairement aux souris invalidées pour *Tal-1*, les souris *Lyl*^{-/-} sont viables ; elles présentent cependant une diminution du nombre de cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse et une forte réduction de lymphocytes B circulants associée à un blocage de la différenciation B (Capron *et al.*, 2006). Il est probable que le phénotype modéré des souris déficientes pour *Lyl* est dû à une compensation par le domaine bHLH de TAL-1, puisque les deux gènes sont actifs dans les mêmes cellules au cours du développement embryonnaire. En effet, *Lyl* a un schéma d'expression chevauchant celui de *Tal-1* dans le système hématopoïétique aussi bien au cours du développement que chez l'adulte ; de plus,

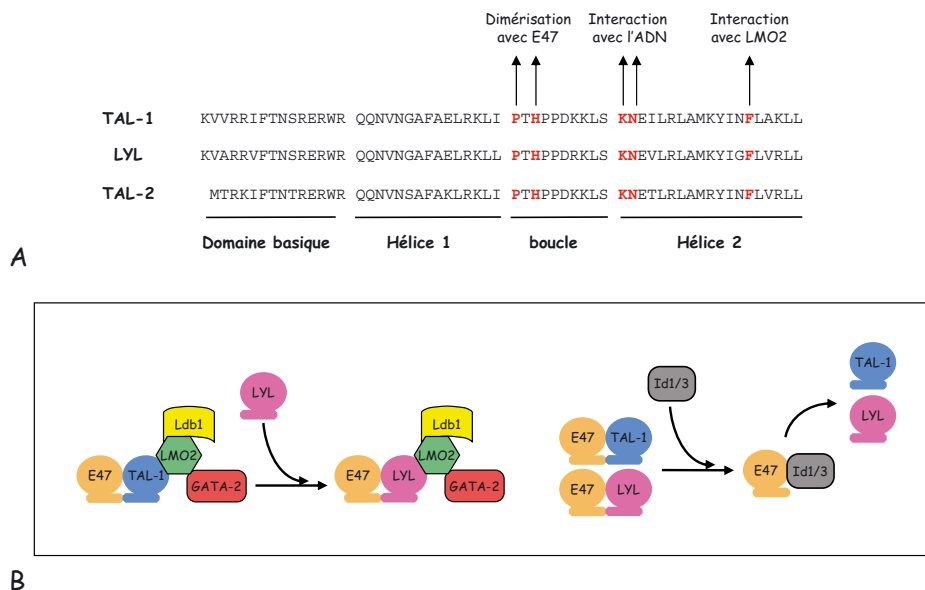


Fig. 5. Plusieurs facteurs HLH peuvent moduler l'activité de la protéine TAL-1 dans les cellules endothéliales. (A) Alignement de la séquence en aminoacides des domaines bHLH des protéines TAL-1, LYL et TAL-2. Les résidus indiqués en rouge, essentiels pour différentes fonctions de TAL-1 (Schlaeger *et al.*, 2004), sont conservés dans les trois protéines. (B) Un modèle pour illustrer la régulation des complexes TAL-1 dans les cellules endothéliales par l'augmentation du niveau d'expression des protéines LYL et ID dans le noyau.

il est coexprimé avec *Tal-1* dans l'endothélium embryonnaire (Giroux *et al.*, 2007). Par contre, à l'inverse de *TAL-1*, son expression est maintenue dans l'endothélium mature et notamment chez l'adulte (résultats du laboratoire non publiés). À partir de ces données, on peut émettre l'hypothèse d'une fonction double pour LYL dans la lignée endothéliale. D'une part, grâce à son domaine bHLH, elle pourrait prendre le relais de TAL-1 dans les complexes incluant LMO2 et GATA2 pour moduler un même ensemble de gènes (figure 5B). D'autre part, *via* son domaine aminoterminale et ses interactions avec NF- κ B et CREB-1, elle pourrait contrôler un ensemble de gènes totalement différents des cibles de TAL-1, notamment dans l'endothélium mature ou quiescent.

