

Université de Montréal

Étude de l'influence du facteur de transcription EKLF sur la régulation épigénétique du
locus de la β -globine humaine lors de l'hématopoïèse

Par

Angélique Aumont

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Biologie Moléculaire

Avril, 2004

©, Angélique Aumont, 2004



QH

506

U54

2004

V.006

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Étude de l'influence du facteur de transcription EKLF sur la régulation épigénétique du
locus de la β -globine humaine lors de l'hématopoïèse

présenté par :
Angélique Aumont

A été évalué par le jury composé des personnes suivantes :

Dr. Abdellah Belmaaza
président-rapporteur

Dr. Éric Milot
directeur de recherche

Dre. Marie Trudel
membre du jury

Résumé en français

Les interactions du facteur de transcription EKLF avec les co-activateurs p300/CBP et le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, ainsi qu'avec le co-répresseur HDAC pourraient placer ce facteur au centre de l'intégration de signaux dans l'érythropoïèse. Nous avons investigué le rôle de EKLF dans la régulation épigénétique du locus de la globine β humaine. Pour ce faire, nous avons isolé des populations de progéniteurs et de cellules érythroïdes proficientes et déficientes pour EKLF à partir de foies fœtaux de fœtus transgéniques. Nous avons établi le patron des modifications des histones du locus pour les quatre populations de cellules isolées. Nous avons observé que l'acétylation générale des histones du locus augmente durant la différenciation. Nos résultats suggèrent que cette augmentation d'acétylation est dépendante de EKLF. Comme EKLF est également exprimé dans les cellules érythroïdes primitives, nous avons vérifié s'il influence l'acétylation à ce stade. Nos résultats suggèrent que EKLF est important pour un haut niveau d'acétylation de la région du HS3 dans ces cellules. EKLF pourrait donc influencer, de façon directe ou indirecte, l'acétylation du locus dans les cellules érythroïdes primitives et définitives.

Mots clés : histone, acétylation, méthylation, progéniteur hématopoïétique, cellule érythroïde définitive primitive

Résumé en anglais

Since EKLF transcription factor can interact with coactivators such as p300/CBP and SWI/SNF remodelling complex, and with the corepressor HDAC, it could be a good candidate able to integrate signalling in erythropoiesis. We have investigated the role of EKLF in epigenetic regulation of the human β -globin locus in transgenic mice. We have isolated progenitors and erythroid cells wild type or knockout for EKLF from fetal liver. We have established the histone modification pattern of the four populations we have isolated. We observe higher histone acetylation of the locus in more mature cells. Our results suggest that the acetylation status is dependant on the presence of EKLF. Moreover, since EKLF is expressed in primitive erythroid cells, we have investigated if EKLF could influence the acetylation status in these cells. It seems that EKLF is also required for histone acetylation in these cells, at least in the HS3 region. So, EKLF could directly or indirectly influence the establishment of acetylation at the β -globin locus in both primitive and definitive erythroid cells.

Key words: histone, acetylation, methylation, hematopoietic progenitor cell, definitive and primitive erythroid cell

Table des matières

Résumé en français	iii
Résumé en anglais	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et des abréviations	ix
Liste des sigles et des abréviations	ix
Remerciements	xii
1. Introduction	1
1.1. Hématopoïèse définitive	2
1.2. La globine	5
1.2.1 Le LCR de la globine β	6
1.3. La régulation épigénétique et la globine β	9
1.3.1 Chromatine	9
1.3.2 Facteurs de transcription	14
1.4 EKLf dans la régulation épigénétique	18
1.4 Résumé	20
1.5 Prémisse	20
1.6 Hypothèse	21
2. Matériel et méthodes	23
2.1 Lignées de souris	24
2.2 Cytométrie	24
2.2.1 Cellules érythroïdes de foie foetal	24
2.2.2 Cellules de type progéniteur de foie foetal	24
2.3 Isolation de cellules érythroïdes primitives	25
2.4 Culture en milieu semi-solide de méthylcellulose	26
2.5 Analyse de l'expression dans les cellules enrichies en progéniteurs	26
2.5.1 Transcription inverse et PCR en une étape «One step RT-PCR»	26
2.5.2 «Essai de transcription inverse standard»	27
2.6 Immunoprécipitation de la chromatine	27
2.7 Analyse semi-quantitative par PCR radioactif en duplex	28

3. Résultats	30
3.1 Établissement des populations de cellules.....	31
3.1.1 Cellules de la lignée érythroïde	31
3.1.2 Isolation des cellules de type progéniteur	33
3.2 Expression de EKLF dans les cellules enrichies en progéniteurs	37
3.3 Expression des gènes adultes de la globine β dans les progéniteurs.....	39
3.4 Acétylation des histones et EKLF	41
3.5 Rôle de EKLF dans les cellules érythroïdes primitives	50
3.6 La di-méthylation des histones et EKLF.....	53
4. Discussion.....	56
4.1 Réactivité des cellules EKLF <i>knock-out</i> à l'anticorps TER-119	57
4.2 EKLF est exprimé dans les progéniteurs CD31^{high}Ly6C⁻	58
4.3 Expression basale des gènes adultes de la globine β dans les cellules enrichies en progéniteurs.....	59
4.4 Différences entre les cellules de la moelle osseuse et des cellules du foie fœtal	60
4.5 Influence de EKLF sur l'acétylation des histones	62
4.6 EKLF dans les cellules érythroïdes primitives	65
4.7 Influence de EKLF sur la di-méthylation	65
4.8 Rôle de EKLF dans la structure de la chromatine	66
5. Références	69
Annexe I	xiii

Liste des tableaux

Tableau I: Liste des amorces utilisées	29
Tableau II: Essai clonogénique en méthyl-cellulose à partir de cellules de foie fœtal 14,5dpc	33
Tableau III: Capacité de 500 cellules CD31^{high}Ly6C⁻ à former des colonies en méthyl-cellulose	37

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse définitive adapté de Charpentier 1996	2
Figure 2 : Expression du marqueur de surface TER-119	32
Figure 3: Exemple de tri de cellules de type progéniteur de foie fœtal 14,5dpc.....	34
Figure 4: Exemple de tri de cellules de type progéniteur de foie fœtal EKLF <i>knock-out</i> 14,5dpc	35
Figure 5: Représentation schématique des populations de cellules utilisées dans ce travail adapté à partir du volume de Charpentier (1996).....	36
Figure 6: Expression de EKLF dans les cellules enrichies en progéniteurs	38
Figure 7 : Expression des gènes adultes de la globine β murine et humaine dans les cellules enrichies en progéniteurs	40
Figure 8 : Exemple d'échantillons de CHIP	43
Figure 9 : Patron d'acétylation des histones H3 et H4 dans les cellules érythroïdes.	44
Figure 10 : Patron d'acétylation des histones H3 et H4 dans les cellules de type progéniteur.	45
Figure 11 : Acétylation des histones H3 en présence et en absence de EKLF.....	47
Figure 12 : Acétylation des histones H4 dans les cellules érythroïdes en présence ou en absence de EKLF	48
Figure 13 : Acétylation des histones H3 de la région du promoteur et de la région codante du gène β.....	49
Figure 14 : Acétylation des histones H4 de la région du promoteur β et de la région codante du gène β.	50
Figure 15 : Acétylation des histones de la région du HS3 dans les cellules érythroïdes primitives.....	51
Figure 16 : Acétylation des histones de la région du promoteur β dans les cellules érythroïdes primitives.....	52
Figure 17 : Di-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3.....	54
Figure 18 : Di-méthylation de H3K4 dans la région du gène β.....	55

Liste des sigles et des abréviations

ACF: *ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor*

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire

AML: *acute myeloid leukemia*

ARN: acide ribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messenger

ATP: adénosine 5'-triphosphate

ATPase: adénosine triphosphatase

BFU-E: *burst forming unit-erythroid*

CBP: *CREB binding protein*

CFC: *colony forming cell*

CFU-E: *colony forming unit-erythroid*

CFU-Eo: *colony forming unit-eosinophile*

CFU-G: *colony forming unit-granulocyte*

CFU-GEMM : *colony forming unit-granulocyte erythroid macrophage megakaryocyte*

CFU-GM: *colony forming unit-granulocyte macrophage*

CFU-M: *colony forming unit-macrophage*

CFU-Mast: *colony forming unit-mastocyte*

CFU-Meg: *colony forming unit-megacaryocyte*

ChIP : *chromatine immunoprecipitation*

CHRAC: *chromatin accessibility complex*

DNaseI: désoxyribonucléase I

dpc: jour après le coït

DRB : 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl-benzimidazole

E : enrichissement

EB: *embryoid body* ou corps embryonnaire

EKLF: *Erythroid Krüppel like factor*

E-RC1: *EKLF coactivator-remodeling complex 1*

FACS: *fluorescent-activated cell sorting*

FBS: *fetal bovine serum*

FITC: *fluorescein isothiocyanate*

FKLF: *fetal Krüppel like factor*

FOG-1: *friend of GATA-1*

GAPDH : *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GATA-1: facteur de transcription liant la séquence GATA

GP : glycophorine

h : heure

H3A: histones H3 acétylées

H4A: histones H4 acétylées

H3K4 : histone 3 lysine 4

H3K4: histone H3 lysine 4

H3K9: histone H3 lysine 9

HAT: *histone acetyl transferase*

hBRG1: *human BRG1*

hBRM: *human BRM*

HDAC: *histone deacetylase*

HPC: *hematopoietic progenitor cell*

HS: *hypersensitive site*

HSC : *hematopoietic stem cell*

IgG: immunoglobuline G

ISWI: *imitation SWI*

IVS: *intervining sequences*

K : lysine

kb :1000 paires de bases

LCR: *locus control region*

Ln2 : lignée 2 ou *line 2*

Lys: lysine

MEL: *mouse erythroleukemia*

min: minute(s)

M-MLV RT : *moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*

NF-E2: *nuclear factor erythroid 2*

nm: nanomètre

NURF: *nucleosome-remodeling factor*

pb: paires de bases

PBS: *phosphate-buffered saline*

PCR: *polymerase chain reaction*

pmol: picomol

rh: recombinant humain

rm: recombinant murin

R-PE: *R-phycoerythrin*

RT-PCR: *reverse transcriptase couple polymerase chain reaction*

Sav-TC: *streptavidin tri-color conjugated*

Sec: seconde(s)

SWI/SNF: *switching and/or sucrose nonfermentor*

α : seuil de probabilité ou de signification

β prom: région du promoteur β

β gène: région codante du gène β

γ prom: région du promoteur γ

γ gène: région codante du gène γ

λ : marqueur de poids moléculaire

°C: degré Celsius

= : égale

%: pourcentage

-/- : *knock-out*

+/+ : *wild-type*

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Éric Milot, et Dre Stefania Bottardi pour leur aide précieuse, leur implication dans le projet et la communication de leur savoir théorique et pratique. Merci aux membres du laboratoire pour leur aide technique. Un merci particulier à Caroline Valat et Sébastien Landry pour leur lecture critique de mon mémoire. Merci à Sophie Ouellet pour les phénotypes et les tris cellulaires. Merci à Antonia Balassy pour son aide avec les essais clonogéniques en particulier lors de l'identification des colonies. Merci à Silvana Lachance pour son bon moral à chaque jour et sa sagesse de grand-maman. Un merci particulier à Benoit pour avoir été présent dans ma vie dans certains moments plus difficiles.

1. Introduction

1.1. Hématopoïèse définitive

L'hématopoïèse est le processus par lequel les différentes cellules du sang sont formées et renouvelées. Chez l'adulte, la moelle osseuse est le site principal de l'hématopoïèse. Chez l'embryon, deux sites se succèdent : le sac vitellin et le foie fœtal. Quelques rares cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont à l'origine de toutes les cellules sanguines (figure 1, page 2). Ces cellules ont la capacité de se renouveler et de se différencier pour donner naissance à de nombreuses cellules différenciées.

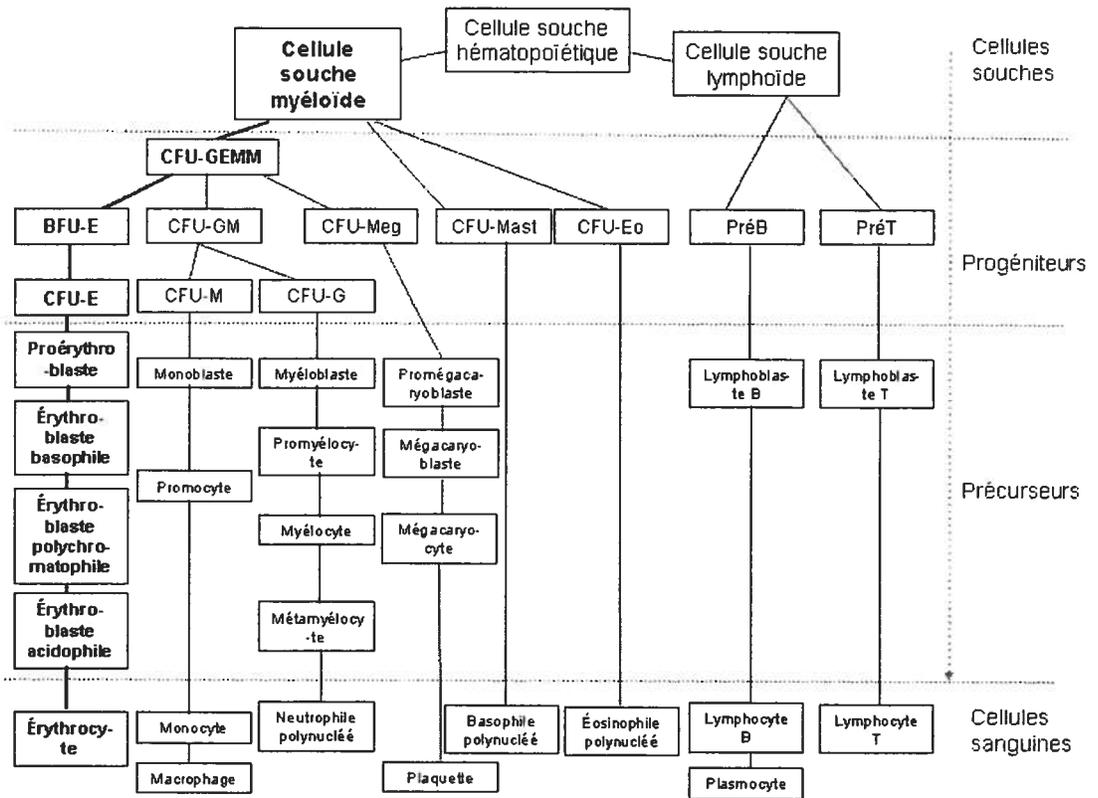


Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse définitive adapté de Charpentier 1996

Les cellules souches hématopoïétiques occupent la plus haute marche hiérarchique. Les différents progéniteurs sont CFU-GEMM (*colony forming unit-granulocyte erythroid megakaryocyte*), BFU-E (*burst forming unit-erythroid*), CFU-E (*colony forming unit-erythroid*), CFU-GM (*colony forming unit-granulocyte macrophage*), CFU-G (*colony forming unit-granulocyte*), CFU-M (*colony forming unit-macrophage*), CFU-Meg (*colony forming unit-megakaryocyte*), CFU-Mast (*colony forming unit-mastocyte*), CFU-Eo (*colony forming unit-eosinophile*), Pré-B et Pré-T. L'embranchement de l'érythropoïèse est indiqué en gras.

Les cellules faisant partie de l'hématopoïèse peuvent être classées selon leurs stades de différenciation. La première classe est celle des HSC. Ces cellules sont définies par les caractéristiques suivantes : elles sont pluripotentes et indifférenciées, et elles sont capables de s'autorenouveler et de proliférer (revu par Orkin, 2000). La deuxième classe est celle des progéniteurs. Les progéniteurs sont formés par la différenciation des HSC. Les progéniteurs peuvent être orientés vers une lignée cellulaire. Ces cellules sont capables de proliférer et de s'autorenouveler à court terme, mais elles ont perdu la capacité de le faire à long terme. Grâce à leur capacité à former des CFC (*colony forming cells*), on peut mettre en évidence les progéniteurs d'une population par essai clonogénique en milieu semi-solide de méthyl-cellulose (revu par Charpentier, 1996). La troisième classe de cellules est celle des précurseurs. Cette classe est générée par les cellules progéniteurs et elle est caractérisée par la maturation des cellules commises. Le potentiel prolifératif y est moins élevé que dans les deux classes précédentes (revu par Charpentier, 1996). De plus, on y retrouve l'expression de protéines lignées spécifiques. Dans la dernière classe, on retrouve les cellules sanguines matures. Ces cellules sont spécialisées pour des fonctions précises et elles ne prolifèrent plus (revu par Charpentier, 1996). Selon le stade de différenciation, les cellules expriment des antigènes de surface qui sont spécifiques à leur lignée. Pour caractériser la lignée et le stade de différenciation d'une cellule, il est souvent nécessaire d'utiliser plus d'un antigène de surface.

Plusieurs recherches focalisent présentement sur l'élucidation du processus qui est à l'origine de la différenciation des HSC et de ce qui décide dans quelle branche de l'hématopoïèse les HSC se destinent. L'hypothèse du "lineage priming" propose qu'avant l'engagement de la cellule vers une lignée cellulaire ou une autre, les gènes de différentes lignées sont exprimés en même temps (revu par Orkin, 2003). La présence de plusieurs programmes d'expression de gènes de lignées différentes à un niveau faible ou partiel dans les HSC, pourrait leur permettre de s'engager rapidement dans une lignée spécifique suite à des signaux intra- ou extra-cellulaires (revu par Orkin, 2003). L'hypothèse du "lineage priming" a été élaborée suite à l'observation que dans des cellules individuelles de types hématopoïétiques multipotentes, plusieurs facteurs de

transcription et gènes de différentes lignées spécifiques sont exprimés simultanément (Hu et *al.*, 1997). Depuis l'étude de Hu et *al.* (1997), d'autres résultats ont corroboré à cette hypothèse notamment ceux de Miyamoto et *al.* (2002) et de Ye et *al.* (2003).

L'érythropoïèse est la branche de l'hématopoïèse qui donne naissance aux érythrocytes (embranchement en gras de la figure 1, page 2). Les cellules souches myéloïdes se différencient pour donner naissance à différents progéniteurs. Les progéniteurs CFU-GEMM sont commis aux lignées de cellules granulocytes, érythroïdes, macrophages et mégacaryocytes, tandis que les progéniteurs BFU-E et CFU-E sont tous deux commis à la lignée des cellules érythroïdes seulement. On peut observer la présence de ces progéniteurs *in vitro* en méthyl-cellulose supplémenté de facteurs de croissance après 5 à 14 jours de culture (revu par Speck et *al.*, 2002). Les CFU-GEMM sont plus précoces que les BFU-E qui eux sont plus précoces que les CFU-E. En méthyl-cellulose, cette caractéristique est visualisée par la taille des colonies formées, donc les CFU-GEMM étant les plus précoces, ils vont former de plus grandes colonies composées de cellules mixtes (Stem Cell Technologies, 2003). Lors de la différenciation, les CFU-E, les progéniteurs les plus différenciés, vont donner naissance à une série de précurseurs érythroïdes. Selon leur degré de maturation, les précurseurs de la lignée érythroïde expriment, en plus ou moins grande quantité, des protéines érythroïdes spécifiques. Plus les précurseurs érythroïdes sont matures, plus ils accumulent de l'hémoglobine. À la fin du processus de maturation, les cellules érythroïdes expulsent leur noyau et migrent dans le sang (revu par Charpentier, 1996).

L'hématopoïèse définitive réfère au système hématopoïétique foetal et adulte, tandis que l'hématopoïèse primitive réfère au système hématopoïétique embryonnaire (revu par Speck et *al.*, 2002). Les cellules érythroïdes primitives (ou embryonnaires) sont formées dans les îlots vasculo-sanguins du sac vitellin (revu par Palis et Yoder, 2001). Les cellules érythroïdes primitives conservent leur noyau, comparativement aux érythrocytes définitives qui expulsent leur noyau à la fin de leur maturation. En plus des cellules érythroïdes primitives, on retrouve également des macrophages primitifs. Cependant, la

formation de cellules de la lignée lymphoïde se fait seulement au stage plus avancé du développement (revu par Speck *et al.*, 2002).

1.2. La globine

La composante des érythrocytes qui permet le transport de l'oxygène est l'hémoglobine. L'hémoglobine est composée de deux chaînes α -globine et deux chaînes β -globine, chacune étant associée à un groupement hème (revu par Marieb, 1999). La production des chaînes α et β se fait parallèlement et en quantité égale. La balance entre les deux types de chaînes est très importante. Par exemple, si la production de la chaîne β diminue, les chaînes α se retrouvent en excès. L'excès provoque la précipitation des chaînes α au niveau des précurseurs érythroïdes ainsi que la destruction de ces cellules. Cette déficience de l'érythropoïèse est appelée la β -thalassémie (revu par Ho et Thein, 2000). Des traitements permettant l'augmentation de l'expression du gène γ (codant pour la forme fœtal de la chaîne β) sont envisagés. Par exemple, le butyrate permet d'élever le niveau d'expression du gène γ (Perrine *et al.*, 1993). Le butyrate agit en inhibant les histones déacétylases. Cette inhibition permet d'induire un changement au niveau de l'acétylation des histones du promoteur γ qui augmente son activité transcriptionnelle (McCaffrey *et al.*, 1997). Le traitement au butyrate ou par d'autres agents inhibant les histones déacétylases tel que l'apicidine (Witt *et al.*, 2003) permet de rétablir la balance entre les chaînes β et les chaînes α en agissant sur l'acétylation des histones.

Chez l'humain, le locus des gènes de la globine α est situé sur le bras court du chromosome 16 (5'- ζ - α 2- α 1-3'), tandis que le locus de la globine β est situé sur le bras court du chromosome 11 (5'- ϵ - γ^G - γ^A - δ - β -3'). L'ordre des gènes de globine des deux locus suit leur ordre d'expression au cours du développement (revu par Ho et Thein, 2000). Par conséquent, pour la globine β , le gène ϵ est exprimé dans le sac vitellin, les gènes γ^G et γ^A sont exprimés dans le foie fœtal et les gènes δ et β sont exprimés dans la moelle osseuse. La production de la chaîne β de l'hémoglobine humaine est donc caractérisée par deux transitions au cours du développement : une transition du stade

embryonnaire au stade fœtal et une transition du stade foetal au stade adulte. Les cellules érythroïdes primitives expriment donc la forme ϵ de la globine β , tandis que les cellules érythroïdes définitives expriment les autres formes (γ^G , γ^A , δ et β) de la globine β . La globine α ne faisant pas l'objet du présent travail, nous nous concentrerons sur les connaissances entourant la globine β .

La séquence d'ADN du gène β de la globine β fait 1600pb. Elle se divise en trois exons et deux introns appelés IVS (*intervening sequences*), et elle encode pour un peptide de 146 acides aminés. Le promoteur du gène β possède une boîte TATA à la position -28 à -31, une boîte CCAAT à la position -72 à -76, deux motifs CACCC aux positions -86 à -90 (proximal) et -101 à -105 (distal) et deux motifs GATA aux positions (-100 et -200) (Ho et Thein, 2000). Le promoteur γ possède des éléments semblables au promoteur β . Cependant, la boîte CCAAT est dupliquée et il y a une seule boîte CACCC (Cao et Moi, 2002). Ces différences pourraient être impliquées dans la régulation de ces gènes durant le développement.

1.2.1 Le LCR de la globine β

En amont du regroupement des gènes de la globine β , on trouve la région de contrôle du locus, nommée le LCR (*locus control region*). Les rôles du LCR sont i) d'établir un domaine de chromatine actif pour le regroupement des gènes de la globine β et ii) d'agir en élément amplificateur (permettant une transcription accrue) (revu par Li et *al.*, 2002). C'est la capacité du LCR à attribuer une expression des gènes de manière indépendante de la position dans le génome et dépendante du nombre de copie qui le distingue des éléments amplificateurs. L'effet du LCR de la globine β est restreint aux cellules de la lignée érythroïde. Le LCR de la globine β se compose de 5 sites hypersensibles (HS 1 à 5) à la digestion par de faibles doses de déoxyribonucléase I (DNase I). Les régions primaires (*core regions*) des sites HS ont une longueur de 250 à 500 pb. Ces sites hypersensibles sont situés entre 5kb et 25 kb en amont du gène ϵ . Les sites HS1 à HS4 sont érythroïdes spécifiques. Récemment, Wai et *al.* (2003) ont apporté des évidences qui suggèrent que le site HS5 est un site HS érythroïde spécifique, contrairement aux

études précédentes qui suggéraient que ce site HS était hématopoïétique (revu par Li et *al.*, 2002). Les sites HS sont composés de plusieurs copies des séquences consensus pour des facteurs de transcription ubiquitaires et hématopoïétiques spécifiques (CACCC, (T/A)GATA(A/G) et TGA(C/G)TCA). Ces motifs représentent les sites de liaison des facteurs de transcription érythroïdes spécifiques GATA-1, NF-E2 et EKLF respectivement. *In vitro*, le motif CACCC peut également être reconnu par des facteurs de transcription ubiquitaires comme Sp1 (revu par Cao et Moi, 2002).

L'activité d'amplificateur de la transcription se retrouve dans les sites HS2, 3 et 4. La délétion du site HS2, 3, ou 4 affecte la transcription des gènes et diminue la formation des autres sites HS (Bungert et *al.*, 1995, 1999). Milot et *al.* (1996) ont montré que les sites HS1, 2, 3 sont importants pour l'expression des gènes de la globine β de façon indépendante au site d'intégration dans le génome de la souris. Le site HS5 ne possède pas l'activité d'amplificateur (Li et *al.*, 2002), mais il semble fonctionner comme une barrière qui protège de l'activité des régions environnantes (*insulator*) (Li et Stamayannopoulos, 1994; Li et *al.*, 2002). Cette activité pourrait être spécifique au stade du développement des cellules érythroïdes (Wai et *al.*, 2003).

Malgré un nombre important d'études portant sur le LCR, son mécanisme d'action sur la transcription n'est pas complètement élucidé. Une première étape pourrait être la formation d'un holo-complexe par l'interaction des différents sites HS (Wijgerde et *al.*, 1995). Récemment, Jackson et *al.* (2003) ont employé des épisomes nucléaires pour étudier la fonction du LCR en éliminant l'effet de position, mais en demeurant dans une structure de chromatine. Les résultats qu'ils ont obtenus suggèrent que les sites HS interagissent ensemble par diverses combinaisons afin d'activer les différents gènes du locus. De plus, plusieurs facteurs de transcription liant les sites HS du LCR ont aussi la capacité d'interagir entre eux, ce qui pourrait permettre la formation de l'holo-complexe et augmenter sa stabilité (revu par Levings et Bungert, 2002). La formation d'une boucle entre les sites HS du LCR et le site HS1 en 3'du locus permettrait de former un compartiment nucléaire où se concentrent les facteurs et les complexes de transcription. Ce compartiment permettrait d'avoir une grande efficacité de transcription dans les

cellules érythroïdes (Palstra et *al.*, 2003). Le LCR pourrait aussi établir une chromatine permissive à la transcription. En effet, le locus de la globine β humaine est actif même lorsqu'il se trouve dans les régions d'hétérochromatine centromériques (Milot et *al.*, 1996). De plus, les facteurs de transcription qui sont recrutés aux sites HS peuvent lier des coactivateurs et des complexes de remodelage de la chromatine ce qui pourrait permettre de rendre la chromatine du locus permissive à la transcription (revu par Levings et Bungert, 2002).