En conclusion, l'activité de TAL-1 dans la lignée endothéliale, et notamment au cours de l'angiogenèse, n'est pas le résultat du seul déclenchement de son expression mais aussi de la présence de ses partenaires dans un contexte donné. Comme dans le système hématopoïétique, TAL-1 opère dans le cadre d'un réseau complexe de facteurs nucléaires, qui sont capables de participer à des complexes différents selon le niveau d'expression de chacun et d'influencer un ensemble distinct de gènes.

Références

Adams R.H., Alitalo K., Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*,

2007, 8, 464–478.

Benezra R., Role of Id proteins in embryonic and tumor angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 2001, 11, 237–241.

Benezra R., Rafii S., Lyden D., The Id proteins and angiogenesis. *Oncogene*, 2001, 20, 8334–8341.

Bernard O., Azogui O., Lecointe N., Mugneret F., Berger R., Larsen C.J., Mathieu-Mahul D., A third tal-1 promoter is specifically used in human T cell leukemias. *J Exp Med*, 1992, 176, 919–925.

Bernard O., Lecointe N., Jonveaux P., Souyri M., Mauchauffé M., Berger R., Larsen C.J., 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, 1477–1488.

Birdsey G.M., Dryden N.H., Amsellem V., Gebhardt F., Sahnun K., Haskard D.O., Dejana E., Mason J.C., Randi A.M., Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood*, 2008, 111, 3498–3506.

Bruyère F., Melen-Lamalle L., Blacher S., Roland G., Thiry M., Moons L., Franken F., Carmeliet P., Alitalo K., Libert C., Sleeman J.P., Foidart J.M., Noël A., Modeling lymphangiogenesis in a three-dimensional culture system. *Nat Methods*, 2008, 5, 431–437.

Calkhoven C.F., Muller C., Martin R., Krosch G., Pietsch H., Hoang T., Leutz A., Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice. *Genes & Development*, 2003, 17, 959–964.

Capron C., Lécuse Y., Kaushik A.L., Foudi A., Lacout C., Sekkai D., Godin I., Albagli O., Poullion

- I., Svinartchouk F., Schanze E., Vainchenker W., Sablitzky F., Bennaceur-Griscelli A., Duménil D., The SCL relative LYL-1 is required for fetal and adult hematopoietic stem cell function and B-cell differentiation. *Blood*, 2006, 107, 4678–4686.
- Carmeliet P., Lampugnani M.G., Moons L., Breviario F., Compernelle V., Bono F., Balconi G., Spagnuolo R., Oostuyse B., Dewerchin M., Zanetti A., Angellilo A., Mattot V., Nuyens D., Lutgens E., Clotman F., de Ruiter M.C., Gittenberger-de Groot A., Poelmann R., Lupu F., Herbert J.M., Collen D., Dejana E., Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 1999, 98, 147–157.
- Chan W.Y., Follows G.A., Lacaud G., Pimanda J.E., Landry J.R., Kinston S., Knezevic K., Piltz S., Donaldson I.J., Gambardella L., Sablitzky F., Green A.R., Kouskoff V., Gottgens B., The paralogous hematopoietic regulators *Lyl1* and *Scl* are coregulated by *Ets* and *GATA* factors, but *Lyl1* cannot rescue the early *Scl*^{-/-} phenotype. *Blood*, 2007, 109, 1908–1916.
- Chetty R., Dada M.A., Boshoff C.H., Comley M.A., Biddolph S.C., Schneider J.W., Mason D.Y., Pulford K.A., Gatter K.C., TAL-1 protein expression in vascular lesions. *J Pathol*, 1997, 181, 311–315.
- D'Souza S.L., Elefanty A.G., Keller G., SCL/Tal-1 is essential for hematopoietic commitment of the hemangioblast but not for its development. *Blood*, 2005, 105, 3862–3870.
- Dejana E., Endothelial cell-cell junctions : happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5, 261–270.
- Dejana E., Taddei A., Randi A.M., Foxs and *Ets* in the transcriptional regulation of endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1775, 298–312.
- Deleuze V., Chalhoub E., El-Hajj R., Dohet C., Le Clech M., Couraud P.O., Huber P., Mathieu D., TAL-1/SCL and its partners E47 and LMO2 up-regulate VE-cadherin expression in endothelial cells. *Mol Cell Biol*, 2007, 27, 2687–2697.
- Drake C.J., Brandt S.J., Trusk T.C., Little C.D., TAL1/SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Dev Biol*, 1997, 192, 17–30.
- Drake C.J., Fleming P.A., Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood*, 2000, 95, 1671–1679.
- Elwood N.J., Green A.R., Melder A., Begley C.G., Nicola N., The SCL protein displays cell-specific heterogeneity in size. *Leukemia*, 1994, 8, 106–114.
- Ferrier R., Nougarede R., Doucet S., Kahn-Perlès B., Imbert J., Mathieu-Mahul D., Physical interaction of the bHLH LYL1 protein and NF-kappaB1 p105. *Oncogene*, 1999, 18, 995–1005.
- Gao D., Nolan D.J., Mellick A.S., Bambino K., McDonnell K., Mittal V., Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*, 2008, 319, 195–198.
- Gering M., Rodaway A.R., Gottgens B., Patient R.K., Green A.R., The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *Embo J*, 1998, 17, 4029–4045.
- Giroux S., Kaushik A.L., Capron C., Jalil A., Kelaidi C., Sablitzky F., Duménil D., Albagli O., Godin I., *lyl-1* and *tal-1/scl*, two genes encoding closely related bHLH transcription factors, display highly overlapping expression patterns during cardiovascular and hematopoietic ontogeny. *Gene Expr Patterns*, 2007, 7, 215–226.
- Goardon N., Lambert J.A., Rodriguez P., Nissaire P., Herblot S., Thibault P., Duménil D., Strouboulis J., Romeo P.H., Hoang T., ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *Embo J*, 2006, 25, 357–366.
- Hall M.A., Curtis D.J., Metcalf D., Elefanty A.G., Sourris K., Robb L., Gothert J.R., Jane S.M., Begley C.G., The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100, 992–997.
- Henderson A.M., Wang S.J., Taylor A.C., Aitkenhead M., Hughes C.C.W., The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 6169–6176.
- Huang S., Brandt S.J., mSin3A regulates murine erythroleukemia cell differentiation through association with the TAL1 (or SCL) transcription factor. *Mol Cell Biol*, 2000, 20, 2248–2259.
- Huang S., Qiu Y., Stein R.W., Brandt S.J., p300 functions as a transcriptional coactivator for the TAL1/SCL oncoprotein. *Oncogene*, 1999, 18, 4958–4967.
- Kallianpur A.R., Jordan J.E., Brandt S.J., The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood*, 1994, 83, 1200–1208.
- Kamei M., Saunders W.B., Bayless K.J., Dye L., Davis G.E., Weinstein B.M., Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles *in vivo*. *Nature*, 2006, 442, 453–456.
- Lahlil R., Lécuyer E., Herblot S., Hoang T., SCL assembles a multifactorial complex that determines glycoprotein A expression. *Mol Cell Biol*, 2004, 24, 1439–1452.
- Landry J.R., Kinston S., Knezevic K., de Bruijn M.F., Wilson N., Nottingham W.T., Peitz M., Edenhofer F., Pimanda J.E., Ottersbach K., Gottgens B., Runx genes are direct targets of *Scl*/*Tal1* in the yolk sac and fetal liver. *Blood*, 2008, 111, 3005–3014.
- Lazrak M., Deleuze V., Noël D., Haouzi D., Chalhoub E., Dohet C., Robbins I., Mathieu D., The bHLH TAL-1/SCL regulates endothelial cell migration and morphogenesis. *J Cell Sci*, 2004, 117, 1161–1171.
- Lécuyer E., Herblot S., Saint-Denis M., Martin R., Begley C.G., Porcher C., Orkin S.H., Hoang T., The SCL complex regulates *c-kit* expression in hematopoietic cells through functional interaction with *Sp1*. *Blood*, 2002, 100, 2430–2440.
- Lécuyer E., Hoang T., SCL : from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol*, 2004, 32, 11–24.