Le LCR est spécifiques aux promoteurs des gènes de la globine β . On croit que l'expression de type tissu- et développement-spécifique des gènes de la globine β est due à l'interaction entre le promoteur des gènes et le LCR par la formation d'une boucle (mieux connu sous le terme anglais «looping»). Le LCR semble également nécessaire pour recruter des composantes additionnelles aux promoteurs. Suite à la liaison de facteurs de transcription ubiquitaires et tissus spécifiques avec l'holo-complexe, cette structure riche en facteurs de transcription formerait une boucle qui l'amènerait relativement près des promoteurs. Ce processus pourrait permettre aux facteurs de transcription liant le LCR de se lier au promoteur pour former le complexe d'initiation de la transcription, et ainsi promouvoir l'initiation de la transcription (revu par Li et *al.*, 2002). Un modèle proposé par le groupe de Wijgerde (1995) suggère que le LCR puisse interagir avec le promoteur d'un seul gène à la fois, mais il serait capable d'aller et revenir d'un gène à l'autre. C'est donc le temps passé à chaque gène qui déterminerait lequel des gènes est prédominant. La présence et l'abondance de certains facteurs de transcription au cours du développement pourraient favoriser la liaison entre le LCR et l'un des gènes plutôt qu'un autre, et ainsi promouvoir sa transcription à un stade précis du développement (revu par Cao et Moi, 2002). Bien que nous n'en faisons pas une description dans ce texte, d'autres modèles d'action du LCR ont également été proposés, par exemple le «tracking model» et le «linking model» (revu par Li et *al.*, 2002).

1.3. La régulation épigénétique et la globine β

La régulation épigénétique peut se définir par une régulation de l'expression des gènes qui est induite par des mécanismes nucléaires autres que la séquence primaire de l'ADN. Trois processus connus interviennent dans la régulation épigénétique : la méthylation de l'ADN, la structure de la chromatine et les interférences à ARN (revu par Stokes, 2003). Dans ce travail nous nous attarderons sur le rôle de la structure de la chromatine dans la régulation épigénétique.

1.3.1 Chromatine

La chromatine est composée d'ADN et de protéines. Les nucléosomes, les unités structurales de la chromatine, sont constitués d'ADN (environ 146pb) faisant deux tours autour d'un octamère d'histones (H2A, H2B, H3 et H4). Le niveau de compaction de la chromatine peut être augmenté par l'histone H1 qui fait un lien entre les nucléosomes. Pendant longtemps, on a cru que la seule fonction de la chromatine était de compacter l'ADN pour qu'il puisse être contenu par le noyau. On sait maintenant que l'état de la chromatine joue un rôle majeur dans la régulation des gènes. On retrouve la chromatine sous différentes formes qui peuvent être rassemblées sous les termes d'hétérochromatine et d'euchromatine. Dans l'hétérochromatine, on retrouve l'ADN sous une forme compacte qui la rend insensible à la digestion par la DNase I et inaccessible aux facteurs de transcription. Conséquemment, l'hétérochromatine se réplique tardivement dans la phase S. On qualifie souvent l'hétérochromatine comme une région transcriptionnellement inactive ou fermée du point de vue de son accessibilité. De son côté, l'euchromatine est moins compacte, elle est donc plus accessible pour les facteurs de transcription et elle est sensible à la digestion par la DNase I. De plus, elle se réplique généralement tôt durant la phase S. On qualifiera donc cette région comme transcriptionnellement active ou ouverte pour l'accessibilité à l'ADN. La chromatine du locus de la globine β est caractéristique des gènes dont l'expression est spécifique à certains tissus, dans les cellules érythroïdes l'ADN du locus est accessible pour les protéines, tandis que dans les autres types cellulaires elle est inaccessible.

Il existe des facteurs modifiant la chromatine et des facteurs remodelant la chromatine. Parmi les facteurs qui modifient la chromatine, on retrouve des enzymes capables d'acétyler, de méthyler ou de phosphoryler les histones, en particulier sur leur extrémité N-terminale. De leur côté, les complexes de remodelage utilisent l'énergie de l'ATP afin de réorganiser la chromatine.

1.3.1.1 Modification des histones

Les histones sont composées d'un domaine globulaire et d'une extrémité N-terminale qui en ressort du domaine globulaire. L'extrémité N-terminale de l'histone est une région cible pour les modifications post-traductionnelles. Les études sur les modifications post-traductionnelles des histones ont mené à l'élaboration d'une hypothèse sur le code des histones (*histone code hypothesis*) par *Strahl et Allis* (2000). L'hypothèse prédit que les modifications des histones déjà existantes affectent les modifications subséquentes, et que ces modifications servent de marques pour le recrutement de protéines ou de complexes afin de réguler diverses fonctions de la chromatine.

1.3.1.1.1 L'acétylation

L'acétylation des histones se fait par des enzymes nommées acétylases d'histone (HAT, *histone acetyl transferase*). Selon l'état d'acétylation des résidus en N-terminal, des contacts histone-histone et histone-protéine sont permis ou non, augmentant ou diminuant l'accessibilité à l'ADN ou encore régulant le recrutement d'activateurs ou de répresseurs. Par exemple, les protéines possédant un bromodomaine sont capable de reconnaître les lysines acétylées et de s'y lier (*Dhalluin et al.*, 1999). De plus, il a été montré que les histones ne sont pas le substrat exclusif des HAT, ces dernières peuvent également acétyler des facteurs de transcription et ainsi augmenter leur affinité pour l'ADN (*Gu et al.*, 1997 ; *Martinez-Balbas et al.*, 2000; *Zhang et al.*, 2001). Étant donné que les formes acétylées des histones se retrouvent de façon générale dans la chromatine active et que les facteurs de transcription acétylés sont impliqués dans l'ouverture de la chromatine et l'activation de la transcription, les HAT sont considérées

comme des co-activateurs de la transcription. Une augmentation globale de l'acétylation des histones n'induit pas automatiquement une augmentation de la transcription globale (Struhl, 1998). L'acétylation des histones d'un promoteur peut refléter sa potentialité à être transcrit, et le niveau de cette acétylation ne corrèle pas nécessairement avec le degré transcriptionnel.

Les HDAC (*histone deacetylase*) catalysent la réaction inverse des HATs, elles clivent le groupement acétyle lié aux histones et elles sont considérées comme des co-répresseurs de la transcription. Une des formes de la leucémie myéloïde aigue (AML) met en évidence l'importance des HDAC dans la régulation des gènes. En effet, le réarrangement chromosomal amenant la fusion de PML-RAR conduit à un recrutement aberrant de HDAC à certains promoteurs, provoquant une répression de gènes et causant l'AML (revu par Minucci et *al.*, 2001). De plus, des études montrent que les enzymes responsables de la méthylation des îlots CpG de l'ADN recruteraient aussi des HDAC. Ces études suggèrent que la méthylation de l'ADN soit aidée par la déacétylation des histones pour amener l'état de répression transcriptionnelle (Fuks et *al.*, 2001). La relation entre les facteurs de transcription et les HDAC est plus complexe que la simple corrélation entre la déacétylation des histones et l'induction d'une répression. Les interactions de plusieurs facteurs aux rôles divers ont aussi leur importance dans la répression. De plus, plusieurs facteurs de transcription qui fonctionnent avec des HDAC pour la répression, peuvent également agir comme activateur dans un autre contexte.

Les études de Schubeler et *al.* (2000) sur le locus humain de la globine β dans les cellules MEL (*mouse erythroleukemia*) ont montré une corrélation entre l'acétylation des histones H3 et H4 et le patron de sensibilité à la DNase I, et ce même en absence de transcription. De plus, il y avait une corrélation entre le niveau de transcription et le degré d'acétylation local des histones H3. Malgré le peu d'homologie entre les locus de ces deux espèces, le locus du poulet semble se comporter d'une manière similaire au locus humain; les histones H3 et H4 du locus sont hyperacétylées suivant le patron de sensibilité à la DNase I (Litt et *al.*, 2001b). De plus, l'utilisation de lignées cellulaires semble montrer que le patron d'acétylation change durant la différenciation érythroïde.

Forsberg et al. (2000), ont étudié le patron d'acétylation du locus de la globine β murin dans des foies fœtaux au jour 14 après le coït et dans les cellules MEL. Les résultats obtenus montrent une acétylation du LCR et des promoteurs des gènes adultes (β -majeur et β -mineur), tandis que les promoteurs des gènes embryonnaires ($\epsilon\gamma$ et $\beta H1$) présentent une acétylation plus faible comparativement aux autres sites du locus. De plus, la réduction est plus marquante pour les histones H3 que pour les histones H4. Ils ont ensuite examiné le patron d'acétylation dans les cellules érythroïdes primitives (sac vitellin au jour 11.5 après le coït). Leurs résultats indiquent que le promoteur $\beta H1$, actif à ce stade du développement, et le promoteur β -mineur, inactif à ce stade du développement, sont tous deux hyperacétylés. Suite à ces résultats, les auteurs proposent que le patron d'acétylation du locus murin de la globine β varie dans le développement, ce qui supporte un rôle fonctionnel pour ces modifications dans la régulation des gènes du locus. Une étude plus récente impliquant également le locus murin a montré que l'acétylation des histones H3 du promoteur du gène β -majeur dépend des facteurs de transcription NF-E2 et GATA-1 (Kiekhaefer et al., 2002), d'ailleurs ces deux facteurs peuvent interagir avec l'acétylase CBP (*CREB binding protein*) (Cheng et al., 1997; Blobel et al., 1998). En fait, les acétylases p300/CBP semblent jouer un rôle important dans l'érythropoïèse par l'interaction et l'acétylation de multiples facteurs de transcription en les rendant plus actifs, mais probablement aussi via l'acétylation des histones (revu par Blobel, 2002).

1.3.1.1.2 La méthylation

En plus d'être acétylée, l'extrémité N-terminale des histones peut être méthylée. L'extrémité N-terminale des histones peut être méthylée sur les résidus lysines et sur les résidus arginines. Dans ce texte, je me limiterai à l'effet de la méthylation des résidus lysines de l'histone H3. Contrairement à l'acétylation qui est liée à des domaines actifs, la méthylation a différents effets selon les résidus qui sont touchés et les niveaux de modification qui leur sont apportés. Par exemple, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) est reliée à la répression des gènes, en effet, le chromodomaine de la protéine d'hétérochromatine HP1 lie spécifiquement H3K9 lorsqu'elle est méthylée (Bannister et al., 2001). De plus, l'association de HDAC1 avec une histone méthylase

impliquée dans la répression de la transcription (Czermin et *al.*, 2001) est un exemple du lien entre la déacétylation et la méthylation des histones avec la répression des gènes. D'autre part, la di- et la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) sont retrouvés dans la chromatine active (Strahl et *al.*, 1999). Bernstein et *al.* (2002) ont montré que chez *Saccharomyces cerevisiae* la di-méthylation marque la région codante des gènes, contrairement à l'acétylation qui est retrouvée plus fortement au niveau du promoteur des gènes que dans leur région codante. Puisque c'est dans la région codante que l'on retrouve la di-méthylation, elle pourrait donc être impliquée dans le processus d'élongation. De plus, le nombre de groupement méthyle sur H3K4 pourrait être indicatif de l'activité du gène. L'ajout de trois groupements méthyle sur H3K4 serait retrouvé dans les gènes transcriptionnellement actifs, tandis que la di-méthylation serait retrouvée au niveau des gènes actifs et inactifs de l'euchromatine (Santos Rosa et *al.*, 2002). Aucune histone déméthylase n'a encore été décrite, cette marque pourrait donc être une marque épigénétique à long terme (Jaskelioff et Peterson, 2003).

Litt et *al.*, (2001a) ont démontré que les histones H3 du locus de la globine β sont méthylées sur la lysine 4 suivant le patron d'acétylation et de sensibilité à la DNase I chez le poulet. Chez la souris, Kiekhäfer et *al.* (2002) ont montré que les promoteurs β -majeur et β -mineur du locus murin de la globine β sont méthylés sur H3K4. De plus, ils démontrent que cette méthylation dépend du facteur de transcription NF-E2 (voir section 1.3.2.2) pour le promoteur β -majeur, mais qu'elle en est indépendante au promoteur β -mineur. Cette étude suggère que des facteurs de transcription peuvent être impliqués dans la méthylation de H3K4.

1.3.1.2 Complexes de remodelage

Le remodelage de la chromatine peut être considéré comme une altération de la structure ou de la conformation des nucléosomes et pourrait inclure un changement de la distribution des nucléosomes sur l'ADN. Les complexes de remodelage sont des complexes hétérogènes constitués de plusieurs protéines et ils sont tous composés d'une sous-unité possédant une activité ATPase. On peut diviser ces sous-unités en deux groupes principaux: le groupe SWI/SNF et le groupe ISWI. Chez l'humain, les

membres du groupe SWI/SNF sont hBRM et hBRG1. En plus du domaine conférant l'activité ATPase, hBRM et hBRG1 contiennent également un bromodomaine en C-terminale et deux autres régions conservées dont les fonctions sont inconnues. Les membres du groupe ISWI les plus connus ont été isolés chez la drosophile et sont connus sous les noms de: ACF (*ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor*), NURF (*nucleosome-remodeling factor*) et CHRAC (*chromatin accessibility complex*). Les informations concernant le fonctionnement de ces complexes de remodelage de la chromatine sont encore incomplètes. Certaines différences dans les caractéristiques biochimiques et biologiques des deux groupes nous laissent croire qu'ils fonctionnent de façon différente. D'ailleurs, Fan et *al.* (2003) ont proposé que les deux groupes rendent l'ADN accessible par des stratégies très différentes. Ils suggèrent que les complexes de remodelage du groupe ISWI rendent l'ADN accessible en faisant glisser les nucléosomes sur l'ADN, tandis que ceux du groupe SWI/SNF produiraient une boucle d'ADN sans faire intervenir le déplacement du nucléosome.

Trois principales hypothèses ont été proposées pour expliquer le mode de recrutement par lequel les complexes de type SWI/SNF sont ciblés aux promoteurs des gènes. Dans la première, le complexe est recruté au promoteur via son interaction avec l'ARN polymérase II (Cho et *al.*, 1998). Dans la deuxième, le recrutement se fait via l'interaction avec des facteurs de transcription (Östlund et *al.*, 1997, Armstrong et *al.*, 1998). Finalement la troisième hypothèse propose qu'en absence de facteurs de transcription, l'acétylation des nucléosomes du promoteur d'un gène permet le recrutement de SWI/SNF via son bromodomaine (Hassan et *al.*, 2002). De plus, il a été suggéré que les complexes de remodelage de la chromatine peuvent interagir avec des HAT agissant ainsi ensemble dans l'activation du promoteur (Roberts et Winston, 1997).

1.3.2 Facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines capables de lier des séquences régulatrices sur l'ADN. Ils contiennent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de transactivation. Selon leurs domaines caractéristiques, on peut classer la majorité des facteurs de transcription dans l'une des quatre familles suivantes : hélice-tour-hélice,

hélice-boucle-hélice, doigt de zinc et leucine zipper. Les facteurs de transcription reconnaissent des séquences spécifiques d'ADN qu'on appelle séquences consensus.

Les séquences consensus CACCC, (T/A)GATA(A/G) et TGA(C/G)TCA sont retrouvées dans les promoteurs de gènes érythroïdes. Les facteurs de transcription GATA-1, NF-E2 et EKLF sont impliqués dans la reconnaissance de ces séquences et dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes érythroïdes.

1.3.2.1 GATA-1

GATA-1 est composé de deux domaines homologues de liaison à l'ADN de type doigt de zinc et il lie la séquence consensus (T/A)GATA(A/G). Cette séquence est retrouvée dans une grande quantité d'éléments régulateurs (amplificateurs et promoteurs) de gènes érythroïdes et mégacaryocytaires (revu par Cantor et Orkin, 2002). GATA-1 est exprimé dans quelques lignées de cellules hématopoïétiques : cellules érythroïdes, mégacaryocytes, éosinophiles, mastocytes et progéniteurs hématopoïétiques (revu par Orkin, 1995). GATA-1 joue un rôle central dans l'érythropoïèse. En son absence, le développement des cellules érythroïdes primitives est arrêté au niveau des précurseurs (Fujiwara et *al.*, 1996). De plus, des cellules souches embryonnaires déficientes pour GATA-1 sont incapables de contribuer à la formation de cellules érythroïdes définitives matures dans des souris chimériques (Pevny et *al.*, 1995). En effet, les cellules entrent dans la lignée érythroïde, mais sont arrêtées au stade de proérythroblastes. GATA-1 joue un rôle d'activateur pour plusieurs gènes dans les cellules érythroïdes. Il peut lier les sites HS du LCR et les promoteurs des gènes de la globine β . GATA-1 peut interagir avec d'autres facteurs de transcription comme Sp1, EKLF et GATA-1 lui-même. L'interaction entre ces différents facteurs suggère une coopération dans la régulation de la transcription des gènes de la globine β (revu par Cantor et Orkin, 2002). Le partenaire de GATA-1, FOG-1 (*Friend of GATA-1*), interagit avec GATA-1 via leurs motifs en doigt de zinc. FOG-1 ne lie pas directement l'ADN, mais son interaction avec GATA-1 permet d'activer la transcription dans les cellules hématopoïétiques, ainsi FOG-1 est un régulateur de l'activité de GATA-1 (revu par Cantor et Orkin, 2002). GATA-1 peut également interagir avec l'acétylase d'histone

CBP (Blobel et *al.*, 1998). De plus, GATA-1 est acétylée par CBP et cette forme acétylée de GATA-1 semble plus performante à activer la transcription (Hung et *al.*, 1999).

1.3.2.2 NF-E2

Le complexe protéique NF-E2 est un hétérodimère entre la sous-unité p45 qui est retrouvée uniquement dans le compartiment hématopoïétique et la sous-unité p18 qui est exprimée de façon ubiquitaire. NF-E2 est composé d'un domaine de liaison à l'ADN basique et d'un domaine d'activation de type leucine zipper, ces résidus hydrophobes permettent la dimérisation des monomères. La sous-unité p45 possède le domaine de trans-activation. L'ARNm de p45 a été détecté spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques suivantes : cellules hématopoïétiques multipotentes, cellules érythroïdes, mégacaryocytes et mastocytes (revu par Ho et Thein, 2000). La séquence consensus de liaison à l'ADN de NF-E2 est retrouvée dans les sites HS 2, 3, et 4 du LCR. Il a été démontré que NF-E2 est essentiel pour que le LCR exerce une forte activité d'amplificateur sur la transcription (Ney et *al.*, 1990). L'importance de NF-E2 pour l'expression de la globine β a été mise en évidence dans des lignées cellulaires déficientes pour la sous-unité p45. En effet, ces cellules expriment peu ou pas la globine, mais cette expression peut être rétablie par l'expression de p45 dans ces lignées (Lu et *al.*, 1994; Kotkow et Orkin, 1995). Cependant, en absence de NF-E2 chez la souris, l'érythropoïèse se fait presque normalement (petite diminution d'hémoglobine par cellule) et les embryons survivent jusqu'à la naissance. Quelques jours plus tard, les souris meurent de thrombopénie due à l'absence de plaquettes dans la circulation sanguine (Shivdasani et Orkin, 1995). D'une part, l'absence d'effet sur l'expression de la globine dans les souris déficiente pour p45 est encore mal comprise. La redondance au niveau de la sous-unité p45 est une des raisons qui pourraient expliquer l'observation. D'autre part, l'importance de NF-E2 dans la formation des plaquettes commence à être mieux comprise. NF-E2 semble réguler l'expression d'une protéine impliquée dans la différenciation finale des mégacaryocytes (Tiwari et *al.*, 2003). Tout comme GATA-1, NF-E2 interagit avec CBP, il peut aussi être acétylé par CBP ce qui semble stimuler sa liaison à l'ADN (Hung et *al.*, 2001).

1.3.2.3 EKLF

EKLF (*Erythroid Krüppel Like Factor*) a été isolé par hybridation soustractive ayant pour but d'identifier des gènes exprimés spécifiquement dans les cellules érythroïdes (Miller et Bieker, 1993). Ils ont démontré par Northern blot que EKLF est exprimé dans la moelle osseuse, la rate, des lignées de cellules érythroïdes et, à plus faible niveau, dans des lignées de mastocytes. Ils ont déterminé que EKLF est un facteur de transcription possédant trois motifs en doigt de zinc et qu'il lie la séquence consensus CACCC du promoteur du gène β et possiblement celle du promoteur d'autres gènes érythroïdes spécifiques. Chez les embryons de souris, l'absence d'EKLF provoque une anémie sévère qui entraîne la mort de l'embryon vers le jour 15 de la gestation (Nuez, 1995; Perkins, 1995). Perkins et *al.* (1995), démontrent que le foie des embryons *knock-out* contient un nombre normal de progéniteurs érythroïdes (BFU-E et CFU-E), mais que ces progéniteurs sont déficients dans leur maturation et dans l'expression du gène β adulte. Dans la même étude, les auteurs rapportent, par essai de protection à l'ARNase, un niveau de transcrits pour EKLF aussi élevé dans les cellules érythroïdes du sac vitellin que dans ceux du foie fœtal. Southwood et *al.* (1996), ont confirmé par hybridation *in situ* la présence d'EKLF dans les embryons de souris dès le jour 7.5 de la gestation et ont montré que la protéine est produite. EKLF est donc exprimé dans les cellules érythroïdes primitives et définitives. Ils ont aussi démontré que EKLF n'est pas exprimé dans les cellules souches embryonnaires, mais que son expression apparaît durant la formation du corps embryonnaire (EB) avant l'expression de la globine. De plus, des progéniteurs isolés à partir du sang de cordon ombilical n'expriment pas EKLF, mais son expression apparaît suite à une différenciation avant l'apparition de l'expression de la globine β (Ziegler et *al.*, 1999). En contrepartie, Qian et *al.* (2002) ont observé que des progéniteurs isolés de la moelle osseuse d'individus sains expriment EKLF à des niveaux plus élevés comparativement à un groupe d'individus ayant la leucémie myéloïde aiguë. Tout de même, ces études suggèrent que EKLF est exprimé relativement tôt dans les précurseurs érythroïdes. Étant donné que les expériences de délétion d'EKLF chez la souris ont montré que ce facteur est essentiel à l'expression du gène β adulte, on peut se demander pourquoi il est exprimé si tôt dans le développement. Premièrement, il est possible que d'autres protéines importantes pour l'activité de EKLF

ne soient pas encore produites à ce stade du développement. Deuxièmement, EKLF pourrait subir des modifications post-traductionnelles pour agir en activateur. Troisièmement, EKLF pourrait agir comme un répresseur à des stades précoces de l'embryogénèse. Quatrièmement, il pourrait être impliqué dans l'activation d'autres gènes érythroïdes spécifiques dès le jour 7.5 et dès le début de la différenciation érythropoïétique même si son absence n'y résulte pas en un phénotype détectable. Finalement, il pourrait être impliqué dans l'activité du LCR comme le propose l'étude de Tewari et *al.* (1998) où ils ont montré, par utilisation de souris transgéniques pour une construction 5'HS3-*lacZ*, que EKLF est actif dans les cellules érythroïdes primitives et qu'il est requis pour l'activité du site HS3.

1.4 EKLF dans la régulation épigénétique

Il est probable que EKLF joue un rôle au niveau de la régulation épigénétique. D'une part EKLF peut interagir avec des enzymes qui modifient la chromatine telles que p300/CBP et P/CAF des histones acétyltransférases (HAT). PCAF ne peut pas acétyler EKLF, de plus son interaction inhibe l'activité de trans-activation de EKLF. Contrairement à P/CAF, p300/CBP peut acétyler deux résidus lysines du signal de localisation nucléaire de EKLF et ainsi stimuler la transcription par ce dernier (Zhang et *al.*, 1998). p300/CBP agissent en co-activateurs en acétylant les histones, relâchant ainsi la chromatine, ou encore en permettant de faire le pont entre des activateurs et la machinerie de transcription (revu par Blobel, 2000). D'autre part, Armstrong et *al.* (1998) ont montré *in vitro* que pour être actif EKLF et SWI/SNF (E-RC1, *EKLF coactivator-remodeling complex 1*) doivent agir ensemble. Puis, Lee et *al.* (1999) ont montré que le recrutement de E-RC1 au promoteur du gène β requiert la présence des boîtes CACCC et TATA. Il a également été démontré que SWI/SNF augmente la liaison de EKLF au promoteur, ce qui entraîne le remodelage de la chromatine environnante (Kadam et *al.*, 2000). En 2001, Zhang et *al.* ont démontré que l'acétylation de EKLF par CBP se fait sur les résidus lysines Lys-288 (domaine de transactivation) et Lys-302 (domaine en doigt de zinc). La mutation du résidu Lys-288 abolit l'activité de trans-activation de EKLF au promoteur β . De plus, ils montrent que l'acétylation d'EKLF augmente son affinité pour le complexe de remodelage SWI/SNF.

Finalement, Brown et *al.* (2002) ont montré que les interactions de EKLF avec CBP et E-RC1 sont requises pour ouvrir la chromatine et initier la transcription du gène β adulte dans les cellules érythroïdes définitives.

En contrepartie, Chen et Bieker (2001) ont montré que EKLF interagit via son domaine en doigt de zinc avec mSin3A et HDAC1, et possède une activité de répression transcriptionnelle dépendante de l'activité de HDAC1. Il est d'ailleurs connu que l'action du co-répresseur mSin3A est liée à son interaction avec HDAC1 (Hassig et *al.*, 1997, David et *al.*, 1998). Lorsque lié à l'ADN, EKLF ne peut pas interagir avec les co-répresseurs. De la même façon, si EKLF est lié aux co-répresseurs son domaine de liaison à l'ADN est bloqué. Chen et Bieker (2001) ont postulé l'hypothèse que d'autres protéines liant l'ADN doivent recruter le complexe EKLF répresseur aux promoteurs ciblés. Le mécanisme de régulation de l'activité de EKLF (activateur-répresseur) n'est pas connu à ce jour.

Il a été montré qu'en plus de réduire l'expression du gène β , l'absence de EKLF provoque la perte de la sensibilité du promoteur du gène β et une réduction de la sensibilité du HS3 à la DNaseI (Wijgerde et *al.*, 1996). Cette étude supporte l'hypothèse selon laquelle EKLF jouerait un rôle dans le remodelage de la structure de la chromatine et qu'il est important au niveau du LCR. Cependant, la perte du HS3 pourrait également être due au changement d'interaction du LCR avec les gènes de la globine. Comme mentionné plus haut, l'activité de EKLF dans les cellules érythroïdes primitives requiert la participation du HS3. De plus, il a été montré que EKLF lie le HS3 via la boîte CACCC, mais que Sp1 en est incapable (Gillemans et *al.*, 1998; Lee et *al.*, 1999). Des résultats suggèrent que le recrutement de EKLF aux HS2 et HS3 est augmenté par la présence du promoteur du gène β . La même étude montre que les boîtes CACCC et TATA du promoteur du gène β sont importantes pour le recrutement de EKLF au promoteur du gène β et au HS3, tandis que seulement la boîte TATA intacte est nécessaire au recrutement de EKLF au HS2. Les auteurs suggèrent que le recrutement de EKLF au HS2 est plus stable que le recrutement au HS3 (Lee et *al.*, 1999). Les auteurs proposent aussi que les promoteurs soient importants pour la formation de

l'holocomplexe du LCR et que le complexe de pré-initiation pourrait stabiliser la liaison de EKLF au promoteur et au LCR. McMarrow et *al.* (2000) ont montré que la concentration de EKLF dans les cellules érythroïdes affecte la sensibilité générale du locus à la DNase I, et que cet effet se ferait via la liaison de EKLF au LCR. Récemment, les résultats obtenus par Jackson et *al.* (2003) suggèrent que l'activité de trans-activation du HS3 serait indépendante de EKLF. Ainsi, une fois la structure du HS3 formée, son activité devient indépendante de EKLF, supportant le rôle important de EKLF dans la formation d'une chromatine active. Ces différents résultats montrent à la fois que l'activité de EKLF passe par le LCR et que EKLF a un effet sur la structure de la chromatine du locus de la globine β humaine.

La transcription est donc un processus qui fait intervenir la communication entre plusieurs partenaires: des facteurs de transcription, des complexes de remodelage de la chromatine, des co-activateurs et la machinerie transcriptionnelle.

1.4 Résumé

La transcription des gènes implique une série d'interactions entre des facteurs de transcription, des co-activateurs, des complexes de remodelage et la machinerie de transcription. L'état de la chromatine du locus de la globine β et la régulation transcriptionnelle de type tissu et développement spécifique de ces gènes, font de ce locus un excellent modèle pour l'étude des interactions entre les différents complexes protéiques nécessaires à la régulation transcriptionnelle des gènes. Les interactions de EKLF avec des co-activateurs comme p300/CBP et le complexe de remodelage de la chromatine, ainsi qu'avec le co-répresseur HDAC pourraient placer ce facteur de transcription au centre de l'intégration de signaux dans l'érythropoïèse.

1.5 Prémisse

C'est à partir de progéniteurs érythroïdes de la rate de souris infectées par le virus *Friend*, que les lignées de cellules MEL ont été dérivées. Les cellules MEL sont donc des cellules transformées et elles sont arrêtées au stade de proérythroblastes (Singer et

al., 1974). Le traitement chimique au diméthyl sulfoxyde induit la différenciation érythroïde des MEL (Friend et *al.*, 1971). Ces cellules transformées ont été utilisées comme modèle dans plusieurs études sur la régulation des gènes érythroïdes spécifiques. Ces cellules expriment la forme adulte de la globine β . Elles ne permettent pas d'étudier le changement d'expression entre les gènes embryonnaires et fœtaux/adultes du locus murin de la globine β , donc les cellules MEL ne peuvent pas être utilisées pour étudier les gènes de la globine β durant le développement. De plus, comme elles sont arrêtées au stade de proérythroblaste, elles ne permettent pas d'étudier les événements précédents ce stade de différenciation. Étant donné que ce sont des cellules transformées, un dérèglement s'est produit dans ces cellules, alors il est important de comparer les résultats obtenus avec les MEL avec d'autres modèles.

Dans une étude récente (Bottardi et *al.*, 2003, voir l'annexe I), nous avons analysé la régulation épigénétique du locus de la globine β humaine dans la moelle osseuse de souris transgéniques ayant intégré dans leur génome le locus complet, ainsi que dans la moelle osseuse humaine. Nous avons vérifié le patron de modifications des histones du locus humain de la globine β au cours de l'hématopoïèse. Nous avons comparé l'acétylation du locus dans les progéniteurs hématopoïétiques (HPC) avec celle des cellules érythroïdes où le gène β est fortement exprimé. Nous avons montré que le LCR et la partie codante du gène β sont acétylés dans les HPC et dans les cellules érythroïdes, tandis que les histones H3 du promoteur du gène β sont acétylées dans les HPC et non dans les cellules érythroïdes. Nos résultats suggèrent que l'acétylation du locus est modifiée au cours de la différenciation. Ces variations dans les niveaux d'acétylation pourraient être impliquées dans un mécanisme de potentialisation transcriptionnelle.

1.6 Hypothèse

Étant donné que EKLF interagit avec les co-activateurs p300/CBP et le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, ainsi qu'avec le co-répresseur HDAC nous croyons que ce facteur de transcription pourrait être important pour la régulation de la structure de la chromatine du locus de la globine β . Il pourrait être impliqué dans les variations de la chromatine du locus de la globine β observées au cours de

l'hématopoïèse. Pour investiguer le rôle d'EKLF dans la régulation épigénétique, nous avons utilisé des foies fœtaux au jour 14,5 après le coït, car la délétion de ce facteur de transcription provoque une anémie sévère entraînant la mort des embryons vers le jour 15 après le coït. Dans un premier temps, nous avons isolé les populations de cellules érythroïdes et de type progéniteurs proficientes et déficientes pour EKLF. Nous avons ensuite vérifié l'expression de EKLF et du gène β dans les cellules de type progéniteur. Finalement, nous avons évalué les modifications des histones du locus dans les progéniteurs et les cellules érythroïdes.

2. Matériel et méthodes

2.1 Lignées de souris

Les souris de la lignée 2 (*ln2*) et les souris hétérozygotes EKLF ont été gracieusement données par Dr Frank Grosveld. Les souris *ln2* sont transgéniques pour le locus humain de la globine β (fragment de 70 kb) (Strouboulis et *al.*, 1992). Les souris de la lignée *ln2* ont été croisées avec les souris de la lignée EKLF hétérozygote afin d'obtenir des souris transgéniques *ln2* EKLF hétérozygotes. Les souris *ln2* EKLF hétérozygotes ont été croisées entre elles afin d'obtenir des embryons *ln2* EKLF *knock-out*. L'accouplement a été vérifié le matin par l'apparition d'un bouchon vaginal et le moment de l'observation est désigné par 0.5 jour post coït (dpc).

2.2 Cytométrie

2.2.1 Cellules érythroïdes de foie foetal

L'anticorps TER-119 reconnaît une molécule qui est associée à la glycophorine A de la membrane cellulaire des cellules de type érythroïde (du proérythroblaste au plus mature) (Kina et *al.*, 2000). Nous avons utilisé cet anticorps pour le phénotypage des cellules TER-119 des foies fœtaux 14,5 dpc. Pour le marquage des cellules du foie fœtal 14,5 dpc, les cellules ont été incubées avec l'anticorps rat anti-TER-119 de souris (hybridome) pour une durée de 25 min sur la glace, puis les cellules ont été lavées dans du PBS supplémenté avec 5% de FBS inactivé à la chaleur. Ensuite, les cellules ont été incubées avec un deuxième anticorps qui est lié à un fluorochrome, nous permettant ainsi la détection des cellules réactives à TER-119. Ce deuxième anticorps est l'anticorps de chèvre anti-rat conjugué avec *R-phycoerythrin* (Goat Anti-Rat IgG R-PE) (*Caltag laboratories*).

2.2.2 Cellules de type progéniteur de foie foetal

L'obtention des cellules de type progéniteur a été réalisée à partir des cellules de foies fœtaux 14,5 dpc. Les cellules ont été triées par tri cellulaire au FACS (*fluorescence-activated cell sorting*). Les cellules triées correspondent à la population CD31^{high} Ly6C⁻. Cette population de cellules a été caractérisée par van der Loo et *al.* en

1995; elle ne contient pas de cellules matures et elle est de type progéniteur. Les cellules de foie fœtal sont d'abord incubées avec un anticorps rat anti-Ly6C (ER-MP20) de souris conjugué avec le fluorochrome FITC (*fluorescein isothiocyanate*) (*BD Biosciences*). Cet anticorps nous permet de marquer certaines populations de monocytes/macrophage, des cellules endothéliales, des thymocytes et des cellules de la lignée lymphocytaire, et ainsi les éliminer lors du tri. Ensuite, les cellules sont incubées avec un anticorps de rat anti-CD31 (ER-MP12) de souris biotinylé (*BD Biosciences*). Cet anticorps a été détecté, en outre, sur des cellules souches hématopoïétiques dérivées de la moelle osseuse et sur des cellules souches embryonnaires. Comme cet anticorps est biotinylé, les cellules ont ensuite été incubées avec la «streptavidin tri-colour conjugated» ou Sav-TC (*Caltag laboratories*) avant d'être triées par FACS. Pour le marquage, les cellules ont été incubées avec les anticorps pour une durée de 25 min sur glace, puis les cellules ont été lavées avec du PBS supplémenté avec 5% de FBS inactivé à la chaleur.

2.3 Isolation de cellules érythroïdes primitives

Les cellules érythroïdes primitives ont été isolées à partir du sac vitellin des embryons 11.5 dpc. À ce stade, aucun phénotype n'est associé avec l'absence de EKLF. L'ADN a donc été extrait de quelques cellules d'embryon à l'aide du *DNAzol reagent* (*Gibco*) pour ensuite procéder à un PCR permettant de distinguer entre les allèles *wild-type* et *knock-out*. Ce PCR se fait en utilisant 3 amorces (les séquences des amorces (koEKLF) sont retrouvées dans le tableau I, page 29). Les conditions du PCR sont les suivantes : 3 min à 95°C; 31 cycles de 1 min à 95°C, 40 sec à 62°C et 1 min à 72°C; et une élongation finale de 4 min à 72°C. Les réactions de PCR sont déposées sur gel d'agarose. Le résultat nous indique quel est le génotype de chaque embryon. Si l'on obtient une seule bande de 765pb l'embryon est *wild-type*, si l'on obtient une bande de 400 pb l'embryon est *knock-out* et si l'on obtient deux bandes (765 pb et 400 pb) l'embryon est hétérozygote pour EKLF.

2.4 Culture en milieu semi-solide de méthylcellulose

Pour les essais clonogéniques, 500 cellules de type progéniteur CD31^{high}Ly6C⁻ de foie fœtal 14,5 dpc ou 5000 cellules de foie fœtal 14,5 dpc, ont été mises en culture dans du milieu semi-solide *MethoCultTM GF M3434 (StemCell Technology)*. Ce milieu contient les facteurs de croissance appropriés (insuline, transferrine humaine, rm SCF, rm IL-3, rh IL-6 et rh erythropoïétine) pour supporter la différenciation hématopoïétique de cellules murines. Les cultures ont été réalisées en duplicata ou en triplicata et incubées en chambre humide à 37°C, 5% CO₂. Les différents types de colonies ont été comptés et identifiés au jour 5 (CFU-E) ou 14 (CFU-GEMM, CFU-GM et BFU-E) selon les indications fournies dans le manuel des procédures de *StemCell Technology* et modifiées dans le protocole mis au point dans le laboratoire.

2.5 Analyse de l'expression dans les cellules enrichies en progéniteurs

2.5.1 Transcription inverse et PCR en une étape «One step RT-PCR»

Les cellules de foies foetaux EKLF knock-out 14,5 dpc CD31^{high}/Ly6C⁻ sont déposées dans une plaque à PCR de 96 puits à raison de 1 ou 10 cellules par puits selon les besoins. Le RT-PCR est réalisé en utilisant le kit *one-step RT-PCR* de *Quiagen*, avec l'addition de 30 pmol d'oligo(dT)₁₂₋₁₈ (*Gibco*) et des amorces spécifiques. Les amorces spécifiques utilisées amplifient soit les transcrits humains (δ et β) et de souris (β -mineur et β -majeur) de la globine β (amorces HBG), soit le transcrit murin de EKLF (amorces mEKLF). Les séquences des amorces sont présentées au tableau I (page 29). Les conditions du RT-PCR sont les suivantes : synthèse de l'ADNc à 50°C durant 30 min; activation de la polymérase à 95°C pour 15 min; 40 cycles d'amplification de 95°C pour 45 sec, 63°C (HBG) ou 60°C (mEKLF) pour 45sec et 72°C pour 1min; suivis d'une élongation finale de 5 min à 72°C. Afin de discriminer les transcrits humain et de souris amplifiés par les amorces HBG, les produits de PCR ont été précipités et digérés par l'enzyme de restriction *EcoRI (Promega)*, avant d'être analysés sur gel d'agarose. Le produit amplifié par les amorces HBG a une longueur de 343pb, après la digestion le produit humain est clivé en deux fragments de 266pb et 77pb, le produit murin reste intact (343pb). Le produit amplifié par mEKLF est un fragment de 593pb.

2.5.2 «Essai de transcription inverse standard»

L'ARN de 600 000 cellules CD31^{high} Ly6C⁻ de foies fœtaux 14,5 dpc a été extrait par *Trizol* (*Life Technologies*). L'ARN de 1 million de cellules de foies foetaux 14,5 dpc, exprimant ou non, le facteur de transcription EKLF a également été extrait par *Trizol*. L'ARN a été quantifié par photométrie à une longueur d'onde de 260 nm et la présence de contaminants protéiques a été recherchée en prenant une mesure de la densité optique à 280 nm. Ensuite, l'ADN complémentaire a été synthétisé par l'enzyme de transcriptase inverse M-MLV RT (*Gibco*) en incubant à 37°C pendant 1 h suivie d'une incubation de 15 min à 70°C pour inactiver l'enzyme. Puis, les expressions de mEKLF et GAPDH (contrôle interne) ont été analysées par une réaction de PCR en duplex en utilisant les conditions suivantes : 3 min à 95°C; 31 cycles de 1 min à 95°C, 40 sec à 60°C et 25 sec à 72°C; et une élongation finale de 4 min à 72°C. Les séquences des amorces sont présentées au tableau I (page 29).

2.6 Immunoprécipitation de la chromatine

L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) est une approche par laquelle, suite à une fixation des cellules avec du formaldéhyde, on isole des régions d'ADN associées à une protéine d'intérêt comme par exemples les différentes isoformes d'histones. Cette technique nous permet donc de détecter les séquences d'ADN qui sont liées par une protéine. Chacun des trois anticorps utilisés dans ce travail reconnaissent spécifiquement une des trois isoformes d'histones suivante : H3 acétylées (K9, K14), H4 acétylées (K5, K8, K12, K16) et les histones H3 di-méthylées (K4) (*Upstate Biotechnology*). La procédure suivie pour le ChIP est celle proposée par *Upstate Biotechnology*. Pour réaliser le ChIP, il faut d'abord obtenir la population de cellules qui nous intéresse. Ces cellules sont culotées par centrifugation, puis les protéines liées à l'ADN y sont fixées par une incubation dans du formaldéhyde 1% pendant 10 min à 37°C (*crosslink*). Cette chromatine est ensuite soniquée afin d'obtenir des fragments d'environ 800 pb. Une partie de ces fragments est gardé pour l'input (ADN avant l'immunoprécipitation) et le reste est incubé toute la nuit avec l'anticorps désiré. Les

complexes immuns sont ensuite récupérés avec des billes de sépharose recouvertes de protéines A qui fixent les fragments FC des anticorps. Les liaisons non-spécifiques sont éliminées par différents lavages successifs. Finalement, l'ADN est purifié en inversant la fixation de protéines à l'ADN suivi d'une extraction de l'ADN au phénol/chloroforme et d'une précipitation de l'ADN.

2.7 Analyse semi-quantitative par PCR radioactif en duplex

L'ADN des échantillons de CHIP a été analysé par des réactions de PCR en duplex. C'est-à-dire qu'au cours de la même réaction de PCR, deux jeux d'amorces spécifiques amplifient, en même temps, deux régions distinctes. Les réactions de PCR sont déposées sur gel d'acrylamide 6%. Suite à la migration, les gels sont séchés, puis ils sont déposés dans une cassette contenant un écran de *PhosphorImager*. Les réactions de PCR sont quantifiées par *PhosphorImager (Storm 840 d'Amersham Biosciences)* à l'aide du logiciel *Image quant 5.2*. Un des jeux d'amorces amplifie pour une région d'intérêt et l'autre jeu amplifie une région contrôle. Cette région sert de contrôle interne, elle nous permet de normaliser la réaction de PCR. De plus, chaque échantillon de CHIP est normalisé une deuxième fois par rapport à une réaction de PCR effectuée avec l'ADN de l'input (ADN récupéré avant l'immunoprécipitation). La formule servant au calcul de l'enrichissement est la suivante :

$$\text{Enrichissement} = \frac{(\text{intensité de la région d'intérêt CHIP}) / (\text{intensité de la région contrôle CHIP})}{(\text{intensité de la région d'intérêt input}) / (\text{intensité de la région contrôle input})}$$

Les régions d'intérêt étudiées dans cette étude sont : la région du site hypersensible 3 (HS3), la région du promoteur et la région codante du gène γ , la région du promoteur et la région codante du gène β . La région contrôle est celle du promoteur du gène ZFP37. Dans les cellules hématopoïétiques, le gène ZFP37 est transcriptionnellement inactif. Les séquences des amorces utilisées pour les réactions de PCR sont présentées dans le tableau 1 (page 29). Pour toutes les réactions de PCR, nous avons vérifié que l'amplification soit linéaire et non-saturée pour une concentration croissante d'ADN.

Les conditions de PCR en duplex utilisés sont les suivantes : 3 min à 94°C; 31 cycles de 45 sec à 94°C, 45 sec à 60°C et 45 sec à 72°C; et une élongation finale de 5 min à 72°C.

Tableau I: Liste des amorces utilisées

Nom donné à la paire d'amorces	Séquence en 5'	Séquence en 3'	Fragment (pb)
GAPDH	5'-CCC TGT TGC TGT AGC CGT AT-3'	5'-CCC ACT AAC ATC AAA TGG GG-3'	800
HBG	5'-GGT GGT CTA CCC TTG GAC CC-3'	5'-GAT ACT TGT GGG CCA GGG CA-3'	343
HS3	5'-AAA CAC AAG ACC CTC ACG GTG-3'	5'-CAG CAC CAC CAA CCT GAC CT-3'	167
huβ	5'-GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC-3'	5'-GGT TGC TAG TGA ACA CAG TTG-3'	162
huβ1	5'-GCT GGT GGT CTA CCC TTG GA-3'	5'-AGG TTG TCC AGG TGA GCC AG-3'	150
huy	5'-GCC TTG ACC AAT AGC CTT GAC A-3'	5'-GAA ATG ACC CAT GGC GTC TG-3'	183
huyg	5'-CCT TGG GAG ATG CCA TAA AGC-3'	5'-TCA AAC AGC TCA CAC CCT GC-3'	202
koEKLf	5'-TTC TCA GTC CTG TGG GAG GTG-3'	5'-CCC AAA CAA GGC TCA GAG GC-3' 5'-TGG CTA CCC GTG ATA TTG CTG-3'	765 et 400
mEKLf	5'-CAC CAC CCT GGG ACA GTT TC-3'	5'-GCT GGA AGT GGC CTT GGT ACT-3'	593
ZFP37	5'-TTA CTT AGA AGG AAT GGG AGC AGC T-3'	5'-ACT TGA GAA AGA AGG GAT TGC AGT-3'	149

3. Résultats

3.1 Établissement des populations de cellules

Afin d'étudier l'influence de EKLF sur la régulation épigénétique du locus humain de la globine β , il nous a fallu utiliser des foies fœtaux plutôt que la moelle osseuse, car la délétion de EKLF n'est pas viable. En effet les souris *knock-out* meurent vers 15 jours après le coït (dpc), nous avons donc utilisé les fœtus avant leur mort, soit à 14,5 dpc. Nous avons procédé à l'examen des cellules de ces foies fœtaux avant de débiter l'étude de la chromatine. Afin de ne pas alourdir le texte, lorsque nous parlerons de foies, on pourra considérer que l'on réfère aux foies fœtaux 14,5dpc.

3.1.1 Cellules de la lignée érythroïde

L'hybridome TER-119 a été caractérisé par Kina et *al.* (2000). TER-119 nous permet de marquer les cellules érythroïdes du stade proérythroblaste jusqu'aux cellules érythroïdes matures. La population de cellules TER-119 positives ne possède pas la capacité de former des colonies ayant la morphologie typique des BFU-E et CFU-E. Cependant les auteurs ont noté la formation de très petites colonies possédant de l'hémoglobine, ils en concluent que les cellules TER-119 les plus primitives ont un certain potentiel de prolifération puisqu'elles ont la capacité de former de petites colonies. De plus, ils ont déterminé que 80 à 90% des cellules d'un foie fœtal au jour 14 après le coït sont réactives à TER-119 et que ce pourcentage diminue autour de 40 à 50% dans le foie des nouveau-nés, puis de 25 à 30% dans la moelle osseuse adulte. Étant donné que les expériences qui ont servi à la caractérisation de l'hybridome TER-119 ont été réalisées dans des souris de fond génétique BALB/c et que nous utilisons des souris de fond génétique CD1, nous avons vérifié le pourcentage de cellules réactives à TER-119 dans les foies CD1. Trois marquages réalisés de façon indépendante nous ont permis de déterminer que 85 à 90% de la population des cellules d'un foie est réactive au marquage avec TER-119 (figure 2A, page 32). Comme ce pourcentage est élevé, nous avons donc considéré les cellules du foie comme des cellules de type érythroïde.

Nous avons croisé des souris EKLF hétérozygotes afin d'obtenir des embryons déficients pour EKLF. Les embryons 14,5 dpc sont atteints d'une déficience au niveau

de l'érythropoïèse telle que décrit par Nuez et *al.* (1995). Les fœtus déficients sont moins vascularisés et ont un foie plus pâle que leurs frères *wild-type* ou hétérozygotes dû à leur déficience dans la production de la chaîne β de la globine. Nous avons vérifié la présence de l'antigène TER-119 à la surface des cellules des foies d'embryons ayant un phénotype EKLf *knock-out*. La figure 2B (page 32) représente le phénotype typique obtenu pour le marquage avec l'anticorps TER-119 de cellules de foies EKLf *knock-out* (3 marquages indépendants ont été effectués). Le phénotype révèle que les foies fœtaux EKLf *knock-out* 14,5dpc n'expriment pas l'antigène TER-119 à la surface de leurs cellules.

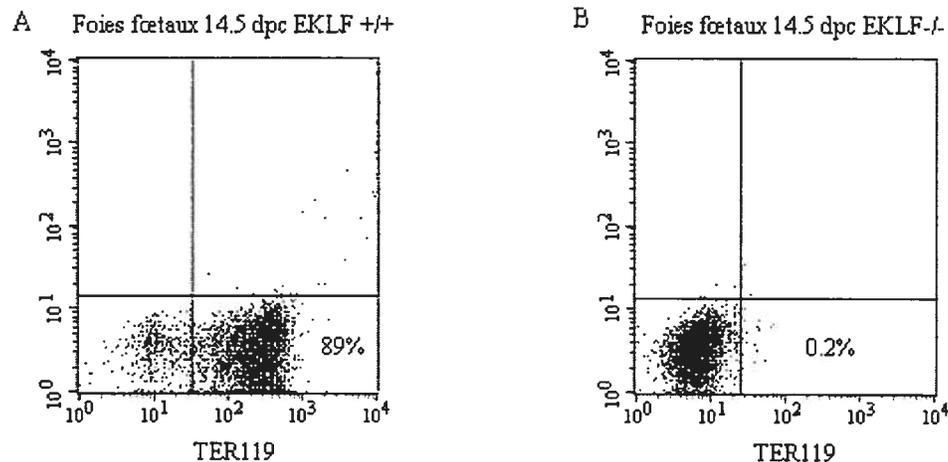


Figure 2 : Expression du marqueur de surface TER-119

Cytométrie en flux représentant le marquage avec l'anticorps TER-119. Les cellules de foies fœtaux 14,5 dpc de souris de type génétique CD1 A) exprimant normalement le facteur de transcription EKLf, B) n'exprimant pas le facteur de transcription EKLf (EKLf *knock-out*)

Afin de comparer les cellules des foies *wild-type* avec celles des foies EKLf *knock-out*, nous avons réalisé un essai clonogénique en milieu semi-solide de méthyl-cellulose (en duplicata). Les progéniteurs hématopoïétiques ont le potentiel de proliférer et de se différencier, ils peuvent donc être mis en évidence par l'essai clonogénique. Le nombre de colonies formées a été compté après 14 jours de croissance. Le tableau II (page 33) présente les résultats obtenus. Les cellules de foie CD1 ont formé 9 colonies au total, tandis que les cellules de foie EKLf *knock-out* ont donné naissance à 8 colonies. La

capacité à former des colonies pour les deux types de cellules parait semblable. Le fait que les cellules EKLf *knock-out* n'ont pas acquis la capacité de former plus de colonies que les cellules des foies *wild-type* suggère que les cellules des foies EKLf *knock-out* ont quitté le compartiment des progéniteurs dans la même proportion que les cellules d'un foie *wild-type*. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus par l'équipe de Nuez (1995) et celle de Perkins (1995) à l'effet que les foies fœtal EKLf *knock-out* ont un nombre normal de cellules formant des colonies, ce qui, selon les auteurs, indique que le compartiment des progéniteurs n'est pas touché par l'absence de EKLf. De plus, Perkins et *al.* (1995) mentionnent dans leur étude que les embryons *knock-out* ont un grand nombre de cellules nucléées de type érythroblaste, donc que les cellules analysées appartiennent bien à la lignée érythroïde. Ces observations suggèrent que ces cellules ont franchi le stade de progéniteurs, mais qu'elles ont une maturation subséquente qui est anormale, car elles sont incapables de générer des érythrocytes matures. L'absence de réactivité à l'anticorps TER-119 sera abordée dans la discussion. Pour cette étude, nous considérerons donc les cellules de foie EKLf *knock-out* comme une source de cellules érythroïdes.

Tableau II: Essai clonogénique en méthyl-cellulose à partir de cellules de foie fœtal 14,5dpc

5000 cellules	CFC
EKLf proficientes	9
EKLf <i>knock-out</i>	8

3.1.2 Isolation des cellules de type progéniteur

Nous avons ensuite procédé à l'isolement de cellules de type progéniteur à l'aide des marqueurs de sélection CD31 (ER-MP12) et Ly6C (ER-MP20). La population de cellules CD31^{high}Ly6C⁻ a été caractérisée par van der Loo et *al.* en 1995. Ils ont déterminé que cette population ne contient pas de cellules matures et que CD31^{high}Ly6C⁻ nous permet de marquer les cellules de type progéniteur. Cette population représente 1 à 2% de la moelle osseuse. Nous avons vérifié la proportion représentée par ces cellules dans un foie fœtal 14,5 dpc. Nous avons procédé au marquage et au tri des cellules de

foie en utilisant les marqueurs $CD31^{high}Ly6C^{-}$. Nous avons obtenu une sous-population représentant 3 à 5% de la population totale (exemple figure 3A, page 34). La pureté des cellules triées a été vérifiée par l'analyse post-tri d'un petit échantillon des cellules triées, elle était de 90 à 98% pour les différents tris effectués (exemple figure 3B, page 34).

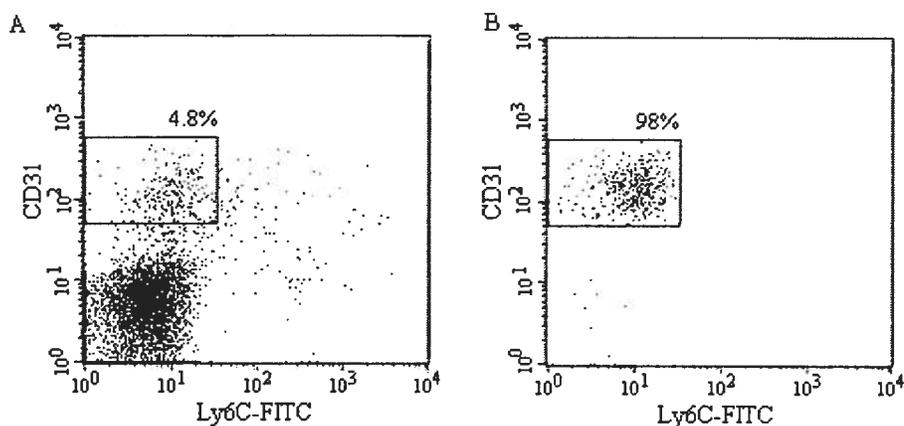


Figure 3: Exemple de tri de cellules de type progéniteur de foie fœtal 14,5dpc

Marquage et tri des cellules en utilisant les marqueurs de surface $CD31^{high}$ et $Ly6C^{-}$ A) Population des cellules avant le tri, le pourcentage représente la population $CD31^{high}$ et $Ly6C^{-}$ qui sera triée B) Pureté des cellules après le tri, le pourcentage représente la population $CD31^{high}$ et $Ly6C^{-}$ des cellules triées.