- Lyden D., Hattori K., Dias S., Costa C., Blaikie P., Butros L., Chadburn A., Heissig B., Marks W., Witte L., Wu Y., Hicklin D., Zhu Z., Hackett N.R., Crystal R.G., Moore M.A.S., Hajjar K.A., Manova K., Benezra R., Rafii S., Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature Med.*, 2001, 7, 1194–1201.
- Lyden D., Young A.Z., Zagzag D., Yan W., Gerald W., O'Reilly R., Bader B.L., Hynes R.O., Zhuang Y., Manova K., Benezra R., Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*, 1999, 401, 670–677.
- Massari M.E., Murre C., Helix-loop-helix proteins : regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol*, 2000, 20, 429–440.
- Masson V.V., Devy L., Grignet-Debrus C., Bernt S., Bajou K., Blacher S., Roland G., Chang Y., Fong T., Carmeliet P., Foidart J.M., Noël A., Mouse Aortic Ring Assay : A New Approach of the Molecular Genetics of Angiogenesis. *Biol Proced Online*, 2002, 4, 24–31.
- McCormack M.P., Hall M.A., Schoenwaelder S.M., Zhao Q., Ellis S., Prentice J.A., Clarke A.J., Slater N.J., Salmon J.M., Jackson S.P., Jane S.M., Curtis D.J., A critical role for the transcription factor Scl in platelet production during stress thrombopoiesis. *Blood*, 2006, 108, 2248–2256.
- Mikkola H.K., Klintman J., Yang H., Hock H., Schlaeger T.M., Fujiwara Y., Orkin S.H., Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature*, 2003, 421, 547–551.
- Nie L., Wu H., Sun X.H., Ubiquitination and degradation of Tal1/SCL are induced by Notch signaling and depend on Skp2 and CHIP. *J Biol Chem*, 2008, 283, 684–692.
- Nishiyama K., Takaji K., Uchijima Y., Kurihara Y., Asano T., Yoshimura M., Ogawa H., Kurihara H., Protein kinase A-regulated nucleocytoplasmic shuttling of Id1 during angiogenesis. *J Biol Chem*, 2007, 282, 17200–17209.
- Nolan D.J., Ciarrocchi A., Mellick A.S., Jaggi J.S., Bambino K., Gupta S., Heikamp E., McDevitt M.R., Scheinberg D.A., Benezra R., Mittal V., Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev*, 2007, 21, 1546–1558.
- Palamarchuk A., Efanov A., Maximov V., Aqeilan R.I., Croce C.M., Pekarsky Y., Akt phosphorylates Tal1 oncoprotein and inhibits its repressor activity. *Cancer Res*, 2005, 65, 4515–4519.
- Patterson L.J., Gering M., Eckfeldt C.E., Green A.R., Verfaillie C.M., Ekker S.C., Patient R., The transcription factors Scl and Lmo2 act together during development of the hemangioblast in zebrafish. *Blood*, 2007, 109, 2389–2398.
- Porcher C., Liao E.C., Fujiwara Y., Zon L.I., Orkin S.H., Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. *Development*, 1999, 126, 4603–4615.
- Porcher C., Swat W., Rockwell K., Fujiwara Y., Alt F.W., Orkin S.H., The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell*, 1996, 86, 47–57.
- Prandini M.H., Dreher I., Bouillot S., Benkerri S., Moll T., Huber P., The human VE-cadherin promoter is subjected to organ-specific regulation and is activated in tumour angiogenesis. *Oncogene*, 2005, 24, 2992–3001.
- Prasad K.S., Brandt S.J., Target-dependent effect of phosphorylation on the DNA binding activity of the TAL1/SCL oncoprotein. *J Biol Chem*, 1997, 272, 11457–11462.