Ensuite, les cellules de foies au phénotype *knock-out* ont été marquées et triées pour obtenir des cellules $CD31^{high}Ly6C^{-}$ déficientes pour EKLF. Nous avons obtenu une sous population représentant 3 à 8% de la population totale du foie (exemple figure 4A, page 35). La pureté des cellules triées a été vérifiée par l'analyse post-tri d'un petit échantillon des cellules triées, elle était de 93 à 98% (exemple figure 4B, page 35). Le pourcentage représentant la population de cellules $CD31^{high}Ly6C^{-}$ d'un foie *knock-out* est légèrement supérieur à celui obtenu pour un foie normal. Nous avons utilisé le test de comparaison d'échantillons non paramétriques de Wilcoxon-Mann-Whitney (test *U*) (Scherrer, 1984). Dès que l'on s'écarte des conditions idéales d'application du test *t* (distribution normale et variance égale des échantillons) la puissance du test *U* devient supérieure à celle du test *t*. Comme nos échantillons n'ont pas une distribution normale

et que les variances sont inégales, il est préférable d'utiliser le test U . Selon ce test, la différence entre les pourcentages de $CD31^{\text{high}}Ly6C^-$ des deux types de cellules n'est pas significative ($\alpha \leq 0,1\%$). Étant donné le nombre faible de fœtus *knock-out* par portée (1 fœtus sur 4) combiné avec le faible pourcentage de cellules $CD31^{\text{high}}Ly6C^-$ (3 à 8%) dans le foie, nous avons été limités par l'obtention de cellules $CD31^{\text{high}}Ly6C^-$ EKL*F knock-out* au cours de cette étude.

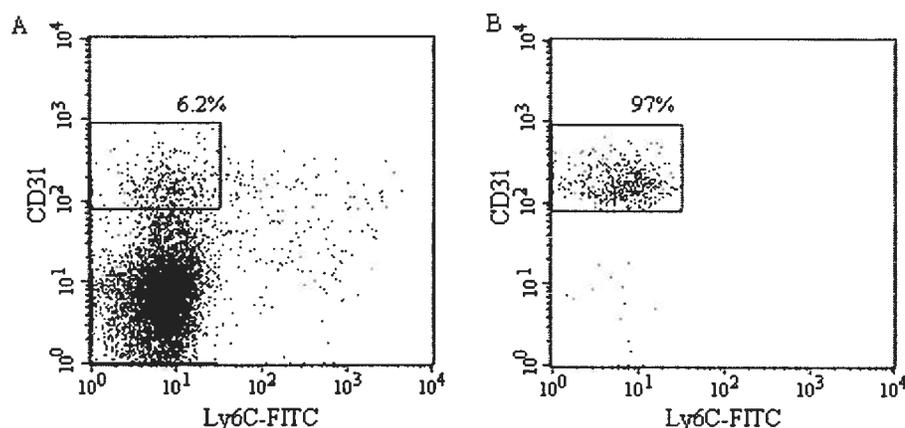


Figure 4: Exemple de tri de cellules de type progéniteur de foie fœtal EKL*F knock-out* 14,5dpc

Marquage et tri des cellules en utilisant les marqueurs de surface $CD31^{\text{high}}$ et $Ly6C^-$ A) Population des cellules avant le tri, le pourcentage représente la population $CD31^{\text{high}}$ et $Ly6C^-$ qui sera triée B) Pureté des cellules après le tri, le pourcentage représente la population $CD31^{\text{high}}$ et $Ly6C^-$ des cellules triées.

Afin de caractériser les deux populations de cellules $CD31^{\text{high}}Ly6C^-$, nous les avons mis en culture sur milieu semi-solide de méthyl-cellulose. Nous avons utilisé 500 cellules $CD31^{\text{high}}Ly6C^-$ pour chaque population. Selon les différentes caractéristiques des colonies on peut les identifier comme étant des CFU-E (*colony forming unit-erythroid*), BFU-E (*burst forming unit-erythroid*), CFU-GM (*colony forming unit-granulocyte macrophage*) ou CFU-GEMM (*colony forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megacaryocyte*). Les différentes colonies ont été comptées après 5 ou 14 jours de croissance (tableau III, page 37). Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences.

La capacité des deux populations de cellules $CD31^{high}Ly6C^{-}$ à former des colonies est similaire, soit environ 60 colonies à partir de 500 cellules. Pour ce qui est du type de colonies formées, les nombres de colonies obtenus pour les BFU-E et les CFU-GEMM sont similaires, tandis qu'il y a en moyenne 1.33 fois plus de CFU-GM et 2 fois moins de CFU-E à partir des cellules $CD31^{high}Ly6C^{-}$ de foie *wild-type* qu'à partir des foies EKL*F knock-out*. En comparant le pourcentage de CFC obtenu à partir des cellules $CD31^{high}Ly6C^{-}$ (11,9%) avec celui obtenu à partir du foie total (0,17%), on détermine que l'on a enrichi la population de 70 fois en progéniteurs suite au tri cellulaire, et ce pour les foies proficients ou déficients pour EKL*F*.

Les populations de cellules utilisées pour cette étude se situent aux niveaux des accolades dans le schéma ci-dessous.

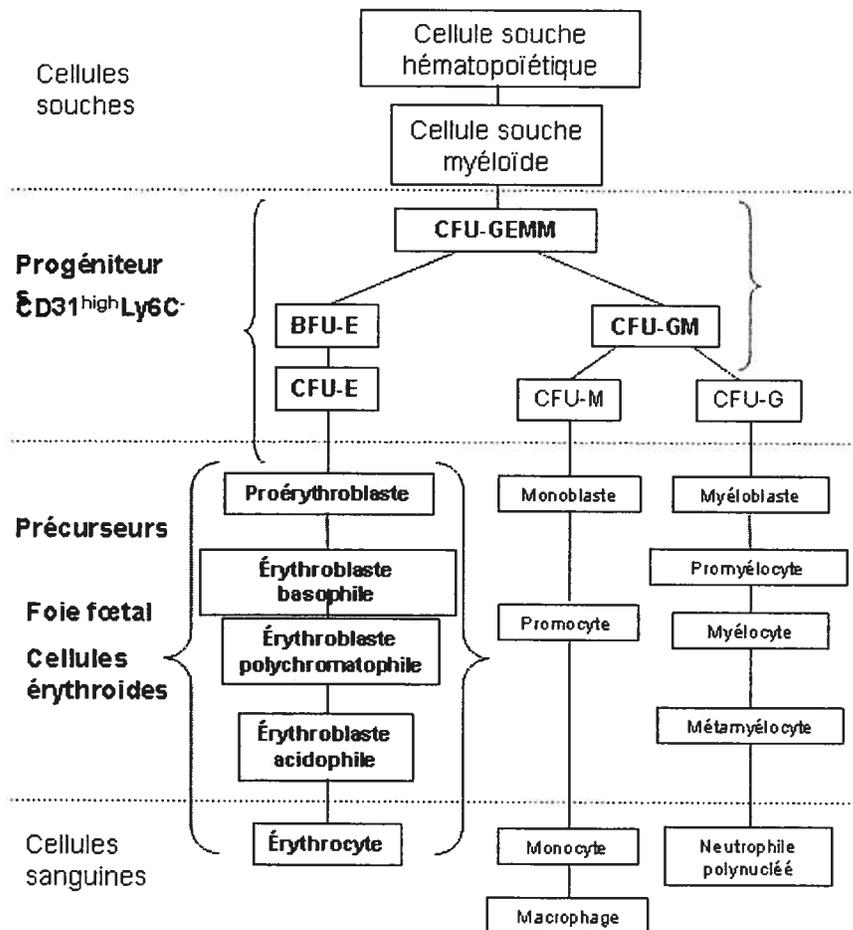


Figure 5: Représentation schématique des populations de cellules utilisées dans ce travail adapté à partir du volume de Charpentier (1996)

Tableau III: Capacité de 500 cellules CD31^{high}Ly6C⁻ à former des colonies en méthyl-cellulose

Cellules CD31 ^{high} Ly6C ⁻	CFU-GEMM	CFU-GM	BFU-E	CFU-E	CFC
EKLF <i>wild-type</i>	10	27.67	19.67	3.66	61
EKLF <i>knock-out</i>	11	19.67	19.66	8	58

3.2 Expression de EKLF dans les cellules enrichies en progéniteurs

Ziegler et collaborateurs (1999) n'ont pas observé d'expression de EKLF dans des progéniteurs isolés à partir du sang de cordon ombilical humain (tissu employé pour isoler des HPC utilisés pour les greffes comme alternative à la moelle osseuse), mais Qian et *al.* (2002) ont observé que des progéniteurs isolés à partir de la moelle osseuse (site principal de l'hématopoïèse adulte) humaine expriment EKLF. Étant donné que ces populations de cellules sont de sources et d'espèces différentes à la population utilisée dans notre étude (le foie fœtal murin, site de l'hématopoïèse fœtal), nous avons vérifié l'expression de EKLF dans nos cellules CD31^{high}Ly6C⁻. Nous avons extrait de l'ARN à partir de 600 000 cellules CD31^{high}Ly6C⁻ de foie fœtal 14,5 dpc, 1 million de cellules de foie fœtal CD1 (contrôle positif) et 1 million de cellules de foie fœtal EKLF *knock-out* (contrôle négatif). Nous avons synthétisé l'ADN complémentaire (ADNc) par réaction de transcription inverse standard, puis nous avons procédé à une réaction de PCR en duplex, c'est-à-dire en amplifiant simultanément deux régions. Nous avons utilisé des amorces amplifiant l'ADNc de EKLF et l'ADNc de Gapdh (contrôle interne). Gapdh est un gène exprimé de façon ubiquitaire, cette propriété nous permet de l'utiliser comme point de comparaison pour l'expression de EKLF peu importe le type cellulaire étudié. La figure 6A (page 38) montre les résultats obtenus pour des concentrations croissantes d'ADNc. Comme attendu, il n'y a pas d'expression de EKLF avec l'ADNc des cellules EKLF *knock-out* utilisées comme contrôle négatif. On observe que pour une expression équivalente du gène Gapdh, EKLF est moins exprimé dans la population enrichie en progéniteurs que dans les cellules érythroïdes du foie complet. Donc selon ce résultat, EKLF serait exprimé dans la population de cellules enrichie en progéniteurs, mais à un niveau inférieur au niveau d'expression dans les cellules érythroïdes. Cependant, il est également possible que cette expression soit le reflet d'une contamination par quelques cellules matures. En effet, la pureté des progéniteurs utilisés

était de 90%, alors un doute raisonnable persiste quand à la véracité de ce résultat. Nous avons donc procédé à un essai de RT-PCR en une étape sur 10 cellules à la fois. Les cellules $CD31^{high} Ly6C^{-}$ ont été triées dans une plaque à PCR à raison de 10 cellules par puits. La figure 6B (page 38) montre les résultats obtenus pour dix puits. 7 puits sur 10 ont donné un signal positif pour EKLf. Ce résultat vient confirmer le premier résultat, il semble que EKLf est exprimé dans nos cellules de type progéniteur. Puisque 7 puits sur 10 sont positifs pour EKLf, il est peu probable que la détection d'expression d'EKLf soit due à une contamination lors du tri. Ce résultat suggère que EKLf est exprimé dans certaines cellules de type progéniteur $CD31^{high} Ly6C^{-}$ isolées des foies fœtaux 14,5 dpc.

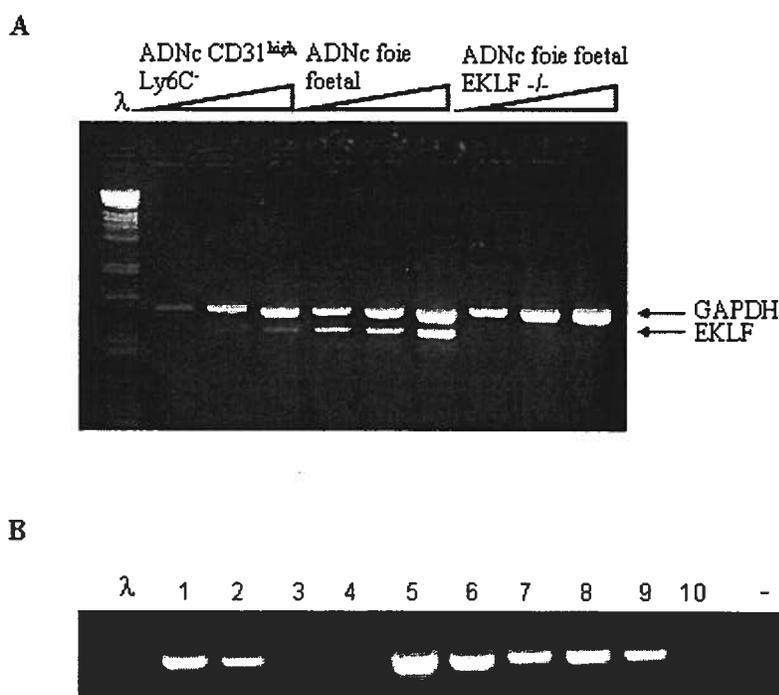


Figure 6: Expression de EKLf dans les cellules enrichies en progéniteurs

A) PCR montrant l'expression de EKLf comparativement à Gapdh avec des concentrations croissantes d'ADNc synthétisé à partir d'ARN isolés de cellules $CD31^{high} Ly6C^{-}$, de cellules de foie fœtal 14,5dpc et de foie fœtal EKLf *knock-out* 14,5 dpc. B) RT-PCR en une étape (*one-step RT-PCR*) sur 10 cellules $CD31^{high} Ly6C^{-}$ par réaction montrant l'expression de EKLf. λ : marqueur de poids moléculaire ; 1 à 10 : numéro des puits ; - : contrôle négatif (aucune cellule) ; + : contrôle positif (ARN de foie fœtal complet).

3.3 Expression des gènes adultes de la globine β dans les progéniteurs

Nous avons récemment démontré que les gènes adultes murins et humains de la globine β sont exprimés dans les progéniteurs isolés de la moelle osseuse de souris transgéniques possédant le locus humain de la globine β (*ln2*) (Bottardi et al., 2003). Les souris *ln2* expriment les gènes de la globine β dans toutes leurs cellules érythroïdes (Strouboulis et al., 1992). L'analyse du patron de l'expression des gènes du locus humain lors du développement de souris transgéniques *ln2* a montré que le gène ϵ est exprimé seulement dans le sac vitellin, le gène γ est exprimé dans le sac vitellin et dans le foie fœtal, et le gène β dans le foie fœtal et dans la moelle osseuse. Le changement d'expression entre γ et β survient vers 11,5 dpc et il est complété vers 13 dpc (Strouboulis et al., 1992). Rappelons-nous que les gènes β adultes (δ et β) du locus humain et les gènes adultes (β -mineur et β -majeur) du locus murin sont exprimés dans les cellules érythroïdes du foie fœtal 14,5 dpc. Étant donné que EKLF est essentiel à l'expression des gènes adultes de la globine β et que nous avons observé qu'il est exprimé dans les progéniteurs $CD31^{\text{high}}Ly6C^-$, nous avons vérifié si l'expression basale des gènes adultes de la globine β est dépendante de EKLF dans les progéniteurs $CD31^{\text{high}}Ly6C^-$. Dans un premier temps, nous avons vérifié l'expression des gènes adultes de la globine β dans les progéniteurs $CD31^{\text{high}}Ly6C^-$ isolés de foies fœtaux 14,5 dpc de souris transgéniques *ln2*. Pour vérifier l'expression des gènes β dans la population de cellules enrichie en progéniteurs, des cellules $CD31^{\text{high}}Ly6C^-$ ont été triées dans une plaque à PCR à raison de 1 cellule par puits. Les amorces utilisées dans les réactions de RT-PCR co-amplifient à la fois les gènes adultes de souris (β -majeur et β -mineur) et humains (δ et β) (Reik et al., 1998). Les produits de PCR correspondants aux transcrits humains et de souris ont la même taille, c'est pourquoi ils doivent être séparés par digestion à l'aide de l'enzyme de restriction *EcoRI* qui reconnaît un polymorphisme entre les séquences humaine et de souris. La figure 7A (page 40) montre les résultats obtenus pour dix puits. Le contrôle positif, de l'ARN de foie fœtal 14,5 dpc de souris *ln2* montre les deux fragments obtenus après amplification et digestion des produits de PCR. Après digestion, le fragment ayant le poids moléculaire le plus haut (343pb) représente l'expression murine (β -majeur et β -mineur) et le fragment le plus petit (266pb) représente celle du locus humain (δ et β). Seulement 1 cellule sur 10 exprime

un transcrit pour les gènes adultes de la globine β humaine et 2 sur 10 expriment un transcrit pour ceux de la souris. Ces proportions sont relativement faibles comparativement aux résultats que nous avons obtenus avec les cellules de type progéniteur de la moelle osseuse, soit 18/25 pour les transcrits de souris et 13/26 pour les transcrits humains (Bottardi et *al.*, 2003, voir l'annexe I). Les résultats de cette expérience semblent indiquer que très peu de progéniteurs $CD31^{high}Ly6C^{-}$ provenant de foies fœtaux 14,5 dpc expriment les gènes adultes des locus murin et humain de la globine β .

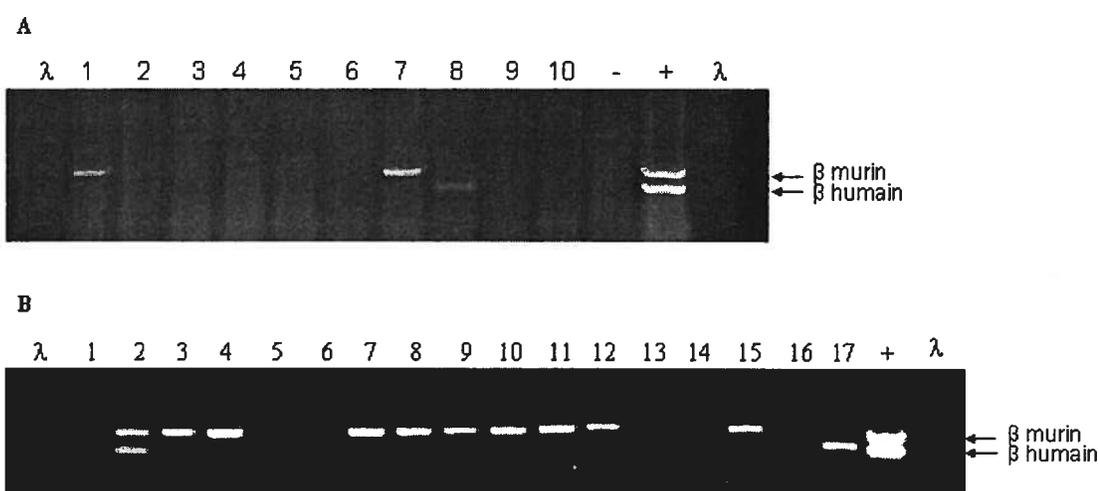


Figure 7 : Expression des gènes adultes de la globine β murine et humaine dans les cellules enrichies en progéniteurs

A) Cellules $CD31^{high}Ly6C^{-}$ de foies fœtaux 14,5 dpc de souris *In2*, B) Cellules $CD31^{high}Ly6C^{-}$ de foies fœtaux 14,5 dpc de souris *In2 EKLf knock-out*. A et B) Les cellules $CD31^{high}Ly6C^{-}$ ont été triées à raison d'une cellule par puits dans une plaque à PCR. Les produits de PCR sont amplifiés à partir d'une seule paire d'amorce amplifiant à la fois l'ADNc des formes adultes de la globine β murine et humaine. Les produits de PCR pour les transcrits murins et humains sont de la même taille, ils ont été précipités, puis digérés par *EcoRI* afin de distinguer les deux produits. λ : marqueur de poids moléculaire ; 1 à 17 : numéro des puits; - : contrôle négatif (aucune cellule); + : contrôle positif (ARN de foie fœtal complet).

Nous avons ensuite vérifié l'expression des gènes adultes humains et murins dans les progéniteurs CD31^{high}Ly6C⁻ EKL *knock-out*. Seulement 2 cellules sur 17 expriment les gènes adultes humains, tandis que 11 cellules sur 17 expriment les gènes adultes murins (figure 7B, page 40). Dans une expérience similaire, nous avons déposé 5 cellules CD31^{high}Ly6C⁻ EKL *knock-out* par puits au lieu d'une seule. Nous avons obtenu des proportions semblables lors de cette expérience, soit 2 puits sur 10 ont donné un signal positif pour les gènes adultes humains, tandis que 6 sur 10 étaient positifs pour les gènes murins adultes. Il semble que les cellules de type progéniteur *knock-out* pour EKL*F* expriment plus les transcrits murins que les cellules de type progéniteur *wild-type*, par contre les transcrits adultes humains sont exprimés de façon similaire dans la population de cellules enrichie en progéniteurs indépendamment de EKL*F*.

3.4 Acétylation des histones et EKL*F*

Maintenant que nous avons déterminé les différentes populations de cellules qui seront utilisées dans notre travail, nous pouvons procéder à l'étude de la chromatine de ces cellules. Nous ne pouvons pas être certain que la structure de la chromatine du locus de la globine β des cellules de foie fœtal 14,5 dpc soit identique à celle de la moelle osseuse. C'est pourquoi avant d'investiguer l'effet de EKL*F* nous avons d'abord établi les niveaux d'acétylation histones H3 et H4 pour les cellules érythroïdes et pour les progéniteurs du foie *wild-type*. Nous avons vérifié l'acétylation à cinq régions du locus : la région du HS3 parce que c'est un site important pour l'activité du LCR et que EKL*F* semble être requis pour son activité, la région du promoteur du gène β et la région codante du gène β comme environnement actif pour la transcription et parce que EKL*F* est requis pour l'expression de ce gène, et la région du promoteur du gène γ et la région codante du gène γ comme environnement inactif pour la transcription. Pour connaître l'enrichissement en acétylation des différentes régions, on procède à l'immunoprécipitation de la chromatine avec l'anticorps voulu. Les fragments d'ADN que l'on a recueilli par ChIP avaient une longueur moyenne d'environ 800 pb (figure 8A, page 43). Nous avons privilégié l'emploi de fragments de 800 pb, car nous voulions établir un patron général des modifications de la chromatine. Le matériel immunoprécipité «ChIP» et de l'ADN prélevé avant l'immunoprécipitation «l'input» ont

été analysés par des PCR en duplex. Des réactions de PCR avec des concentrations croissantes d'ADN sont réalisées afin d'identifier la phase linéaire d'amplification (figure 8B, page 43). Ensuite, par *PhosphorImager* (*Storm 840* d'*Amersham Biosciences*) à l'aide du logiciel *Image quant 5.2*, on quantifie les bandes qui correspondent à la région d'intérêt et au contrôle interne (ZFP37). Dans les cellules hématopoïétiques, ZFP37 n'est pas transcrit. De plus, il a déjà été utilisé comme contrôle pour étudier la chromatine du locus de la globine β (McMarrow et *al.*, 2000; Bottardi et *al.*, 2003). Par division de l'intensité obtenue pour le site d'intérêt par celle obtenue pour le contrôle interne, on obtient un rapport de l'intensité normalisée. Lorsqu'on a calculé les rapports normalisés correspondant à l'input et au ChIP, on calcule l'enrichissement (E) des histones pour un site en divisant le rapport du ChIP par le rapport correspondant à l'input (voir formule page 28 du matériel et méthodes). Comme les résultats que nous avons obtenus dans cette étude n'ont pas une distribution normale, ils ne remplissent pas les conditions d'application des tests paramétriques. Nous avons donc employé le test de comparaison d'échantillons non paramétriques de Wilcoxon-Mann-Whitney (Scherrer, 1984). Nous devons mettre un bémol sur les comparaisons d'enrichissements des différentes régions du locus qui suivront. En effet, la longueur de l'amplicon des différents jeux d'amorces fait varier l'intensité de l'amplicon analysé. De plus, l'efficacité d'amplification des différents jeux d'amorces peut influencer le résultat. C'est pourquoi, il faut donner une moindre importance aux comparaisons impliquant les différentes régions que celles faites entre les différents types cellulaires ou fond génétique, car ces dernières ne sont pas influencées par ces variables. Une fois ces considérations en tête, il est tout de même intéressant de faire toutes ces comparaisons c'est pourquoi elles sont incluses dans le texte qui suit.

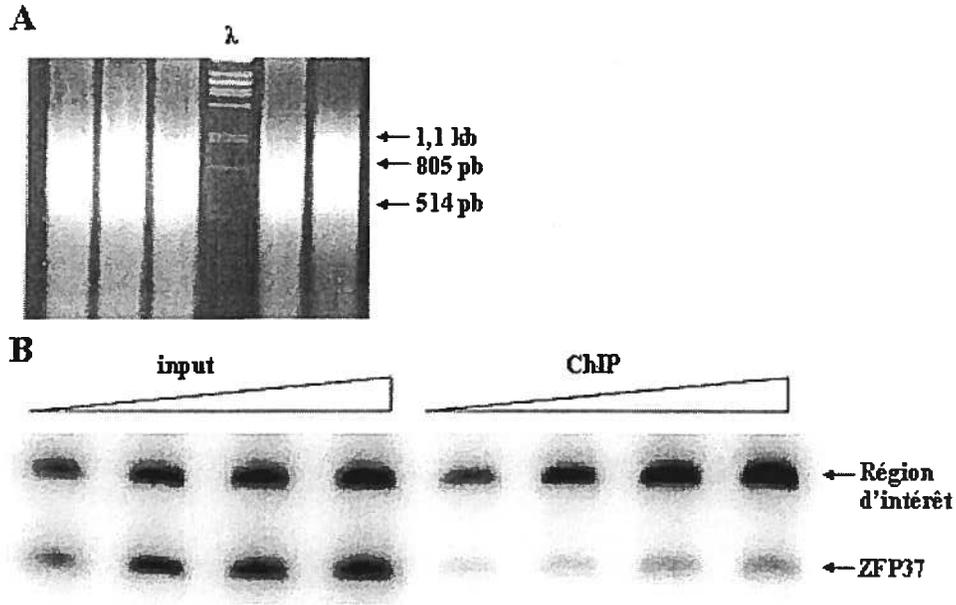


Figure 8 : Exemple d'échantillons de ChIP

A) Exemple de la longueur moyenne des fragments utilisés pour les ChIP et B) exemple d'échantillons en phase linéaire. λ : marqueur de poids moléculaire

Nous avons donc vérifié l'acétylation des histones H3 et H4 des cellules érythroïdes du foie fœtal In2 (14,5 dpc), aux 5 régions mentionnées plus haut. Les résultats obtenus pour les histones H3 (figure 9, page 44), montrent que le niveau d'acétylation est semblable ($\alpha \leq 1\%$) aux cinq régions étudiées avec un enrichissement entre 6,2 et 7. Pour l'acétylation des histones H4 (figure 9, page 44), les enrichissements observés aux 5 régions (entre 4 et 6,4) ne sont pas significativement différents au seuil de 0,1%. L'acétylation globale des histones H3 est 1,5 fois plus élevée que celle des histones H4, sauf au HS3 ($\alpha \leq 0,1\%$).

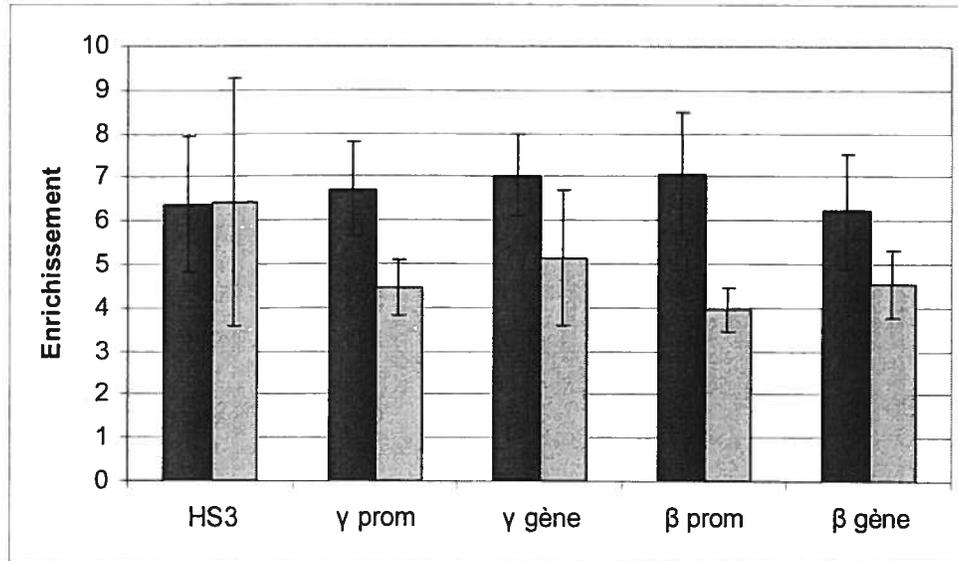


Figure 9 : Patron d'acétylation des histones H3 et H4 dans les cellules érythroïdes.

Le niveau d'enrichissement des histones H3 acétylées est représenté par les bandes grises foncées. Le niveau d'enrichissement des histones H4 acétylées est représenté par les bandes grises pâles. L'axe des Y représente l'enrichissement (rapport du ChIP/rapport de l'input). HS3 : région du HS3; γ prom : région du promoteur γ ; γ gène : région codante du gène γ ; β prom : région du promoteur β ; β gène: région codante du gène β .

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié l'acétylation des histones H3 et H4 dans la population de cellules enrichie en progéniteurs (figure 10, page 45). Le niveau d'acétylation des histones H3 de la région du HS3 est entre 3 et 8 fois plus élevé que les autres sites du locus. De plus, la région du promoteur du gène γ a un enrichissement de 4,5, ce qui est environ 2 fois plus élevé que l'enrichissement de la région du promoteur du gène β ($E = 1,7$) et de celui de la région codante de γ ($E = 2$) ($\alpha \leq 1\%$). Même si l'enrichissement en acétylation de l'histone H4 de la région du HS3 et de celle du promoteur γ est moins élevé que l'enrichissement des histones H3, il est de 1,6 à 3 fois plus élevé dans la région du HS3 que pour les autres régions du locus ($\alpha \leq 1\%$). La région du promoteur γ est 1,5 fois plus acétylée que la région codante du gène γ ($\alpha \leq 1\%$). L'acétylation des histones H3 est plus élevée que celle des histones H4 pour les régions du HS3 (3,8 fois), du promoteur γ (2,1 fois) et du gène β (1,7 fois) avec un seuil de probabilité de 1%. En résumé, le point marquant de l'acétylation dans les cellules enrichies en progéniteurs semble se situer dans la région du HS3.

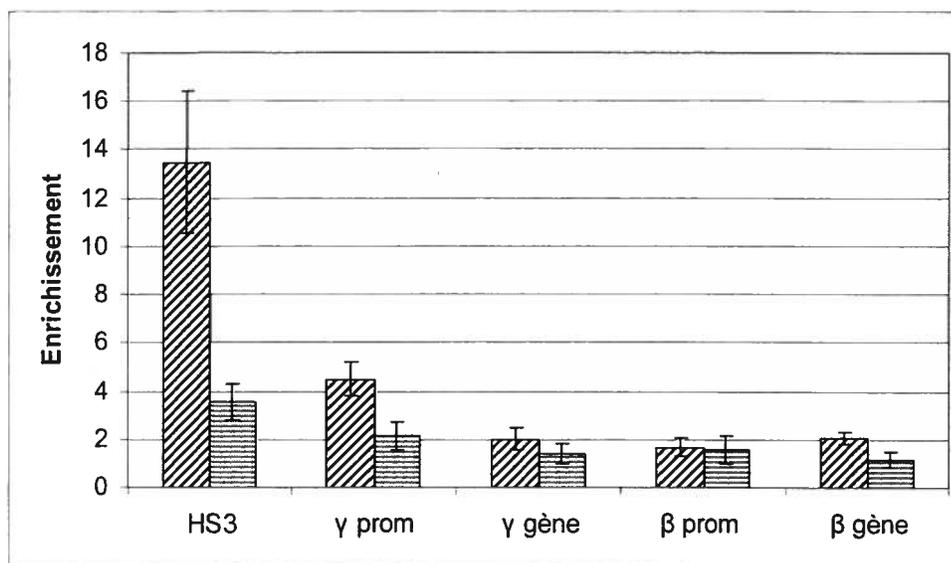


Figure 10 : Patron d'acétylation des histones H3 et H4 dans les cellules de type progéniteur.

Le niveau d'enrichissement des histones H3 acétylées est représenté par les bandes lignées obliques. Le niveau d'enrichissement des histones H4 acétylées est représenté par les bandes lignées à horizontales. L'axe des Y représente l'enrichissement (rapport du ChIP/rapport de l'input). HS3 : région du HS3; γ prom : région du promoteur γ ; γ gène : région codante du gène γ ; β prom : région du promoteur β ; β gène: région codante du gène β .

Lorsque l'on compare l'acétylation des histones des cellules enrichies en progéniteurs avec celle des cellules érythroïdes, on observe plusieurs différences. Premièrement, pour les histones H3, toutes les régions examinées sont plus acétylées dans les cellules érythroïdes que dans les cellules de type progéniteur (1,5 à 4,2 fois, $\alpha \leq 1\%$), à l'exception du HS3 qui est 2,1 fois moins acétylé ($\alpha \leq 1\%$). Deuxièmement, pour l'acétylation des histones H4, tous les sites sont plus acétylés dans les cellules érythroïdes que dans la population de cellules enrichie en progéniteurs (1,8-3,9 fois, $\alpha \leq 1\%$). En résumé, dans les cellules de type progéniteur, on observe un enrichissement d'acétylation autour de 2, à l'exception du HS3 où l'on observe un pic d'acétylation des histones H3. Dans les cellules érythroïdes, l'acétylation des histones du locus aux sites étudiés subit une hausse générale, à l'exception de celle du HS3 qui diminue pour se retrouver au même niveau que les autres sites.

Les résultats obtenus à partir des cellules du foie fœtal (de type progéniteur et érythroïdes) diffèrent de ceux que nous avons récemment publiés (Bottardi et *al.*, 2003) que l'on peut trouver à l'annexe I. Malgré ces différences qui seront abordées dans la discussion, nous avons établi le patron d'acétylation de la chromatine du locus de la globine β dans les cellules de foies fœtaux 14,5 dpc (érythroïdes et enrichies en progéniteurs), nous permettant d'étudier l'influence de EKLF sur cette modification des histones.

Pour étudier l'influence de EKLF sur l'acétylation du locus, nous avons d'abord regardé son influence dans les cellules où son rôle est connu, c'est-à-dire dans les cellules érythroïdes. La figure 11 (page 47) présente la comparaison entre les résultats obtenus dans les cellules érythroïdes *wild-type* (bandes pleines) par rapport aux cellules érythroïdes EKLF *knock-out* (bandes quadrillées). Contrairement aux cellules érythroïdes *wild-type*, le niveau d'enrichissement en acétylation pour les histones H3 dans les cellules érythroïdes EKLF *knock-out* varient selon les régions étudiées. L'acétylation dans la région du promoteur β ($E = 1,6$) et dans la région codante β ($E = 1,6$) est significativement ($\alpha \leq 1\%$) plus basse (1,6 à 2 fois) que l'acétylation aux autres régions (E entre 2,5 et 3,4). De plus, l'acétylation de la région du promoteur γ ($E = 2,5$) est plus basse que celle de la région du HS3 ($E = 3,4$) ($\alpha \leq 1\%$). En résumé, l'absence de EKLF affecte à la baisse l'acétylation des histones H3 à toutes les régions examinées et de façon plus prononcée dans la région du gène β .

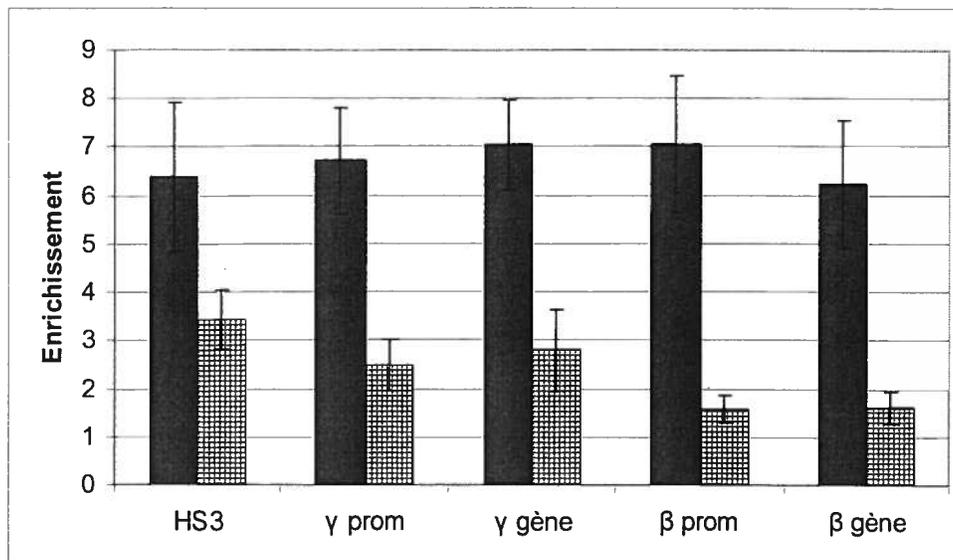


Figure 11 : Acétylation des histones H3 en présence et en absence de EKLTF

Comparaison de l'acétylation des histones H3 du locus de la globine β humaine dans les cellules érythroïdes de la lignée de souris *In2* en présence (bande pleine) et en absence (bandes quadrillées) du facteur de transcription EKLTF. HS3 : région du HS3; γ prom : région du promoteur γ ; γ gène : région codante du gène γ ; β prom : région du promoteur β ; β gène : région codante du gène β .

Nous avons poursuivi en vérifiant l'acétylation des histones H4 dans les cellules érythroïdes EKLTF *knock-out*. La figure 12 (page 48) présente les résultats obtenus pour ces cellules en comparaison avec les résultats qui avaient été obtenus dans les cellules érythroïdes *wild-type*. On observe une différence significative entre les deux types de cellules au niveau de toutes les régions sauf celle du HS3 ($\alpha \leq 1\%$). En effet, l'enrichissement en histones H4 acétylées diminue entre 1,8 et 3,1 fois (sauf au HS3) en absence de EKLTF dans les cellules érythroïdes. Lorsqu'on compare, entre elles, les différentes régions du locus de la globine β dans les cellules érythroïdes *knock-out*, on observe que le niveau d'acétylation des histones H4 de la région du HS3 est plus de 1,9 fois plus élevé que celui des autres régions ($\alpha \leq 1\%$). Les différences en acétylation des histones H4 entre la région du promoteur γ et sa région codante ainsi qu'entre la région du promoteur β et sa région codante ne sont pas significatives ($\alpha \leq 1\%$). Cependant, la différence entre l'enrichissement en histones acétylées de la région codante des deux gènes est différente au seuil de 1%, tandis que celle entre les promoteurs ne l'est pas au

seuil de 0,1%. En résumé, l'absence de EKLF dans les cellules érythroïdes affecte le niveau d'acétylation des histones H4 de la région des promoteurs γ et β , ainsi que celui des régions codantes des gènes γ et β .

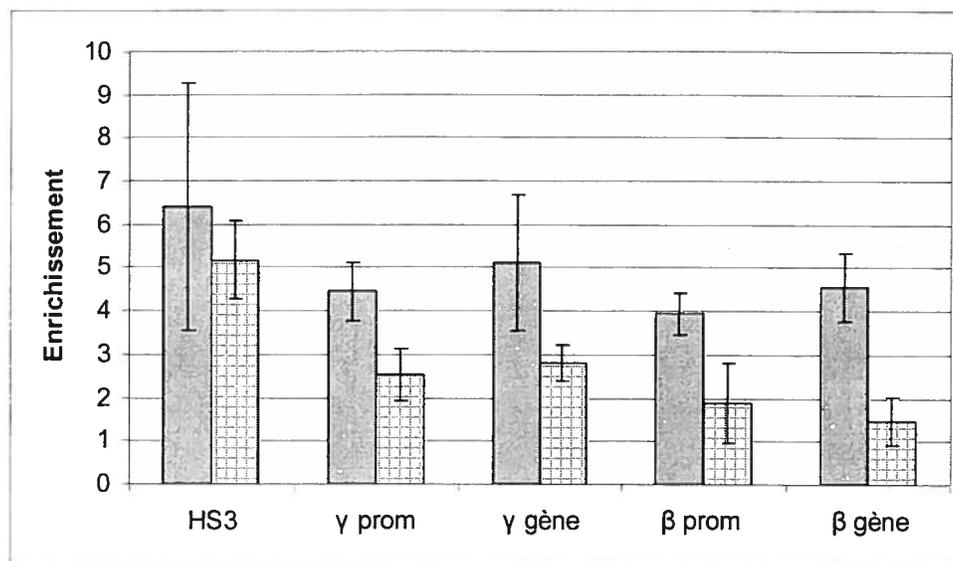


Figure 12 : Acétylation des histones H4 dans les cellules érythroïdes en présence ou en absence de EKLF. Les cellules érythroïdes de la lignée de souris *In2* en présence (bande pleine) et en absence du facteur de transcription EKLF (bandes quadrillées). HS3 : région du HS3; γ prom : région du promoteur γ ; γ gène : région codante du gène γ ; β prom : région du promoteur β ; β gène: région codante du gène β .

Les enrichissements obtenus pour l'acétylation des histones H3 et H4 nous indiquent que l'absence de EKLF semble affecter à la baisse l'acétylation des histones du locus dans les cellules érythroïdes, sauf pour l'acétylation de l'histone H4 dans la région du HS3 où il ne semble pas y avoir de différence. De plus, il semble que les régions du promoteur et de la partie codante du gène β sont plus fortement touchées par l'absence de EKLF que les autres régions.

Étant donné que la diminution d'acétylation des histones semble plus importante pour le gène β (promoteur et partie codante), nous avons vérifié si ces régions sont touchées dans les progéniteurs déficients pour EKLF. La figure 13 (page 49) récapitule les résultats obtenus pour l'enrichissement des histones H3 pour les quatre types de

cellules étudiées. L'absence de EKLF dans la population de cellules enrichie en progéniteurs n'a pas d'effet sur l'acétylation des histones H3 de la région du promoteur, mais au niveau du gène elle induit une diminution d'environ 2 fois par rapport aux cellules de type progéniteur *wild-type* ($\alpha \leq 1\%$). Il faut noter que les cellules de type progéniteur *knock-out* est le seul type de cellules où l'on observe une différence significative entre les niveaux d'acétylation des histones H3 entre la région du promoteur et la région codante du gène β . Donc, il semble que l'absence de EKLF affecte l'acétylation des histones H3 des cellules érythroïdes de la région du gène β (promoteur et partie codante), mais que son absence dans les cellules de type progéniteur affecte seulement la partie codante du gène.

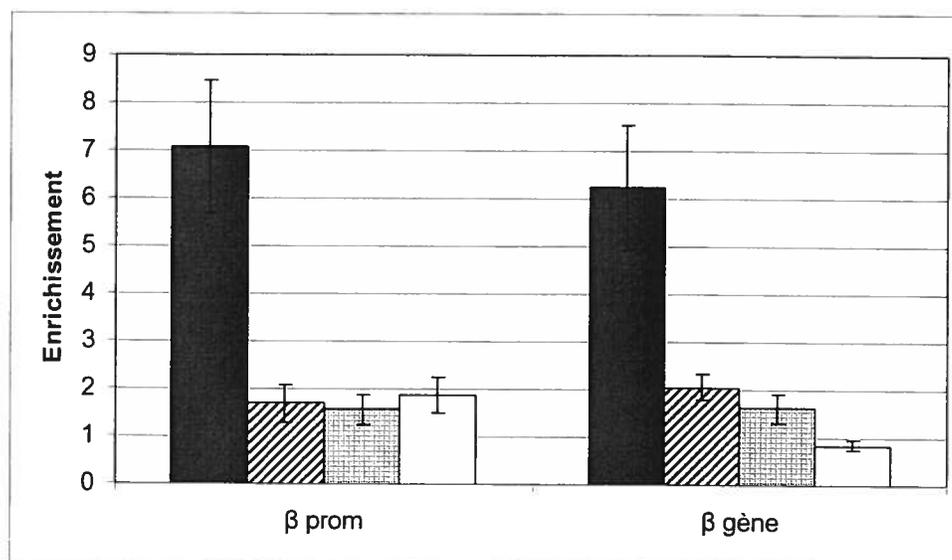


Figure 13 : Acétylation des histones H3 de la région du promoteur et de la région codante du gène β

Bandes foncées pleines : cellules érythroïdes; bandes rayées obliques : cellules enrichies en progéniteurs; bandes quadrillées : cellules érythroïdes EKLF *knock-out*; bandes claires : cellules enrichies en progéniteurs EKLF *knock-out*. β prom : région du promoteur β ; β gène: région codante du gène β .

Nous avons également regardé ce qu'il en est au niveau de l'acétylation des histones H4 dans les cellules enrichies en progéniteurs (figure 14, page 50). L'absence de EKLF dans ces cellules n'a pas d'effet significatif au seuil de 0,1% sur le niveau d'acétylation des histones H4. Donc, il semble que pour l'acétylation des histones H4, ce soit seulement les érythroïdes qui sont touchées par l'absence de EKLF.

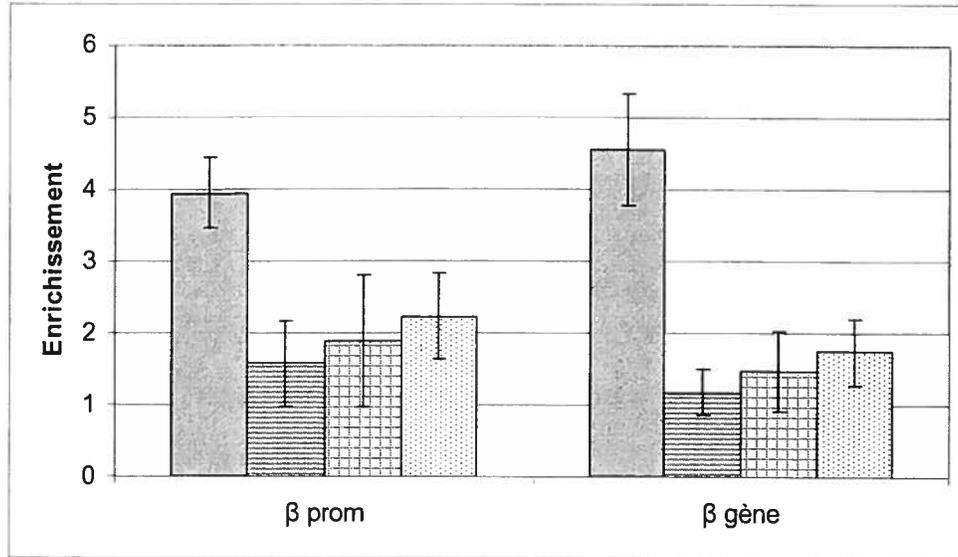


Figure 14 : Acétylation des histones H4 de la région du promoteur β et de la région codante du gène β .

Bandes pâles pleines : cellules érythroïdes; bandes rayées horizontales : cellules enrichies en progéniteurs; bandes quadrillées : cellules érythroïdes EKLf *knock-out*; bandes pointillées : cellules enrichies en progéniteurs EKLf *knock-out*. β prom : région du promoteur β ; β gène: région codante du gène β .

En résumé, l'absence de EKLf semble entraîner une forte diminution d'acétylation des histones H3 et H4 surtout dans les cellules érythroïdes, les cellules de type progéniteur n'étant affectées par une baisse (de moitié) que dans la région codante du gène β et ce seulement pour les histones H3. Il semble donc que EKLf ne soit pas très important pour l'acétylation des histones de la région du gène β (promoteur et partie codante) dans les cellules de type progéniteur, du moins dans cette région à ce stade de la différenciation des cellules hématopoïétiques.

3.5 Rôle de EKLf dans les cellules érythroïdes primitives

Le rôle le mieux caractérisé de EKLf est l'activation de la transcription du gène β adulte du locus de la globine β , cependant EKLf est exprimé dans les embryons murins dès 7,5 dpc (Southwood et al., 1996). Pourtant, l'expression des gènes β -mineur et β -majeur murin commence seulement vers le jour 11,5 dpc. Le groupe de Tewari (1998) a proposé que EKLf est actif dans les cellules érythroïdes primitives et qu'il est requis pour l'activité du HS3. Afin d'investiguer si EKLf est important pour l'acétylation des

histones dans les cellules érythroïdes primitives, nous avons utilisé les cellules du sac vitellin 10,5 dpc. Étant donné que Tewari et *al.* (1998) ont montré que EKLF est requis pour l'activité du HS3, nous avons d'abord étudié l'acétylation des histones de la région du HS3. Les données pour les cellules érythroïdes primitives *wild-type* ont été fournies par Wollenschlaeger A. et Milot E. (en préparation). La longueur des fragments qu'ils ont utilisés était de 800 pb et la méthode utilisée est la même. Les valeurs d'enrichissement peuvent donc être comparés à celles que nous avons obtenus. La figure 15 (page 51) montre les résultats pour les cellules érythroïdes primitives *wild-type* en comparaison aux cellules érythroïdes primitives *knock-out* pour l'acétylation des histones H3 et H4. Les histones des cellules érythroïdes *wild-type* pour EKLF sont hyperacétylées dans la région du HS3. Les histones H3 et les histones H4 ont des enrichissements de 5,8 et 7,5 respectivement, tandis que dans les cellules érythroïdes primitives déficientes pour EKLF l'acétylation des histones diminue de 2 fois ($E = 2,8$) pour les histones H3 et de 5 fois ($E = 1,4$) pour les histones H4 ($\alpha \leq 1\%$). Ce résultat semble montrer que l'absence EKLF agit fortement sur l'acétylation de la région du HS3 dans les cellules érythroïdes primitives.

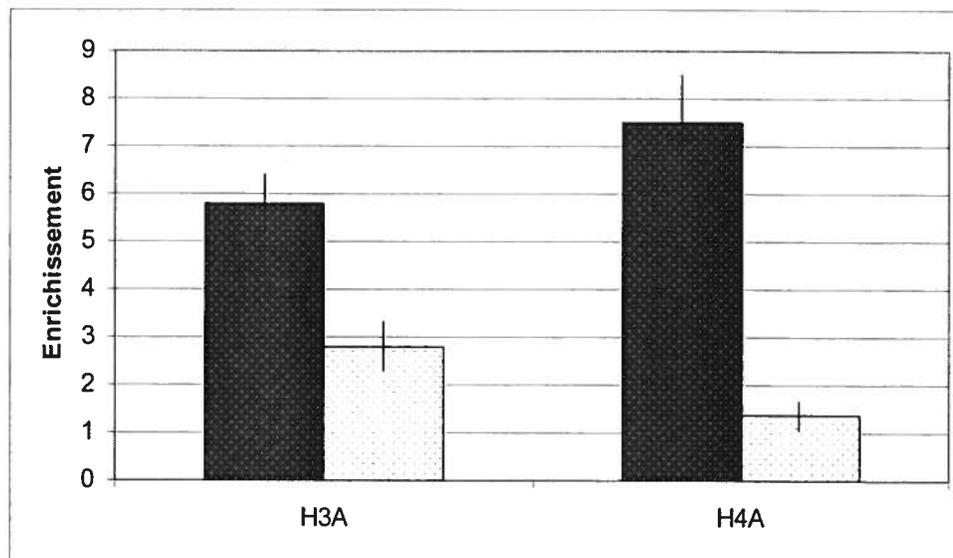


Figure 15 : Acétylation des histones de la région du HS3 dans les cellules érythroïdes primitives

Cellules érythroïdes primitives *wild-type* (bandes noires pointillées) vs cellules érythroïdes primitives EKLF *knock-out* (bandes blanches pointillées). H3A : histones H3 acétylées; H4A : histones H4 acétylées.

Le gène β n'est pas actif dans les cellules érythroïdes primitives. Nous avons tout de même vérifié si l'absence de EKLf a un effet sur l'acétylation des histones du gène β , comme c'est le cas pour les histones de la région du gène γ dans les cellules érythroïdes du foie fœtal 14,5 dpc (figure 11, page 47). De plus comme EKLf peut s'associer avec une histone dé-acétylase (Chen et Bieker, 2001), il pourrait être nécessaire à la répression du gène β . L'état d'acétylation du promoteur du gène β à ce stade du développement a été vérifié par A. Wollenschlaeger et E. Milot (en préparation). Le niveau d'acétylation observé dans les cellules érythroïdes primitives est moins important que dans les cellules érythroïdes définitives du foie fœtal 14,5 dpc. Nous avons vérifié si l'absence de EKLf entraîne un changement au niveau de l'acétylation de la région du promoteur β dans les cellules érythroïdes primitives (figure 16, page 52). Les histones H3 de la région du promoteur β ne sont pas enrichies en acétylation et ce dans les cellules érythroïdes primitives avec et sans EKLf. Cependant, même si l'acétylation des histones H4 du promoteur β est modeste ($E = 2,4$) dans les cellules érythroïdes primitives *wild-type*, elle diminue de 2,3 fois en absence du facteur de transcription EKLf (pas d'enrichissement). Donc, dans les cellules érythroïdes primitives du sac vitellin, EKLf semble contribuer à l'acétylation des histones H4.

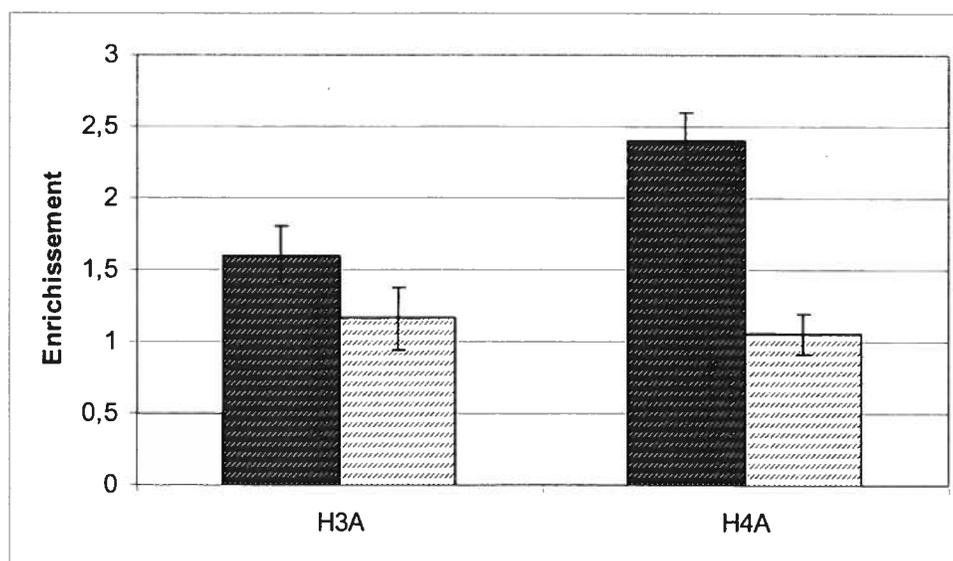


Figure 16 : Acétylation des histones de la région du promoteur β dans les cellules érythroïdes primitives

Acétylation des histones H3 et H4 de la région du promoteur β dans les cellules érythroïdes primitives *wild-type* (bandes noires hachurées) vs EKLf *knock-out* (bandes blanches hachurées). H3A : histones H3 acétylées; H4A : histones H4 acétylées.