- Pulford K., Lecoite N., Leroy V.K., Jones M., Mathieu M.D., Mason D.Y., Expression of TAL-1 proteins in human tissues. *Blood*, 1995, 85, 675–684.
- Robertson S.M., Kennedy M., Shannon J.M., Keller G., A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor SCL/tal-1. *Development*, 2000, 127, 2447–2459.
- Ruzinova M.B., Schoer R.A., Gerald W., Egan J.E., Pandolfi P.P., Rafii S., Manova K., Mittal V., Benezra R., Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors. *Cancer Cell*, 2003, 4, 277–289.
- San-Marina S., Han Y., Suarez Saiz F., Trus M.R., Minden M.D., Lyl1 interacts with CREB1 and alters expression of CREB1 target genes. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783, 503–517.
- Schlaeger T.M., Schuh A., Flitter S., Fisher A., Mikkola H., Orkin S.H., Vyas P., Porcher C., Decoding hematopoietic specificity in the helix-loop-helix domain of the transcription factor SCL/Tal-1. *Mol Cell Biol*, 2004, 24, 7491–7502.
- Schuh A.H., Tipping A.J., Clark A.J., Hamlett I., Guyot B., Iborra F.J., Rodriguez P., Strouboulis J., Enver T., Vyas P., Porcher C., ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Mol Cell Biol*, 2005, 25, 10235–10250.
- Shivdasani R.A., Mayer E.L., Orkin S.H., Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature*, 1995, 373, 432–434.
- Shojaei F., Zhong C., Wu X., Yu L., Ferrara N., Role of myeloid cells in tumor angiogenesis and growth. *Trends Cell Biol*, 2008, 18, 372–378.
- Tang T., Arbiser J.L., Brandt S.J., Phosphorylation by Mitogen-activated Protein Kinase Mediates the Hypoxia-induced Turnover of the TAL1/SCL Transcription Factor in Endothelial Cells. *J Biol Chem*, 2002, 277, 18365–18372.
- Tang T., Shi Y., Opalenik S.R., Brantley-Sieders D.M., Chen J., Davidson J.M., Brandt S.J., Expression of the TAL1/SCL transcription factor in physiological and pathological vascular processes. *J Pathol*, 2006, 210, 121–129.
- Timmerman L.A., Grego-Bessa J., Raya A., Bertran E., Perez-Pomares J.M., Diez J., Aranda S., Palomo S.,

- McCormick F., Izipisua-Belmonte J.C., de la Pompa J.L., Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev*, 2004, 18, 99–115.
- Visvader J.E., Fujiwara Y., Orkin S.H., Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev*, 1998, 12, 473–479.
- Wadman I.A., Hsu H.L., Cobb M.H., Baer R., The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain. *Oncogene*, 1994, 9, 3713–3716.
- Warren A.J., Colledge W.H., Carlton M.B., Evans M.J., Smith A.J., Rabbitts T.H., The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell*, 1994, 78, 45–57.
- Xu Z., Huang S., Chang L.S., Agulnick A.D., Brandt S.J., Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol Cell Biol*, 2003, 23, 7585–7599.
- Yamada Y., Pannell R., Forster A., Rabbitts T.H., The oncogenic LIM-only transcription factor Lmo2 regulates angiogenesis but not vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97, 320–324.
- Zeuner A., Eramo A., Testa U., Felli N., Pelosi E., Mariani G., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Condorelli G., Peschle C., De Maria R., Control of erythroid cell production *via* caspase-mediated cleavage of transcription factor SCL/Tal-1. *Cell Death Differ*, 2003, 10, 905–913.