Nous avons montré dans cette section que EKLF est important pour l'acétylation adéquate des histones de la région du HS3 dans les cellules érythroïdes primitives. EKLF influence aussi l'acétylation des histones H4 de la région du promoteur β . EKLF semble donc être un facteur important pour une acétylation des histones du locus de la globine β dans les cellules érythroïdes primitives et définitives.

3.6 La di-méthylation des histones et EKLF

La méthylation marque également les nucléosomes de la chromatine. En effet, la di-méthylation de la lysine 4 de l'extrémité N-terminale de l'histone H3 (H3K4) est reliée à une chromatine active (Strahl *et al.*, 1999). Nous avons donc établi le patron de di-méthylation de H3K4 pour les cellules érythroïdes *wild-type*, la population cellules enrichie en progéniteurs *wild-type* et les cellules érythroïdes EKLF *knock-out* (figure 17, page 54). Les histones de la région codante du gène β sont plus enrichies en di-méthylation de H3K4 dans les cellules de type progéniteur que dans les cellules érythroïdes *wild-type*, ce qui n'est pas observé au niveau de la région du promoteur β . De plus, on observe une diminution significative de 1,7 fois et de 2,4 fois de la di-méthylation de H3K4 de la région du promoteur β et de la région codante du gène β respectivement dans les cellules érythroïdes *knock-out* comparativement aux cellules érythroïdes *wild-type*. On a également observé la moitié de l'enrichissement en H3K4 di-méthylées dans la région du HS3 dans les cellules de type progéniteur et les cellules érythroïdes *knock-out* par rapport aux cellules érythroïdes *wild-type*. Aucune différence significative n'a été observée au promoteur du gène γ dans les trois types de cellules ($\alpha \leq 1\%$). Dans les cellules de type progéniteur, la région codante du gène β est environ 2,5 fois plus enrichie en H3K4 di-méthylée que la région du promoteur β . Finalement, la di-méthylation de H3K4 dans la région codante diminue de 1,8 fois dans cellules érythroïdes *wild-type* comparativement aux cellules de type progéniteur ($\alpha \leq 1\%$). En résumé, la di-méthylation de H3K4 diminue en absence de EKLF dans la région du HS3, du promoteur β et de la partie codante du gène β . De plus, cette marque est plus élevée dans la région codante du gène β dans les cellules de type progéniteur que dans les cellules plus matures, tandis que dans la région du HS3, c'est dans les cellules érythroïdes que l'on observe une plus grande di-méthylation de H3K4.

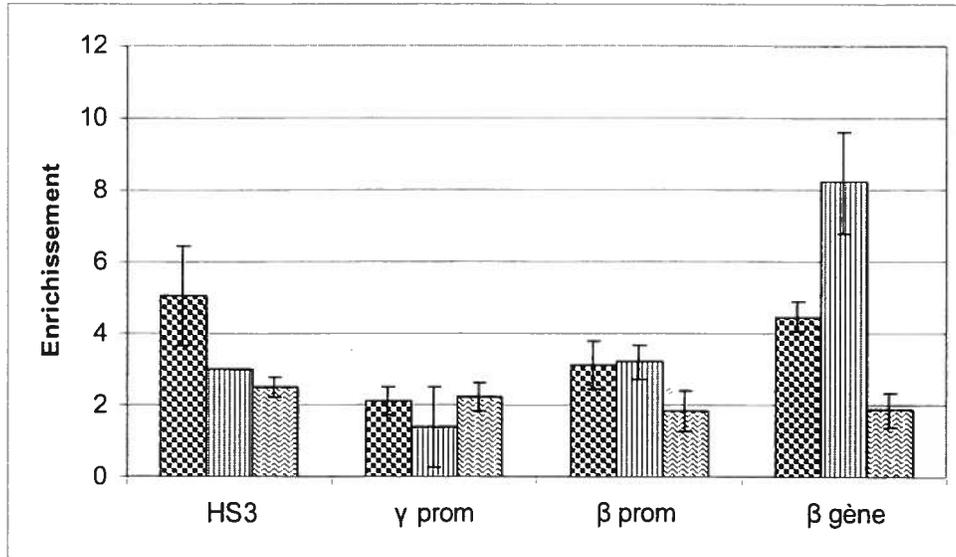


Figure 17 : Di-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3

Di-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 dans les cellules érythroïdes *wild-type* (bandes en échiquier), les progénéiteurs (bandes lignées verticale) et les cellules érythroïdes *knock-out* (bandes avec lignes vagues). HS3 : région du HS3; γ prom : région du promoteur γ ; β prom : région du promoteur β ; β gène: région codante du gène β .

Étant donné que la région codante du gène β semble marqué d'une di-méthylation dans les progénéiteurs, nous avons vérifié si l'absence de EKLF pouvait causer une modification du niveau de di-méthylation de H3K4 au niveau de la région du gène β (figure 18, page 55). Dans la région du promoteur et de la partie codante du gène β , la di-méthylation de H3K4 est significativement plus importante (2 fois) dans les progénéiteurs *wild-type* que dans la population de cellules enrichie en progénéiteurs *knock-out* ($\alpha \leq 1\%$). Cependant, la différence entre la di-méthylation dans la région du promoteur dans les cellules érythroïdes *knock-out* et celle dans la population cellules enrichie en progénéiteurs *knock-out* n'est pas significative ($\alpha \leq 1\%$). Toutefois, la différence entre la di-méthylation dans la région codante des cellules érythroïdes *knock-out* et celle dans les cellules de type progénéiteur *knock-out* est significative ($\alpha \leq 1\%$) et elle se traduit par une hausse d'enrichissement de 2 fois dans les cellules de type progénéiteur. En résumé, la di-méthylation des H3K4 diminue dans la région de promoteur β dans les cellules EKLF *knock-out*. Cependant, pour la région codante,

même si l'on observe une baisse de di-méthylation de H3K4 entre les cellules *wild-type* et *knock-out*, les cellules de type progéniteur *wild-type* et *knock-out* ont une plus grande di-méthylés de H3K4 que les cellules érythroïdes.

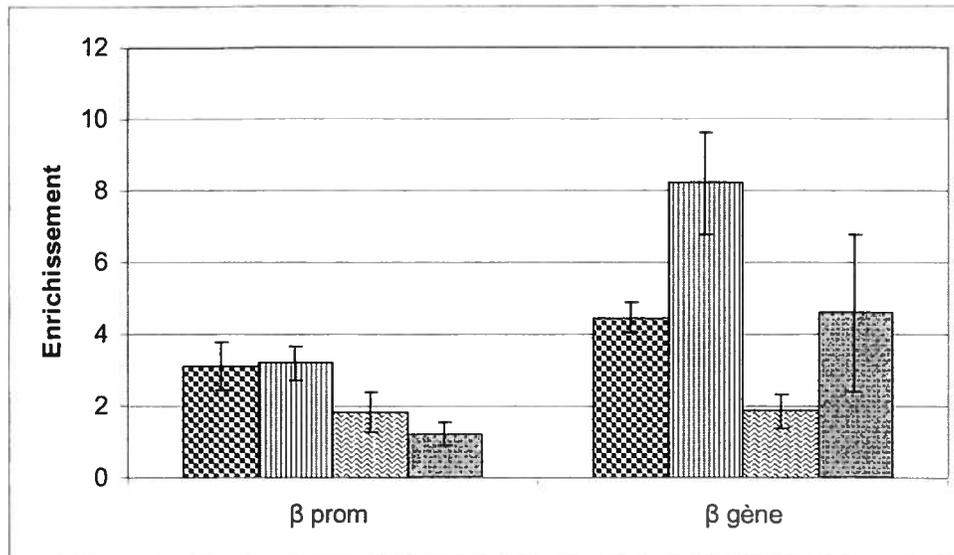


Figure 18 : Di-méthylation de H3K4 dans la région du gène β

Di-méthylation de H3K4 dans les cellules érythroïdes *wild-type* (bandes en échiquier), les progéniteurs (bandes lignées verticale), les cellules érythroïdes *knock-out* (bandes avec lignes vagues) et progéniteurs *knock-out* (bandes grises pointillées). β prom : région du promoteur β ; β gène: région codante du gène β .

4. Discussion

4.1 Réactivité des cellules EKLF *knock-out* à l'anticorps TER-119

Nous avons observé, dans trois expériences indépendantes, que les cellules de foies fœtaux EKLF *knock-out* 14,5 dpc n'expriment pas l'antigène TER-119 au niveau de leur membrane. Pourtant, au stade de maturation que ces cellules ont atteint, on aurait dû observer la présence de l'antigène. En effet, Perkins et *al.* (1995) ont observé que les cellules EKLF *knock-out* ont un phénotype d'érythroblastes nucléés et Kina et *al.* (2000) ont détecté ce type de cellules avec l'anticorps TER-119. Cependant, le groupe de Suwabe (1998) a obtenu des résultats qui suggèrent qu'il y a l'accumulation de TER-119 durant la différenciation des cellules érythroïdes. Il pourrait donc être possible que les cellules EKLF soient bloquées à un stade où un très faible niveau de TER-119 est exprimé et que nous ne l'avons pas détecté. On pourrait également penser que l'absence du facteur de transcription EKLF a un effet sur l'expression membranaire de l'antigène TER-119. Les défauts de maturation des cellules érythroïdes EKLF *knock-out* pourraient faire en sorte que l'antigène ne prend pas sa place à la membrane. Cette éventualité pourrait être testée par immunobuvardage de type Western sur un extrait cellulaire total provenant de cellules de foies fœtaux EKLF *knock-out* 14,5 dpc.

Des expériences d'immunoprécipitation avec TER-119 et anti-glycophorine A ont montré que ces deux molécules sont fortement associées ensemble à la membrane cellulaire des cellules érythroïdes (Kina et *al.*, 2000). Chez l'humain, les molécules de glycophorines (GP) sont considérées comme des marqueurs spécifiques des cellules érythroïdes (Anstee et Edwards, 1982), mais les GP murines ne sont pas aussi bien caractérisées et les anticorps murins contre ces molécules ne sont pas disponibles commercialement. La séquence consensus de EKLF (boîte CACCC) est retrouvée dans le promoteur des GP A, B, C et E. Gregory et *al.* (1996) ont montré que EKLF stimule la transcription de la GPB, mais l'effet de EKLF sur la transcription des autres GP n'est pas documenté. Il n'est pas rare que des gènes associés dans leurs fonctions soient régulés par les mêmes facteurs de transcription, comme par exemple GATA-1 qui régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'érythropoïèse. Il n'est donc pas exclu que EKLF puisse avoir un effet sur ces autres GP, d'ailleurs EKLF est exprimé avant GPA dans la différenciation des cellules érythroïdes, mais GPA est exprimé avant le

gène β de la globine β (Ziegler et *al.*, 1999). Comme EKLf est impliqué dans la régulation de la transcription de molécules membranaires (au moins pour GPB), il est possible qu'en son absence la membrane soit déstabilisée empêchant TER-119 de se retrouver à la membrane. On pourrait ainsi penser que l'expression de la GPA et/ou de l'antigène TER-119 est régulée par EKLf. L'effet du facteur de transcription EKLf sur la régulation transcriptionnelle de la GPA pourrait être testé en fusionnant le promoteur de la GPA à un gène rapporteur comme la luciférase. Cependant comme l'identité du gène codant pour l'antigène TER-119 est inconnue, l'effet direct de EKLf sur l'expression de ce gène ne peut pas être testé à l'heure actuelle.

4.2 EKLf est exprimé dans les progéniteurs CD31^{high}Ly6C⁻

Nous avons observé que EKLf est exprimé dans des progéniteurs CD31^{high}Ly6C⁻ de foies fœtaux murins 14,5 dpc. Qian et *al.* (2002) ont fait l'observation que EKLf est exprimé dans les progéniteurs CD34⁺ isolés à partir de la moelle osseuse humaine. Par contre, Ziegler et *al.* (1999) n'ont pas observé d'expression pour EKLf dans les progéniteurs CD34⁺ de sang de cordon ombilical humain. Cette différence peut s'expliquer par l'origine différente des cellules isolées et par les méthodes de détection de l'expression utilisées.

Les résultats obtenus à partir des expériences de RT-PCR sur 10 cellules, montrent que ce ne sont pas toutes les cellules CD31^{high}Ly6C⁻ qui expriment EKLf. Lors de l'essai clonogénique, nous avons observé que certaines cellules de type progéniteur donne naissance à des colonies de type CFU-GM. Les progéniteurs CFU-GM sont déjà commis aux lignées de granulocytes et de macrophages. L'expression de EKLf étant restreinte à la lignée des cellules érythroïdes, il serait donc normal que ce ne soient pas toutes les cellules testées qui expriment le facteur de transcription EKLf.

4.3 Expression basale des gènes adultes de la globine β dans les cellules enrichies en progéniteurs

Nous avons observé que les gènes adultes de la globine β humaine sont peu exprimés dans les cellules de type progéniteur du foie fœtal 14,5 dpc de souris *ln2*. Seulement 1 cellule sur 10 exprime un transcrite pour les gènes adultes β humains contre 13/26 dans les progéniteurs de la moelle osseuse (Bottardi et al., 2003, voir l'annexe I). Pour les transcrits de souris, c'est 2 cellules sur 10 comparativement à 18/25 dans les progéniteurs de la moelle osseuse (Bottardi et al., 2003, voir l'annexe I). Il est possible que ces différences s'expliquent par le faible nombre de cellules analysées ou par une différence au niveau de la population $CD31^{\text{high}}Ly6C^-$ présente dans le foie fœtal. Par exemple, le nombre de CFU-GM formées en méthyl-cellulose est de 21% pour les progéniteurs de la moelle osseuse (Bottardi et al., 2003, voir l'annexe I) et de 45% pour les populations de cellules du foie fœtal 14,5 dpc enrichies en progéniteurs. Le plus grand pourcentage de cellules commises aux lignées de granulocytes et de macrophages, pourrait être en partie responsable de la diminution observée quant aux nombres de cellules exprimant un transcrite pour les gènes β adultes. De plus, l'environnement des cellules de la moelle osseuse n'est pas identique à celui du foie fœtal. Les cellules de la moelle osseuse sont dans un environnement plus diversifié en terme de cellules que le foie fœtal 14,5 dpc qui contient de 85 à 90% de cellules érythroïdes, il ne reste que 10 à 15% pour d'autres types de cellules. L'environnement différent des cellules influence différemment l'hématopoïèse et il est possible que l'expression basale des gènes soit modifiée en réponse aux différents signaux externes.

L'expression des gènes adultes humains et murins dans la population de cellules enrichie en progéniteurs *ln2* EKLf *knock-out* a montré que pour les gènes adultes humains, il n'y a pas de différence entre les cellules *wild-type* et les cellules *knock-out*. Cependant, pour l'expression de la globine murine, les cellules de type progéniteur EKLf *knock-out* semblent exprimer plus de transcrits que les cellules de type progéniteur *wild-type* (figure 7A et B, page 40). Le nombre de cellules analysées étant faible, il est difficile de conclure, mais ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que chez la souris, il y a un seul changement d'expression de la chaîne β d'embryonnaire à

foetal/adulte, tandis que chez l'humain il y en a un supplémentaire de foetal à adulte. Chen et Bieker (2001) ont montré que EKLF peut interagir avec mSin3A et HDAC1, des co-répresseurs transcriptionnels. Il est possible que EKLF exerce un rôle de répression sur les gènes β -mineur et/ou β -majeur dans les cellules de type progéniteur, rôle qu'il ne jouerait pas pour le gène β humain.

4.4 Différences entre les cellules de la moelle osseuse et des cellules du foie foetal

Nous avons observé que le patron d'acétylation des histones n'est pas conservé pour toutes les régions de chromatine étudiées selon que les cellules proviennent de la moelle osseuse ou du foie foetal 14,5 dpc. Un premier facteur qui a certainement une grande influence sur les résultats obtenus entre les cellules en provenance des deux tissus est la longueur des fragments utilisés pour faire les ChIPs. En effet, dans cette étude, nous avons privilégié l'utilisation de fragments de 800 pb afin d'examiner l'effet de EKLF sur des domaines plus étendus de chromatine, comparativement à notre étude utilisant la moelle osseuse où nous avons privilégié des fragments d'environ 500 pb (Bottardi et al., 2003). En d'autres mots, nous voulions voir l'effet sur de plus grandes régions de chromatine afin de pouvoir établir un patron général des modifications des histones. Nous aurions pu accomplir la même étude avec des fragments plus petits (500 pb, mono- et di-nucléosome) en utilisant plusieurs paires d'amorces nous permettant de couvrir une région plus vaste. Étant donné la difficulté à obtenir en grande quantité du matériel *knock-out*, en particulier pour les cellules enrichies en progéniteurs, nous avons privilégié l'étude de plus grandes régions plutôt que de les diviser en plusieurs. Ces différences auraient pu être validées ou infirmées en effectuant des ChIP sur du matériel provenant de la moelle osseuse en utilisant des fragments de chromatine de plus grandes tailles (800pb).

Un deuxième facteur pouvant expliquer les divergences entre les résultats est l'environnement dans lequel se trouvent les cellules étudiées dans leur tissu d'origine. Par exemple le foie foetal 14,5 dpc est principalement un organe érythropoïétique (85 à 90% des cellules étant de type érythroïde), tandis que la moelle osseuse est un site hématopoïétique et les cellules érythroïdes y sont moins abondantes (25 à 30%). Les

cellules des deux tissus sont donc soumises à différents stimuli qui proviennent de leur environnement respectif. De plus, dans le foie fœtal 14,5dpc, il y a des facteurs de transcription spécifiques à ce stade du développement qui agissent sur la régulation du locus de la globine β . Un exemple est le facteur de transcription FKLf (*embryonic/fetal β -like globin gene-activating Krüppel-like factor*) dont l'expression dans la moelle osseuse d'adulte humain est très faible (Asano et al., 1999). Il a été démontré que FKLf peut activer les promoteurs des gènes ϵ et δ , et, avec une efficacité réduite, le promoteur du gène β (Asano et al., 1999). Il est difficile de prédire quelles influences peuvent avoir ces liaisons sur la conformation de la chromatine du locus *in vivo*. De plus, d'autres facteurs encore inconnus seront possiblement identifiés dans le futur. La formation et la composition d'un complexe protéique peuvent être influencées selon l'absence ou la présence d'un seul facteur. Finalement, des changements du code des histones au cours du développement supporteraient le rôle fonctionnel des modifications des histones.

Un troisième facteur pouvant être responsable des différences observées entre les résultats obtenus avec les cellules provenant de la moelle osseuse et ceux obtenus avec les cellules provenant du foie fœtal, vient du fait que les populations de cellules utilisées ne sont pas complètement identiques. D'une part, les pourcentages des différentes CFC formées en méthyl-cellulose varient entre les deux populations de cellules CD31^{high}Ly6C⁻. De plus, la proportion de cellules CD31^{high}Ly6C⁻ exprimant les transcrits pour le gène β adulte humain est également différente. D'autre part, les cellules érythroïdes utilisées ne sont peut-être pas identiques. Pour obtenir les cellules érythroïdes de la moelle osseuse, nous les avons triées selon leur réactivité à l'anticorps TER-119. Étant donné le haut pourcentage de cellules TER-119 (85-90%) et l'absence de différence entre les cellules TER-119 triées et les cellules du foie complet pour l'acétylation des histones H3 dans la région du promoteur β (résultat non-montré), nous avons utilisé le foie complet comme source de cellules érythroïdes. De plus, le marqueur TER-119 marque les cellules du stade proérythroblaste jusqu'au stade d'érythrocyte. Il est possible que le pourcentage des différentes cellules de type

érythroïde en maturation varie entre les cellules TER-119 de la moelle osseuse et celles du foie fœtal.

Même si des différences ont été relevées entre les populations de cellules ayant servi à l'étude précédente (Bottardi et *al.*, 2003) et celles servant à la présente étude, nous avons établi les caractéristiques de la population utilisée pour investiguer l'influence de EKLF sur la structure de la chromatine du locus humain de la globine β .

4.5 Influence de EKLF sur l'acétylation des histones

Des études effectuées avec des cellules MEL (*mouse erythroleukemia*) en culture dans lesquelles le chromosome 11 humain avec ou sans délétion au niveau du locus de la globine a été incorporé, ont montré une corrélation entre le patron d'acétylation des histones H3 et H4 avec le patron de sensibilité à la DNase I (Schubeler et *al.*, 2000). Litt et *al.* (2001b) ont également observé cette corrélation entre l'acétylation de la chromatine et le patron de DNase I dans le locus de la globine β du poulet. Cependant, l'inverse a également été démontré dans des études sur le locus murin (Bulger et *al.*, 2003) et le locus humain (Bottardi et *al.*, 2003) de la globine β . Les résultats que nous avons obtenus avec les foies fœtaux de souris *ln2* et *ln2* EKLF *knock-out* pour les histones H3 dans les régions du HS3 et des promoteurs γ et β ainsi que pour les histones H4 de la région des promoteurs γ et β montre une diminution de l'acétylation en absence de EKLF ($\alpha \leq 1$). Wijgerde et *al.* (1996) ont observé dans les foies fœtaux 13,5 dpc de souris transgéniques ayant le locus humain complet de la globine (lignée analogue à *ln2*) et étant *knock-out* pour EKLF que le promoteur β perd sa sensibilité à la DNase I, le HS3 perd la moitié de la sensibilité, alors que le promoteur γ devient plus sensible. Ces résultats suggèrent une corrélation entre la perte de la sensibilité à la DNase I et la diminution de l'acétylation des histones dans la région du promoteur β . De plus, la diminution d'acétylation des histones H3 du HS3 est 2,4 fois moins importante que celle observée au promoteur β , ce qui pourrait coïncider avec la perte partielle de la sensibilité à la DNase I. Nous avons également observé qu'il n'y a pas de diminution d'acétylation des histones H4 au niveau de la région du HS3, mais comme la diminution de la sensibilité à la DNase I du HS3 n'est que partielle, il est possible qu'un certain niveau

d'acétylation soit maintenu. Pour ce qui est du promoteur γ , Wijgerde et *al.* (1996) ont montré un gain de sensibilité à la DNase I au jour 13,5 en absence du facteur de transcription EKLf. Ils ont aussi montré que l'expression de γ est augmentée, et qu'elle diminue ensuite au jour 15 après le coït. Comme les données concernant la sensibilité à la DNase I près du jour 14,5 ne sont pas disponibles, nous ne pouvons pas conclure sur la corrélation de la baisse d'acétylation des histones et la sensibilité à la DNase I pour le promoteur γ . Afin de déterminer s'il y a corrélation, la sensibilité à la DNase I du promoteur γ dans les cellules du foie fœtal 14,5 dpc pourrait être testée. Sur ce sujet, nous pouvons conclure que la perte de sensibilité à la DNase I au promoteur β semble coïncider avec une diminution d'acétylation des histones H3 et H4. La perte de la moitié de la sensibilité à la DNase I du HS3 semble coïncider avec une diminution de moitié de l'acétylation des histones H3 et un maintien de l'acétylation des histones H4.

Nos résultats semblent indiquer que dans les cellules érythroïdes le niveau d'acétylation des histones H3 est légèrement plus élevé que celui des histones H4. Schubeler et collègues (2000) ont fait la même observation. Nous avons également observé que les histones de la région du promoteur γ sont acétylées à un niveau comparable à celui de la région du promoteur β dans les cellules érythroïdes. Schubeler et *al.* (2000) ont obtenu le même résultat à l'exception d'une de leur lignée de cellules qui exprime un niveau de β plus élevé et pour lequel ils ont observé que le promoteur β était plus enrichi en acétylation sur les histones du promoteur β comparativement au promoteur γ . L'équipe de Schubeler (2000) ne mentionne pas la longueur des fragments de chromatine qu'ils ont utilisés pour le ChIP dans leur étude. Vu la concordance de nos résultats avec les leurs, on pourrait croire qu'il s'agit de fragments semblables.

Chez le poulet, Litt et *al.* (2001b) ont montré que les éléments régulateurs et les sites hypersensibles sont déjà acétylés dans des lignées cellulaires correspondant aux stades BFU-E et CFU-E. Nous avons observé que les histones des régions du HS3 et du promoteur γ sont acétylées dans la population de cellules enrichie en progéniteurs, mais que le promoteur β n'est pas acétylé à ce stade. Ce qui indique que ce ne sont pas tous les éléments régulateurs du locus humain qui sont acétylés dans les progéniteurs.

Cependant, la population de cellules enrichie en progéniteurs que nous avons utilisée contient également des cellules moins matures (CFU-GEMM) et commises à d'autres lignées (CFU-GM).

Pour le locus murin, Forsberg *et al.* (2000) ont montré que les promoteurs des gènes fœtaux/adultes β -majeur et β -mineur sont acétylés à un niveau plus élevé que les promoteurs des gènes embryonnaires $\epsilon\gamma$ et $\beta H1$. Nous n'avons pas observé de différences entre l'acétylation dans la région des promoteurs fœtal γ et adulte β à ce stade de développement des fœtus. Ce résultat semble indiquer que la régulation se fait plutôt au niveau des facteurs de transcription ou par la présence d'une autre modification des histones comme par exemple la méthylation.

Les expériences effectuées avec les cellules érythroïdes nous ont montré que pour la région du HS3, les régions des promoteurs γ et β et les régions codantes des gènes γ et β , l'absence de EKLF provoque une baisse l'acétylation des histones H3 pour toutes ces régions, il en est également ainsi pour les histones H4, sauf dans la région du HS3. Ce résultat semble montrer une dysfonction des cellules EKLF *knock-out* à acétyler les histones du locus. On sait qu'en absence de EKLF dans les cellules érythroïdes, le gène β n'est pas transcrit. On aurait donc pu s'attendre à une baisse d'acétylation localisée au gène β , pourtant le gène γ est également touché (quoiqu'à un niveau inférieur). Il semble donc que l'absence d'EKLF influence directement ou indirectement l'acétylation du locus de la globine β .

L'analyse de l'acétylation de la région du promoteur β et de la région codante du gène β nous révèle que lorsqu'on est en absence de EKLF dans les cellules érythroïdes, on retrouve le niveau d'acétylation des histones comparable à celui observé dans la population enrichie en progéniteurs. De plus, l'absence de EKLF dans les cellules de type progéniteurs n'affecte pas le niveau basal d'acétylation des histones de la région du promoteur, mais le niveau d'acétylation des histones H3 de la région codante diminue encore. Pourtant, le niveau basal de transcription de β (figure 7, page 40) est maintenu dans les progéniteurs EKLF *knock-out*.

4.6 EKLF dans les cellules érythroïdes primitives

EKLF est exprimé dès 7,5 dpc dans les embryons de souris (Southwood et *al.*, 1996). Pourtant son rôle dans la régulation du locus de la globine β a été établi comme étant l'activation de la transcription des gènes adultes. Dans cette étude, nous avons investigué quel rôle EKLF pourrait jouer dans les cellules érythroïdes primitives en étudiant l'acétylation des histones de la région du HS3 et de celle du promoteur β . Tout d'abord, l'acétylation de la région du HS3 semble requérir la présence de EKLF puisqu'en son absence l'enrichissement des histones acétylées diminue considérablement. Puis, nous avons observé que même si l'enrichissement en acétylation des histones H4 de la région du promoteur est faible dans les cellules érythroïdes primitives, la présence de EKLF est requise pour que cette marque soit présente. EKLF semble donc être un facteur influençant le niveau d'acétylation des histones du locus de la globine, et ce dès l'érythropoïèse primitive.

4.7 Influence de EKLF sur la di-méthylation

Comme EKLF semble avoir un effet général sur l'acétylation du locus, nous avons vérifié la di-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4). La di-méthylation de la H3K4 est reliée à la chromatine active (Strahl et *al.*, 1999). La di-méthylation de H3K4 de la région du promoteur β dans les cellules érythroïdes est 1,5 fois plus importante que celle de la région du promoteur γ . De plus, cette marque est déjà présente dans les progéniteurs et elle est dépendante de la présence de EKLF. Nous avons également observé qu'à la région codante du gène β , il y a plus d'histones di-méthylées dans la population de cellules enrichie en progéniteurs que dans les cellules érythroïdes *wild-type*. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans les régions de transcription active, un troisième groupement méthyle est ajouté à la lysine 4 (Santos Rosa et *al.*, 2002), conséquemment nous observons moins d'histones di-méthylées dans ces régions. De plus, l'absence de EKLF provoque une diminution de moitié de la di-méthylation de H3K4 de la région codante dans les cellules érythroïdes et les cellules de type progéniteur. Pourtant, Santos Rosa et *al.* (2002) ont montré que la di-méthylation

marquerait les gènes potentiellement actifs, et que l'activité du gène serait plutôt reflétée par la tri-méthylation de H3K4. Dans les cellules enrichies en progéniteurs, la diminution de méthylation s'explique difficilement puisque nous avons observé le même niveau d'expression du gène β en absence et en présence de EKLF. Ces résultats suggèrent que les cellules EKLF ont une dysfonction au niveau des modifications des histones.

4.8 Rôle de EKLF dans la structure de la chromatine

Dans ce travail, nous avons observé que l'absence de EKLF dans les cellules érythroïdes définitives influence l'acétylation globale du locus aux régions examinées, ce qui suggère que EKLF influence de façon directe ou indirecte l'acétylation de la chromatine.

L'effet direct de EKLF pourrait se faire via le recrutement d'acétylases d'histones. Les acétylases pouvant être recrutées sont p300 et CBP (Zhang et Bieker, 1998). Donc, EKLF pourrait recruter p300/CBP, au promoteur β et au HS3, résultant en une acétylation des histones de ces régions. Ensuite, EKLF pourrait recruter le complexe de remodelage SWI/SNF et ainsi permettre la décondensation de la chromatine du locus, rendant le promoteur β dans un état compétant pour la transcription. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) pourraient être effectuées afin d'observer s'il y a un changement dans le recrutement de SWI/SNF dans les cellules déficientes pour EKLF. Des ChIP pourraient également être effectués contre les acétylases p300 et/ou CBP pour étudier la distribution de ces enzymes dans le locus. Ces expériences seraient informatives des processus impliqués dans l'activation de la chromatine du locus.

L'effet indirect de EKLF sur l'acétylation de la chromatine pourrait être causé par l'absence de transcription. En effet, vers le jour 15 après le coït, dans les embryons EKLF *knock-out*, il n'y a plus de transcription des gènes du locus. Cet arrêt d'activité transcriptionnelle pourrait entraîner une déacétylation globale du locus. Cette hypothèse pourrait être testée par le traitement des cellules érythroïdes définitive *wild-type* avec des

inhibiteurs de la transcription comme l' α -amanitine (inhibition irréversible) ou le 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl-benzimidazole (DRB) (inhibition réversible) (Custodio et al., 1999).

De plus les résultats obtenus dans les cellules érythroïdes primitives semblent soutenir l'observation que EKLF est actif dans ces cellules et qu'il est requis pour l'activité du HS3 (Tewari et al., 1998). En effet, nous avons observé que l'acétylation des histones diminue en absence de EKLF. Tout comme dans les cellules érythroïdes définitives, EKLF pourrait recruter p300/CBP au HS3, permettant l'acétylation des nucléosomes environnants, puis le recrutement de SWI/SNF permettrait le remodelage de la chromatine du site. Une fois de plus, l'effet de EKLF pourrait également être indirect. Par exemple, si EKLF est impliqué dans la formation de l'holo-complexe, son absence pourrait perturber la stabilité du complexe. En effet, il est connu que EKLF peut interagir avec GATA-1 (revu par Cantor et Orkin, 2002) et cette interaction pourrait être importante dans l'établissement d'un LCR actif. De plus, GATA-1 peut lui aussi interagir avec une acétylase d'histone. Il serait possible que l'absence de EKLF perturbe le recrutement de GATA-1 et ainsi entraîne une moins bonne acétylation du locus. Des expériences utilisant les cellules érythroïdes primitives des embryons de souris GATA-1 *knock-out* transgéniques pour le locus humain de la globine β pourrait être effectuées pour identifier la contribution de GATA-1 dans l'acétylation du locus dans ce modèle d'étude.

Nous avons observé que EKLF semble être exprimé dans les cellules de type progéniteur que nous avons isolées des foies fœtaux murins. Cependant, les histones de la région du gène β ne sont pas hyperacétylées dans ces cellules. L'absence de EKLF dans ces cellules n'a pas d'effet, du moins dans la région du gène β . Il semble donc que EKLF ne joue pas un rôle dans la potentialisation de la chromatine dans cette région. Toutefois, nous avons observé une hyperacétylation au niveau de la région du HS3 dans la population de cellules enrichie en progéniteurs *wild-type*, et comme nous n'avons pas vérifié l'enrichissement dans ces cellules en absence de EKLF, nous ne pouvons pas exclure qu'il est important pour l'établissement de cette marque.

Nous avons identifié une région (le HS3) où les histones H3 sont plus acétylées et une région (la partie codante du gène β) où les H3K4 sont plus di-méthylées dans la population de cellules enrichie en progéniteur que dans les cellules plus matures. Ces marques pourraient être importantes pour la potentialisation du locus des cellules progéniteurs avant leur différenciation. En fait, c'est probablement l'ensemble des modifications présentes qui constituent un code pour la potentialisation du locus. Il pourrait être intéressant de poursuivre la caractérisation des histones en regardant les autres modifications comme par exemple la distribution des histones H3 méthylées sur la lysine 9 ou bien encore de vérifier la distribution de la protéine d'hétérochromatine HP1. D'ailleurs la formation d'une hétérochromatine facultative semble être un processus important dans la régulation des gènes et elle pourrait être différente entre les espèces (Gilbert et al., 2003).

En conclusions, nos résultats semblent supporter un rôle de EKLF dans la formation d'une chromatine active dans les cellules érythroïdes primitives et définitives. Cependant, la façon dont cette chromatine active est établie n'a pas été élucidée.

5. Références

Anstee D.J. et Edwards P.A.W., Monoclonal antibodies to human erythrocytes, *Eur. J. Immunol.*, 12:228-32, 1982.

Armstrong J.A., Bieker J.J. et Emerson B.M., *A SWI/SNF-related chromatin remodelling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLf in vitro.* *Cell*, 95:93-104, 1998.

Asano H., Li X.S. et Stamatoyannopoulos G., *FKLF, a novel Krüppel-like factor activates human embryonic and fetal β -like globin genes,* *Molecular and Cellular Biology*, 19(5):3571-9, 1999.

Bannister A.J., Zegerman P., Partridge J.F., Miska E.A., Thomas J.O., Allshire R.C. et Kouzarides T., *Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain,* *Nature*, 410(6824):120-4, 2001.

Bernstein B.E., Humphrey E.L., Erlich R.L., Schneider R., Bouman P., Liu J.S., Kouzarides T. et Schreiber S.L., *Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes,* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(13):8695-8700, 2002.

Bottardi S., Aumont A., Grosveld F. et Milot E., *Developmental stage-specific epigenetic control of human beta globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation,* *Blood*, 102(12):3989-97, 2003.

Blobel G.A., *CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription,* *Blood*, 95(3):745-755, 2000.

Blobel G.A., Nakajima T., Eckner R., Montminy M. et Orkin S.H., *CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation,* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:2061-6, 1998.

Brown R.C., Pattison S., van Ree J., Coghill E., Perkins A., Jane S.M. et Cunningham J.M., *Distinct domains of erythroid Kruppel-like factor modulate chromatin remodeling and transactivation at the endogenous beta-globin gene promoter. Mol Cell Biol*, 22(1):161-70, 2002.

Bulger M., Schubeler D., Bender M.A., Hamilton J., Farrell C.M., Hardison R.C., Gröudine M., *A complex chromatin landscape revealed by patterns of nuclease sensitivity and histone modification within the mouse beta-globin locus, Mol Cell Biol*, 23(15):5234-44, 2003.

Bungert J., Dave U., Lim K.C., Lieuw K.H., Shavit J.A., Liu Q. et Engel J.D., *Synergistic regulation of human beta-globin gene switching by locus control region elements HS3 and HS4, Genes Dev*, 9(24):3083-96, 1995.

Bungert J., Tanimoto K., Patel S., Liu Q., Fear M. et Engel J.D., *Hypersensitive site 2 specifies a unique function within the human beta-globin locus control region to stimulate globin gene transcription, Mol Cell Biol*, 19(4):3062-72, 1999.

Cantor A.B. et Orkin S.H., *Transcriptional regulation of eruthropoiesis: an affair involving multiple partners, Oncogene*, 21:3368-76, 2002.

Cao A. et Moi P., Regulation of the globin genes, *Pediatric Research*, 51(4) :415-21, 2002.

Charpentier A., *Sang et cellules sanguines*, Edition Nathan, Paris, 1996.

Chen X. et Bieker J.J., *Unanticipated repression function linked to erythroid Kruppel-like factor, Mol Cell Biol*, 21:3118-3125, 2001.

Cheng X., Reginato M.J., Andrews N.C. et Lazar M.A., *The transcriptional integrator CREB-binding protein mediates positive cross talk between nuclear hormone receptor and the hematopoietic bZip protein p45/NF-E2*, *Mol. Cell. Biol.*, 1:1407-16, 1997.

Cho H., Orphanides G., Sun X., Yang X.J., Ogryzko V., Lees E., Nakatani Y. et Reinberg D., *A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure*, *Mol Cell Biol.*, 18(9):5355-63, 1998.

Custodio N., Carmo-Fonseca M., Geraghty F., Pereira H.S., Grosveld F. et Antoniou M., *Inefficient processing impairs release of RNA from the site of transcription*, *EMBO Journal*, 18(10):2855-66, 1999.

Czermin B., Schotta G., Hulsmann B.B., Brehm A., Becker P.B., Reuter G. et Imhof A., *Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in Drosophila*, *EMBO J.*, 2(10):915-9, 2001.

David G., Alland L., Hong S.H., Wong C.W., DePinho R.A. et Dejean A., *Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein*, *Oncogene*, 16(19):2549-56, 1998.

Dhalluin C., Carlson J.E., Zeng L., He C., Aggarwal A.K. et Zhou M.M., *Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain*, *Nature*, 399(6735):491-6, 1999.

Fan H.Y., He X., Kingston R.E. et Narlikar G.J., *Dinstinct strategies to make nucleosomal DNA accessible*, *Molecular Cell*, 11:1311-1322, 2003.

Friend C., Scher W., Holland J.G. et Sako T., *Hemoglobin synthesis in murine virus-stimulated leukemic cells in vitro: Stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 68:378-382, 1971.

Fujiwara Y., Browne C.P., Cunniff K., Goff S.C. et Orkin S.H., *Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93:12355-8, 1996.

Fuks F., Burgers W.A., Godin N., Kasai M. et Kouzarides T., *Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription*, *EMBO J.*, 20(10):2536-44, 2001.

Gilbert N., Boyle S., Sutherland H., de Las Heras J., Allan J., Jenuwein T., Bickmore W.A., *Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1*, *EMBO Journal*, 22(20):5540-50, 2003.

Gillemans N., Tewari R., Lindeboom F., Rottier R., de Wit T., Wijgerde M., Grosveld F. et Philipsen S., *Altered DNA-binding specificity mutants of EKLF and Sp1 show that EKLF is an activator of the β -globin locus control region in vivo*, *Genes and Development*, 12:2863-2873, 1998.

Gregory R.C., Taxman D.J., Seshasayee D., Kensinger M.H., Bieker J.J. et Wojchowski D.M., *Functional interaction of GATA1 with erythroid Kruppel-like factor and Sp1 at defined erythroid promoters*, *Blood*, 87(5):1793-801, 1996.

Gribnau J., Diderich K., Pruzina S., Calzolari R. et Fraser P., *Intergenic transcription and developmental remodeling of chromatin subdomains in the human beta-globin locus*, *Mol Cell*, 5(2):377-86, 2000.

Gu W. et Roeder R.G., *Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain*, *Cell*, 90(4):595-606, 1997.

Hassan A.H., Prochasson P., Neely K.E., Galasinski S.C., Chandy M., Carrozza M.J. et Workman J.L., *Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes*, *Cell*, 111(3):369-79, 2002.

Hassig C.A., Fleischer T.C., Billin A.N., Schreiber S.L. et Ayer D.E., *Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A*, *Cell*, 89(3):341-7, 1997.

Ho P.J. et Thein S.L., *Gene regulation and deregulation: a β globin perspective*, *Blood Reviews*, 14:78-93, 2000.

Hu M. Krause D., Greaves M., Sharkis S., Dexter M., Heyworth C. et Enver T., *Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system*, *Genes and Dev.*, 11:774-85, 1997.

Hung H.L., Kim A.Y., Hong W., Rakowski C. et Blobel G.A., *Stimulation of NF-E2 DNA binding by CREB-binding protein (CBP)-mediated acetylation*, *The Journal of Biological Chemistry*, 276(14):10715-21, 2001.

Jackson D.A., McDowell J.C. et Dean A., *β -Globin locus control region HS2 and HS3 interact structurally and functionally*, *Nucleic Acids Research*, 31(4):1180-1190, 2003.

Jane S.M., Nienhuis A.W. et Cunningham J.M., *Hemoglobin switching in man and chicken is mediated by a heteromeric complex between the ubiquitous transcription factor CP2 and a developmentally specific protein*, *EMBO J.*, 14(4):854, 1995.

Jaskelioff M. et Peterson C.L., *Chromatin and transcription: histones continue to make their marks*, *Nature Cell Biology*, 5:395-4, 2003.

Kadam S., McAlpine G., Phelan M.L., Kingston R.E., Jones K.A. et Emerson B.M., *Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits*, *Genes and Development*, 14:2441-2451, 2000.

Kiekhäfer C.M., Grass J.A., Johnson K.D., Boyer M.E. et Bresnick E.H., *Hematopoietic-specific activators establish an overlapping pattern of histone acetylation and methylation within a mammalian chromatin domain, Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22):14309-14, 2002.

Kina T., Ikuta K., Takayama, Wada K., Majumdar A.S., Weissman I.L. et Katsura Y, *The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage, British Journal of Haematology*, 109:280-287, 2000.

Kotkow K.J. et Orkin S.H., *Dependence of globin gene expression in mouse erythroleukemia cells on the NF-E2 heterodimer, Molecular and Cellular Biology*, 15(8):4640-7, 1995.

Lee C.-H., Murphy M.R., Lee J.-S. et Chung J.H., *Targeting a SWI/SNF-related chromatin remodeling complex to the β -globin promoter in erythroid cells, Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96(22):12311-12315, 1999.

Lee J.S., Lee C.H. et Chung J.H., *The beta-globin promoter is important for recruitment of erythroid Kruppel-like factor to the locus control region in erythroid cells, Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18):10051-5, 1999.

Levings P.P. et Bungert J., *The human β -globin locus control region A centre of attraction, Eur. Journal Biochem.*, 269:1589-99, 2002.

Li Q., Peterson K.R., Fang X. et Stamatpyannopoulos G., *Locus control region, Blood*, 100(9) :3077-86, 2002.

Li Q., Zhang M., Han H., Rohde A. et Stamatpyannopoulos G., *Evidence that DNase I hypersensitive site 5 of the human β -globin locus control region functions as a*

chromosomal insulator in transgenic mice, Nucleic Acid Research, 30(11):2484-91, 2002.

Litt M.D., Simpson M., Gaszner M., Allis C.D. et Felsenfeld G., *Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus, Science*, 293(5539):2453-5, 2001a.

Litt M.D., Simpson M., Recillas-Targa F., Prioleau M.N. et Felsenfeld G., *Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci, EMBO J.*, 20(9):2224-35, 2001b.

Lu S.-J., Rowan S., Bani M.R. et Ben-David Y., *Retroviral integration within the Fli-2 locus results in inactivation of the erythroid transcription factor NF-E2 in Friend erythroleukemias : Evidence that NF-E2 is essential for globin expression, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91 :8398-8402, 1994.

Marieb E.N., *Anatomie et physiologie humaines*, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 2^e édition, 1999.

Martinez-Balbas M.A., Bauer U.M., Nielsen S.J., Brehm A. et Kouzarides T., *Regulation of E2F1 activity by acetylation, EMBO J.*, 19(4):662-71, 2000.

McCaffrey P.G., Newsome D.A., Fibach E., Yoshida M. et Su M.S.-S., *Induction of γ -globin by histone deacetylase inhibitors, Blood*, 90(5):2075-83, 1997.

McMarrow T., Wijngaard A., Wollenschlaeger A., Corput M., Monkhorst K., Trimborn T., Fraser P., Lohuizen M., Jenuwein T., Djabali M., Philipsen S., Grosveld F., et Milot E., *Activation of the β globin locus transcription factors and chromatin modifiers, EMBO Journal*, 19(18):4986-96, 2000.

Miller I.J. et Bieker J.J., *A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins*, *Molecular and Cellular Biology*, 13(5):2776-86, 1993.

Milot E., Strouboulis J., Trimborn T., Wijgerde M., de Boer E., Langeveld A., Tan-Un K., Vergeer W., Yannoutsos N., Grosveld F., and Fraser P., *Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription*, *Cell*, 87:105-14, 1996.

Minucci S., Nervi C., Lo Coco F. et Pelicci P.G., *Histone deacetylases : a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias?*, *Oncogene*, 20:3110-15, 2001.

Miyamoto T., Iwasaki H., Reizis B., Ye M., Graf T., Weissman I.L. et Akashi K., *Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment*, *Dev. Cell.*,3(1):137-47, 2002.

Ney P.A., Sorrentino B.P., Lowrey C.H. et Nienhuis A.W., *Inducibility of the HS II enhancer depends on binding of an erythroid specific nuclear protein*, *Nucleic Acids Res.*, 18(20):6011-7, 1990.

Nuez B., Michalovich D., Bygrave A., Ploemacher R. et Grosveld F., *Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLf gene*, *Nature*, 375(6529):316-8, 1995.

Orkin S.H., *Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages*, *Nature Review Genetics*, 1:57-64, 2000.

Orkin S.H., *Transcription factors and hematopoietic development*, *Journal of Biological Chemistry*, 270(10):4955-8, 1995.

Östlund Farrants A.K., Blomquist P., Kwon H. et Wrange Ö., *Glucocorticoid receptor-glucocorticoid response element binding stimulates nucleosome disruption by the SWI/SNF complex*, *Molecular and Cellular Biology*, 17:895-905, 1997.

Palis J. et Yoder M.C., *York-sac hematopoiesis : The first blood cells of mouse and human*, *Experimental Hematology*, 29:927-36, 2001.

Palstra R.-J., Tolhuis B., Splinter E., Nijmeijer R., Grosveld F. et de Laat W., *The β -globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation*, *Nature Genetics*, 35(2):190-4, 2003.

Perkins A.C., Sharpe A.H. et Orkin S.H., *Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF*, *Nature*, 375(6529):318-22, 1995.

Perrine S.P., Ginder G.D., Faller D.V., Dover D.V., Ikuta T., Witkowska H.E., Cai S.P., Vichinsky E.P. et Olivieri N.F., *A short-term trial of butyrate to stimulate fetal-globin-gene expression in beta-globin disorders*, *New England Journal Med.*, 328: 81, 1993.

Pevny L., Lin C.-S., D'Agati V., Simon M.C., Orkin S.H. et Costantini F., *Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1*, *Development*, 121:163-72, 1995.

Qian Z., Fernald A.A., Godley L.A., Larson R.A. et Le Beau M.M., *Expression profiling of CD34⁺ hematopoietic stem/ progenitor cells reveals distinct subtypes of therapy-related acute myeloid leukemia*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23):14925-30, 2002.

Reik A., Telling A., Zitnik G., Cimborra D., Epner E. et Groudine M., *The locus control region is necessary for gene expression in the human beta-globin locus but not the maintenance of an open chromatin structure in erythroid cells*, *Mol. Cell. Biol.*, 18:5992-6000, 1998.

Roberts S.M. et Winston F., *Essential functional interactions of SAGA, a Saccharomyces cerevisiae complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes*, *Genetics*, 147(2):451-65, 1997.

Santos-Rosa H., Schneider R., Bannister A.J., Sherriff J., Bernstein B.E., Emre N.C., Schreiber S.L., Mellor J. et Kouzarides T., *Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3*, *Nature.*, 419(6905):407-11. 2002.

Schübeler D., Francastel C., Cimborra D.M., Reik A., Martin D.I. et Groudine M., *Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus*, *Genes Dev*, 14:940-950, 2000.

Shivdasani R.A. et Orkin S.H., *Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:8690-4, 1995.

Singer D., Cooper M, Maniatis G.M., Marks P.A. et Rifkind R.A., *Erythropoietic differentiation in colonies of cells transformed by Friend virus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:2668-70, 1974.

Southwood C.M., Downs K..M et Bieker J.J., *Erythroid Kruppel-like factor exhibits an early and sequentially localized pattern of expression during mammalian erythroid ontogeny*, *Dev Dyn.*, 206(3):248-59, 1996.

Speck N., Peeters M. et Dzierzak E., *Development of the vertebrate hematopoietic system*, *Mouse development*, Academic Press, 2002.

Stem Cell Technology, Colony assay of murine cells using methylcellulose-based medium, Procedure manual, version 2,0,1, 2003

Stokes T., *DNA-RNA-protein gang together in silence*, *Trends Plant Sci.*, 8(2):53-5, 2003.

Strahl B.D. et Allis C.D., *The language of covalent histone modifications*, *Nature*, 403(6765):41-5, 2000.

Strahl B.D., Ohba R., Cook R.G. et Allis C.D., *Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(26):14967-72, 1999.

Strouboulis J., Dillon N. et Grosveld F., *Developmental regulation of a complete 70-kb human β -globin locus in transgenic mice*, *Genes Dev.*, 6:1857-64, 1992.

Struhl K., *Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms*, *Genes Dev.*, 12:599-606, 1998.

Suwabe N., Takahashi S., Nakano T. et Yamamoto M., *GATA-1 regulates growth and differentiation of definitive erythroid lineage cells during in vitro ES cell differentiation*, *Blood*, 92(11) :4108-18, 1998.

Tewari R., Gillemans N., Wijgerde M., Nuez B., von Lindern M. et Grosveld F., Philipsen S., *Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) is active in primitive and definitive erythroid cells and is required for the function of 5'HS3 of the beta-globin locus control region*, *EMBO J.*, 17(8):2334-41, 1998.

Tiwari S., Italiano J.E., Barral D.C., Mules E.H., Novak E.K., Swank R.T., Seabra M.C. et Shivdasani R.A., *A role for Rab27b in NF-E2-dependent pathways of platelet formation*, *Blood*, 102(12):1970-9, 2003.

Tuan D., Kong S. et Hu K., *Transcription of the hypersensitive site HS2 enhancer in erythroid cells*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(23):11219-23, 1992.

van der Loo J.C.M., Sliker W.A.T., Kieboom D. et Ploemacher R.E., *identification of hematopoietic stem cell subsets on the basis of their primitiveness using antibody ER-MP12*, *Blood*, 85(4):952-62, 1995.

Wai A.W.K., Gillemans N., Raguz-Bolognesi S., Pruzina S., Zafarana G., Meijer D., Philipsen S. et Grosveld F., *HS5 of the human β -globin control region :a developmental stage-specific border in erythroid cells*, *EMBO Journal*, 22(17):4489-4500, 2003.

Wijgerde M., Gribnau J., Trimborn T., Nuez B., Philipsen S., Grosveld F. et Fraser P., *The role of EKLF in human β -globin gene competition*, *Genes and Development*, 10:2894-2902, 1996.

Wijgerde M., Grosveld F et Fraser P., *Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo*, *Nature*, 377:209-13, 1995.

Witt O., Monkemeyer S., Ronndahl G., Erdlenbruch B., Reinhardt D., Kanbach K. et Pekrun A., *Induction of fetal hemoglobin expression by the histone deacetylase inhibitor apicidin*. *Blood*, 101(5):2001-7, 2003.

Ye M., Iwasaki H., Laiosa C.V., Stadtfeld M., Xie H., Heck S., Clausen B., Akashi K. et Graf T., *Hematopoietic stem cells expressing the myeloid lysozyme gene retain long-term, multilineage repopulation potential*, *Immunity*, 19(5):689-99, 2003.

Zhang W. et Bieker J.J., *Acetylation and modulation of erythroid Krüppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferase*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95:9855-9860, 1998.

Ziegler B.L., Muller R., Valtieri M., Lamping C.P., Thomas C.A., Gabbianelli M., Giesert C., Buhning H.J., Kanz L. et Peschle C., *Unicellular-unilineage erythropoietic*

cultures: molecular analysis of regulatory gene expression at sibling cell level, Blood, 93(10):3355-68, 1999.

Annexe I

Annexe I

Developmental stage-specific epigenetic control of human β -globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation

Stefania Bottardi, Angélique Aumont, Frank Grosveld et Eric Milot

Blood, Volume 102, Number 12, 2003

Developmental stage-specific epigenetic control of human β -globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation

Stefania Bottardi, Angélique Aumont, Frank Grosveld, and Eric Milot

To study epigenetic regulation of the human β -globin locus during hematopoiesis, we investigated patterns of histone modification and chromatin accessibility along this locus in hematopoietic progenitor cells (HPCs) derived from both humans and transgenic mice. We demonstrate that the developmentally related activation of human β -like globin genes in humans and transgenic mice HPCs is preceded by a wave of gene-specific histone H3 hyperacetylation and K4 dimethylation. In erythroid cells, expression of

β -like globin genes is associated with histone hyperacetylation along these genes and, surprisingly, with local deacetylation at active promoters. We also show that endogenous mouse β major and human β -like genes are subject to different epigenetic control mechanisms in HPCs. This difference is likely due to intrinsic properties of the human β -globin locus since, in transgenic mice, this locus is epigenetically regulated in the same manner as in human HPCs. Our results suggest that a defined pattern of histone

H3 acetylation/dimethylation is important for specific activation of human globin promoters during development in human and transgenic HPCs. We propose that this transient acetylation/dimethylation is involved in gene-specific potentiation in HPCs (ie, before extensive chromatin remodeling and transcription take place in erythroid cells). (Blood. 2003;102:3989-3997)

© 2003 by The American Society of Hematology

Introduction

Regulation of the "on/off" state of transcription in eukaryotes plays a critical role in embryogenesis and cellular differentiation.¹ This heritable process is linked to epigenetic states involving DNA methylation and changes in chromatin structure, which maintain transcriptional status throughout mitosis and DNA replication. Eukaryotic gene activation results from the interplay of *trans*-activators and/or repressors with nucleosome-modifying and/or -remodeling factors. Indeed, nucleosome organization is a key component of epigenetic regulation (Felsenfeld and Groudine² and references therein). Observations made in recent years have led to the notion that a combination of histone modifications such as acetylation, phosphorylation, and methylation generates a histone code that regulates the use of information from the genetic code.³ These posttranslational modifications of histones are important determinants in nucleosome-nucleosome and nucleosome-DNA interactions⁴ and provide precise patterns recognized and bound by specific proteins.

Epigenetic regulation of transcription appears to play an important role during hematopoiesis. For example, abnormal patterns of DNA methylation and chromatin structure are common traits in hematologic malignancies,⁵ and chromosomal translocations that change the activity of histone acetyltransferases and histone deacetylases (HDACs) are associated with several forms of leukemia.⁶ Hematopoiesis is characterized by a gradual commitment of multipotent hematopoietic progenitors to become bipotent

or unipotent progenitors and, eventually, mature blood cells. In hematopoietic progenitor cells (HPCs), lineage-specific genes are thought to be located in chromatin that is poised for activation,^{7,8} whereas the chromatin of nonexpressed genes would exist as or become increasingly restrictive. The mechanisms responsible for maintenance of an active chromatin state are poorly understood. In HPCs, basal expression of genes that eventually become highly transcribed in committed cells might play a role in transcriptional potentiation, although this may not always be a prerequisite.^{9,10}

β -Like globin gene expression is tightly regulated during development and hematopoiesis. The human β -globin locus comprises 5 developmentally regulated genes (ϵ - γ - δ - β) whose high-level expression depends on the locus control region (LCR) which, in turn, consists of 5 DNase I hypersensitive sites (HS). The LCR activates β -globin gene transcription through direct interaction with promoter regions^{11,12} and is a major determinant of chromatin structure at the locus.¹³ Mice transgenic for the human β -globin locus express the human genes in a developmentally regulated manner.^{14,15} The β -globin genes exhibit a basal level of transcription in hematopoietic progenitor cell lines¹⁶ and in HPCs of the aorta-gonad-mesonephros region,¹⁷ suggesting that in these cells the β -globin locus is characterized by an "open" chromatin structure. Low-level expression is maintained throughout erythropoiesis and only increases to full expression in differentiated

From the Guy-Bernier Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Faculty of Medicine, University of Montreal, QC, Canada; and Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands.

Submitted May 14, 2003; accepted August 4, 2003. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, August 14, 2003; DOI 10.1182/blood-2003-05-1540.

Supported by grants from the National Cancer Institute of Canada (Terry Fox Foundation) and from the Canadian Cancer Research Society (E.M.). S.B. was supported by the Guy-Bernier Immuno-Oncology fellowship and E.M. is a

scholar of the Canadian Institutes of Health Research.

The online version of this article contains a data supplement.

Reprints: Eric Milot, Guy-Bernier Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, QC, H1T 2M4 Canada; [REDACTED]

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2003 by The American Society of Hematology

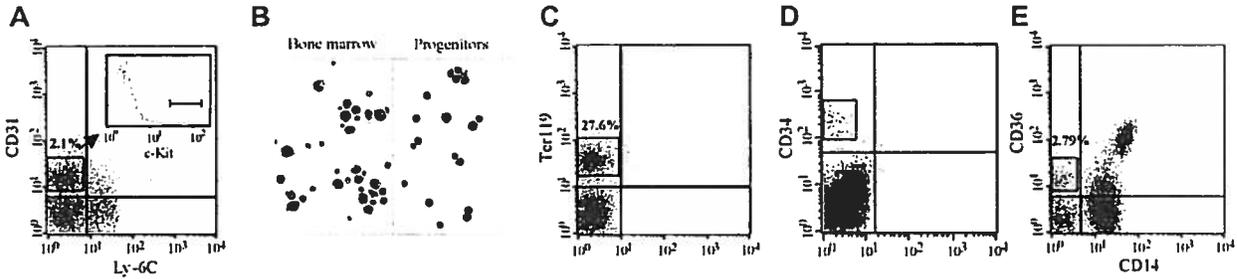


Figure 1. Flow cytometric analysis and Wright-Giemsa staining. Representative examples of sorting procedures. Log fluorescence distribution of mouse and human stained cells, showing the live gates used for flow cytometry. (A) Three-color flow cytometric analysis of adult mouse bone marrow cells stained with anti-c-Kit, CD31, and Ly-6C Abs. (B) Morphology of c-Kit⁺/CD31^{high}/Ly-6C⁻ cells (Progenitors) compared with total bone marrow cells (Bone marrow) stained with Wright-Giemsa (original magnification, $\times 40$). (C) Flow cytometric analysis and sorting window of mouse bone marrow cells stained with Ter119 Abs. (D) Sorting profile of human CD34⁺ cells. (E) Two-color flow cytometric analysis and sorting of human mononuclear bone marrow cells tracked by CD36 and CD14 Abs.

To enrich for human HPCs, CD34⁺ cells were purified from human leukapheresis samples (hereafter referred to as bone marrow cells). CD34⁺ cells represented 1% to 2% of total bone marrow²⁷ (Figure 1D) and displayed 97% purity on average (data not shown).

Human erythroid cells were purified from bone marrow selecting for CD36⁺/CD14⁻ cells. CD36 is a marker of erythroid commitment, which is present on CFU-ES, late BFU-ES,²⁸ and erythroid cells.²⁹ Since CD36 is also expressed on monocytes, these were purged using CD14 (Figure 1E), which is expressed at high levels exclusively on monocytes and macrophages. The CD36⁺/CD14⁻ population displayed 97% purity on average (data not shown).

Single-cell pattern of globin gene expression in HPCs

It has been shown that mouse β globins are expressed at basal levels in HPCs^{16,17} and that in transgenic mice LacZ under the control of the hu β promoter is expressed before erythroid commitment.³⁰ Nevertheless, it is unknown whether human β -like globin genes can be expressed in HPCs *in vivo*. To verify this, single-cell RT-PCR was performed on bone marrow HPCs of a transgenic mouse line carrying a 70-kb human β -globin locus (line 2,¹⁴ hereafter "ln2") and on human bone marrow HPCs (Figure 2A-C). For RT-PCR of single-ln2 c-Kit⁺/CD31^{high}/Ly-6C⁻ cells or human CD34⁺ cells, we used primers that coamplify adult human (β and δ) and mouse (β maj and β min) globin transcripts³¹ or fetal human (γ) and mouse embryonic (β H1) transcripts.³² In ln2 HPCs, human and mouse transcripts were distinguished by restriction

polymorphisms. In ln2 HPCs β maj, transgenic hu β (tg-hu β), as well as huy (tg-huy) genes are expressed in about half of the cells subjected to RT-PCR. Interestingly, β and γ gene expression were also detected in about 50% of adult human CD34⁺ cells (Table 2). The level of hu β gene expression in human CD34⁺ cells was evaluated by S1 nuclease protection assay and shown to be at least 100-fold lower than in human total bone marrow (data not shown). Thus, the expression of β and γ genes in HPCs is not linked to their developmental stage-specific regulation.

Chromatin accessibility of the β -globin locus during hematopoiesis

Chromatin conformational changes at the mouse and human β -globin loci during hematopoiesis were investigated by sensitivity to DNase I digestion. For this purpose, we used ln2 and human bone marrows. Nuclei were treated with different concentrations of DNase I, and purified DNA was used as template for duplex PCR. One primer set was specific for either the mouse (Figure 3A) or the human (Figure 3B) locus. The second set was specific for genes transcriptionally inactive in hematopoietic cells, namely: *ZFP37* (*ZFP23*) or *amylase 2.1y* (*amy22*) for mouse cells, and *pax6*³³ or *necdin*^{21,34} for human cells. PCR reactions were carried out within the linear range of amplification and all primer sets used in duplex PCR were tested to exclude any significant difference in amplification efficiency. Each data point depicted in Figure 3 represents the ratio of the 2 PCR products normalized to the input, DNase I-untreated sample. Curves showing a steep drop at the start indicate DNase I hypersensitivity, whereas the steepness of the curves at later points is a measure of general DNase I sensitivity. We observed that in ln2 HPCs, β maj promoter is highly sensitive to

Table 1. Clonogenic ability of c-Kit⁺/CD31^{high}/Ly-6C⁻ cells

	Bone marrow cells, %	c-Kit ⁺ /CD31 ^{high} /Ly-6C ⁻ , %
CFU-E	2	None
Mature BFU-E	13	None
Primitive BFU-E	2	21
CFU-GM	73	2
CFU-GM large	None	19
CFU-GEMM	10	5
CFU-GEMM large	None	49
Blastlike colonies	None	4
Total	100	100

Cells were seeded on methylcellulose and colonies were scored at day 14. Percentages shown are the results of 3 experiments.

CFU-E indicates erythroid colony-forming units; mature BFU-E, progenitors that give rise to colonies constituted by 3 up to 8 erythroblast clusters; primitive BFU-E, progenitors that give rise to 9 or more clusters of hemoglobinized erythroblasts; CFU-GM, granulocyte-macrophage colony-forming unit; and CFU-GEMM, granulocyte-erythrocyte-megakaryocyte-macrophage colony-forming unit.

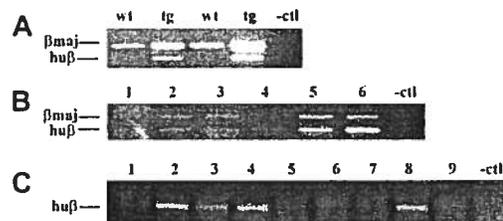


Figure 2. Single-cell RT-PCR and S1 nuclease protection assay. Qualitative analysis of single-cell RT-PCR assays. (A) Hu β /hu δ (266 bp) as well as β maj/ β min (343 bp) transcripts were amplified and distinguished after *EcoRI* digestion.³¹ wt indicates wild-type mouse total bone marrow RNA; ln2, ln2 total bone marrow RNA; and -ctl, negative control. (B) Lanes 1-6 are representative examples of single-cell RT-PCR performed on ln2 c-Kit⁺/CD31^{high}/Ly-6C⁻ cells. (C) Lanes 1-9 are representative examples of single-cell RT-PCR performed on human CD34⁺ cells.

erythroid cells. However, it is not known whether this basal level of expression corresponds to developmental-specific expression of the globin genes in erythroid cells.

The observation that the β -globin locus is uniformly hyperacetylated in chicken erythroid cells¹⁸ suggests that histone acetylation is important for the activation and/or the maintenance of an active globin locus. Additionally, active chicken globin genes are acetylated at lysine 9 of histone H3 (H3 K9), whereas histones across inactive genes are preferentially H3 K9-methylated.¹⁹ The mouse β major (β major) promoter is also acetylated in uninduced mouse erythroleukemia (MEL) cells.²⁰ Furthermore, the murine β -globin locus is differentially acetylated during development, and active genes as well as the LCR are marked by H3 and H4 acetylation.²¹ In murine MEL cells containing a human chromosome 11,²² the human β -globin locus was found to be acetylated at histones H3 and H4 throughout, whereas peaks of H3 hyperacetylation were characteristic of transcriptionally active genes. However, MEL are proerythroblast-like transformed cells, and the role of histone modifications at the human β -globin locus in vivo at early hematopoietic stages remains to be elucidated.

We have investigated the epigenetic state of the human β -globin locus in human and transgenic HPCs and compared this with major epigenetic variations associated with globin activation in erythroid cells in vivo. We demonstrate that histone H3 is hyperacetylated and K4 dimethylated at the human β (hu β) promoter in HPCs and subsequently deacetylated in erythroid cells. The human γ (hu γ) promoters are not acetylated in adult HPCs as is the case for 11.5 (days after coitus [dpc]) transgenic mouse-derived fetal liver HPCs. Our data therefore provide evidence for a transcriptional potentiation mechanism occurring at the human globin locus in HPCs.

Materials and methods

Bone marrow culture and in vitro colony assays

Mouse bone marrow was cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) with 10% characterized fetal bovine serum (FBS; HyClone, Logan, UT), 3 U/mL erythropoietin (Epo), and 300 nM trichostatin A (TSA; Sigma, St Louis, MO) or equal volume of ethanol. Cells were incubated for 8 hours at 37°C in 5% CO₂. For in vitro colony assays, cells were plated onto MethoCult M3434 medium (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Single cultures contained 50, 100, or 200 c-Kit⁺/CD31^{high}/Ly-6C⁻ cells or 5 × 10⁵ Ter119⁺ cells or 5 × 10⁴ mouse bone marrow cells. Colony types were determined and scored at day 14 by microscopy and Wright-Giemsa staining.

Cell sorting

Staining with antibodies (PharMingen, San Diego, CA; or Caltag, Burlingame, CA) was carried out on ice for 30 minutes followed by one wash in phosphate-buffered saline (PBS) 5% heat-inactivated FBS. Cells were analyzed using high-speed fluorescence-activated cell sorter (FACS) Vantage with Digitalized Vantage (DIVA) option (Becton Dickinson, San Jose, CA). For c-Kit⁺/CD31^{high}/Ly-6C⁻ sorting, cells were incubated with rat anti-Ly-6C antibodies (Abs) followed by goat antirat phycoerythrin (PE)-conjugated Abs, then biotinylated anti-CD31 Ab followed by streptavidin tricolor-conjugated Abs and anti-c-Kit fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Abs. Otherwise, cells were stained with rat anti-Ter119 Abs and goat antirat PE-conjugated Abs. Human mononuclear cells from leukapheresis of healthy donors were separated on Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and stained with mouse anti-CD36 Abs followed by rat antimouse PE-conjugated Abs and anti-CD14 FITC-conjugated Abs. Human CD34⁺ cells were stained with anti-CD34 Abs phycoerythrin-Cy5 (PC5) conjugated. The purity of the sorted populations was evaluated by postsorting analysis and Wright-Giemsa staining.

DNase I sensitivity assay

DNase I sensitivity assay was carried out as previously described.²³ About 30 000 nuclei were digested with 0 or up to 0.35 U of DNase I (Roche, Indianapolis, IN) for 30 minutes on ice. Average molecular weight of DNase I-treated samples was determined by Southern blot.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

Antibodies and ChIP kits were purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Antibodies were raised against acetylated histones H3 (K9, K14), H4 (K5, K8, K12, K16), phosphorylated histone H3 (S10), dimethylated histone H3 (K4), and nonmodified histone H3. Cross-linked chromatin was reduced in size by sonication in order to obtain fragments of 500-bp average size. ChIP assays were carried out as per manufacturer's instructions.

Duplex PCR and single-cell RT-PCR analyses

Quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis on DNase I-treated and ChIP samples was performed as previously described.²³ All primer sequences and amplicons, as well as their molecular weights, are available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article.

For single-cell reverse transcriptase-PCR (RT-PCR), single cells were deposited into 96-well plates. RT-PCR was performed using Qiagen (Valencia, CA) one-step RT-PCR kit.

S1 nuclease protection assay

RNA samples were prepared using Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD) and the assay was performed as previously described.²³

Results

Purification of hematopoietic progenitor cells and erythroid cells

Murine HPCs were purified from adult bone marrow by sorting c-Kit⁺/CD31^{high}/Ly-6C⁻ cells. These cells comprise about 2% of the nucleated population and are early hematopoietic cells without mature or late-committed properties.^{24,25} Figure 1A shows a typical 3-color flow cytometric analysis. The sorted population is 97% pure and possesses a blastlike phenotype, as revealed by Wright-Giemsa staining (Figure 1B). The hematopoietic potentiality of these cells was ascertained by in vitro colony assays. On average, of 100 colonies 54 were CFU-GEMMs (granulocyte-erythrocyte-megakaryocyte-macrophage colony-forming units), 21 were CFU-GMs (granulocyte-macrophage colony-forming units), 21 were BFU-Es (erythroid burst-forming units), and none were CFU-Es (erythroid colony-forming units). The remaining 4% were large colonies with an undifferentiated morphology (Table 1). Thus, 79% of the HPC population is composed of progenitors with multilineage potential and only 20% of the progenitors already shows unilineage commitment. Relative to total bone marrow, the HPC population displays a 95-fold enrichment in colony-forming cell (CFC) activity. This cloning efficiency is influenced by cell mortality induced by the long procedure and high-speed sorting.

Murine erythroid cells were isolated from bone marrow according to their Ter119⁺ phenotype and evaluated by colony assays. Ter119 Ab recognizes erythroid cells at different stages of maturation, from early proerythroblasts to mature erythrocytes.²⁶ As expected,²⁶ Ter119⁺ cells (Figure 1C) showed no CFC activity in colony assay. After sorting, more than 95% of the cells were Ter119⁺ (data not shown).

Table 2. Summary of one-step RT-PCR and S1 nuclease protection assays performed on ln2 bone marrow and fetal liver c-Kit⁺/CD31^{hi}/Ly-6C⁻ cells and human CD34⁺ cells

	Single-cell RT-PCR analysis				S1 assay
	β maj/ β min	hu β /hu δ	hu γ	β H1	hu β
ln2 bone marrow c-Kit ⁺ /CD31 ^{hi} /Ly-6C ⁻	18/25	13/26	15/24	3/25	ND
ln2 fetal liver c-Kit ⁺ /CD31 ^{hi} /Ly-6C ⁻	ND	ND	13/26	3/25	ND
Human bone marrow	—	ND	ND	—	100
Human CD34 ⁺	—	17/25	16/26	—	< 1

The level of human β -globin gene expression (determined by S1 nuclease protection assay) in CD34⁺ cells is relative to the expression level in human bone marrow cells. ND indicates not done; —, not applicable.

DNase I (Figure 3C), whereas the tg-hu β promoter is weakly sensitive or insensitive (Figure 3D). To evaluate the degree of DNase I sensitivity at tg-hu β promoter, a third nonhematopoietic control (the kidney-specific Tamm-Horsfall [*THP*] gene³⁵) was tested against ZFP. As shown in Figure 3E, DNase I sensitivity of *THP* and hu β promoters is comparable. This suggests that chromatin accessibility at the hu β promoter reflects the general situation for promoters of nonexpressed genes in hematopoietic cells. Mouse HS3 (mHS3) and the transgenic human HS3 (tgHS3) are both sensitive to DNase I in ln2 HPCs (Figure 3F-G). The same is also found for human HS2 (tgHS2) and HS5 (tgHS5) (Supplemental Materials). In ln2 erythroid (Ter119⁺) cells, DNase I sensitivity at the LCR and at globin promoters significantly increases, especially at tg-hu β and β maj promoters (Figure 3C-G).

DNase I sensitivity was then analyzed in human CD34⁺ and CD36⁺/CD14⁻ cells. As in ln2 HPCs, in human CD34⁺ cells the

hu β promoter is not hypersensitive to DNase I digestion (Figure 3H). In contrast, HS3 is open in human HPCs just as was observed in ln2 (Figure 3I). Both hu β and HS3 acquire a more accessible chromatin conformation in human erythroid cells (Figure 3H-I).

Taken together, these results indicate that chromatin at the human β -globin LCR is moderately accessible in both human and ln2 HPCs, whereas the hu β promoter is not; hence, chromatin accessibility along the human LCR precedes that at the hu β promoter. On the other hand, unlike its human homolog, the β maj promoter is already activated and accessible to DNase I in HPCs.

Histone covalent modifications at the β -globin locus during hematopoiesis

Patterns of histone covalent modification at the murine and human β -globin loci during hematopoiesis were assessed by ChIP assay³⁶

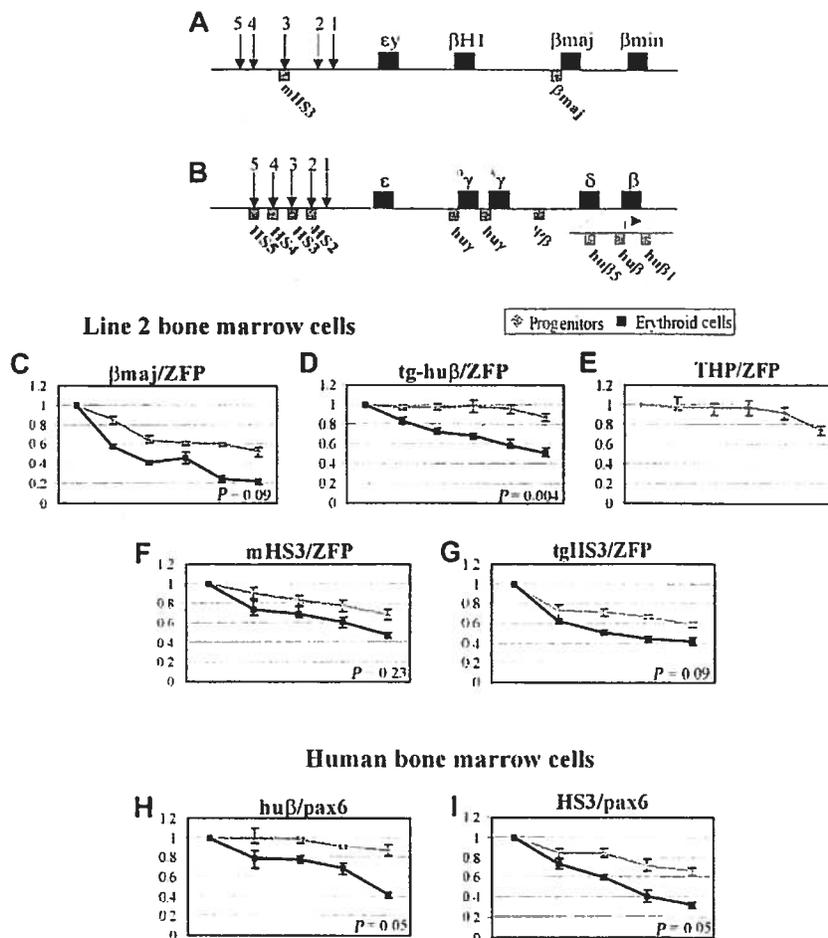


Figure 3. DNase I sensitivity assay of the β -globin locus. A map of mouse (A) and human (B) β -globin locus; genes are shown as ■ and the location of LCR HS is indicated by ↓. Amplified regions used for PCR-based DNase I and ChIP assays are indicated by □. (C-I) PCR-based DNase I analysis. Each point of the curves represents samples of comparable molecular weight (ranging from 12 kb to 0.5 kb). For β maj/ZFP and tg-hu β /ZFP, an additional DNase I-treated sample of 150-bp average size was included. The intensity of the PCR products was quantitated by Phosphorimager and plotted on graphs relative to the input (DNase I-untreated chromatin). Y-axis indicates relative amount of PCR products (globin relative to ZFP37 or pax6 products); X-axis, increasing DNase I concentration, ranging from 0 up to 0.35 U (see "Materials and methods"). Standard errors of mean (SEM) are indicated by vertical lines and are the results of at least 3 independent experiments. The *P* value was obtained using the unpaired Student *t* test. ZFP indicates ZFP37; β maj, β major promoter; tg-hu β , human β promoter in transgenic ln2; mHS3, murine HS3; tgHS3, human HS3 in transgenic ln2; hu β , human β promoter in human bone marrow; and HS3, human HS3 in human bone marrow.

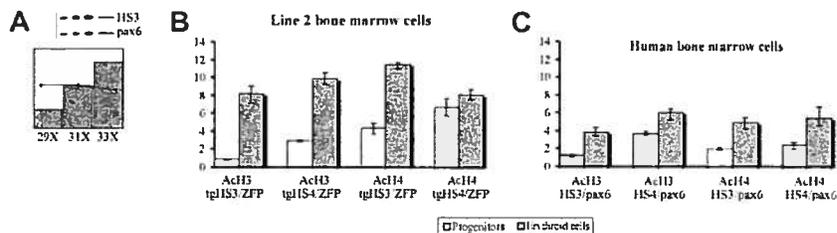


Figure 4. CHIP analysis of the human β -globin LCR in In2 and human bone marrow cells. Immunoprecipitated and unbound (input) chromatin samples were subjected to duplex PCR analysis with one primer set specific for the human globin locus LCR and a second primer set specific for ZFP37 (ZFP) or pax6 gene. All PCR reactions were performed in parallel under conditions of linear amplification. Products were quantified by Phosphorimager. The level of enrichment of globin regions relative to the control and input samples is represented by bars with their corresponding SEM deviations. A value of 1 indicates that no enrichment was detected. (A) Duplex PCR ran in linear range of amplification. The same template DNA was subject to 29, 31, or 33 cycles of PCR amplification. Bars show the total intensity of the 2 PCR products and the line indicates the globin-control ratio. In the example, HS3 and pax6 primer sets were used. (B) CHIP performed with antiacetylated histone H3 (AcH3) and H4 (AcH4) Abs. Shown is the level of acetylation of HS3 (tgHS3) and HS4 (tgHS4) in In2 HPCs and erythroid cells. Error bars indicate SEM deviations. (C) CHIP performed with anti-AcH3 and AcH4 Abs. Shown is the level of acetylation of HS3 and HS4 in human HPCs and erythroid cells. Error bars indicate SEM deviations.

using antibodies specific for acetylated histone H3 (AcH3), H4 (AcH4), dimethylated histone H3, or phosphorylated histone H3 (PhH3). ChIP material was used as a template for duplex PCR with one primer set specific for mouse or human globin locus and a second primer set specific for ZFP or amy (In2 controls) and *pax6* or *necdin* (human controls). PCR reactions were performed under conditions of linear amplification (Figure 4A). In2 as well as human controls showed no variation in histone acetylation (data not shown). To establish the relative enrichment or depletion of β -globin sequences for histone modifications, the ratio of the 2 PCR products (globin and control sequences) was determined in each immunoprecipitated sample and normalized to the input ratio. Both ZFP (Figure 4B) and amy (not shown, but same results) were used as controls for In2 cells, whereas *pax6* (Figure 4C) and *necdin* (not shown, but same results) were used as controls for human cells. All results were confirmed by 2 or 3 independent ChIP assays.

We first analyzed the level of AcH3 and AcH4 at human HS3 and HS4 in HPCs and erythroid cells derived from In2 (tgHS3 and

tgHS4) and human bone marrow (HS3 and HS4). In In2 HPCs, AcH3 level is higher than the control at tgHS3 but not at tgHS4, whereas histone H4 is acetylated at both tgHS3 and tgHS4 (Figure 4B). In mature erythroid cells AcH3 and AcH4 level increases at both sites (Figure 4B). A similar pattern of acetylation is seen in human HPCs and erythroid cells (Figure 4C).

We then examined patterns of histone modification across the β maj and hu β promoters. At the β maj promoter only H4 is significantly acetylated in HPCs; in erythroid cells AcH3 increases substantially, whereas the increase in AcH4 is much smaller (Figure 5A). In contrast to the mouse β maj promoter, the hu β promoter shows a high level of AcH3 in In2 HPCs and human HPCs, which surprisingly decreases in the case of differentiated erythroid cells (Figure 5B-C). The level of AcH4 is very similar to that of the control in HPCs as well as erythroid cells. The rather unexpected H3 hyperacetylation at the hu β promoter in HPCs and its decrease in erythroid cells appears to be mediated by intrinsic properties of the human β -globin locus since the same patterns of

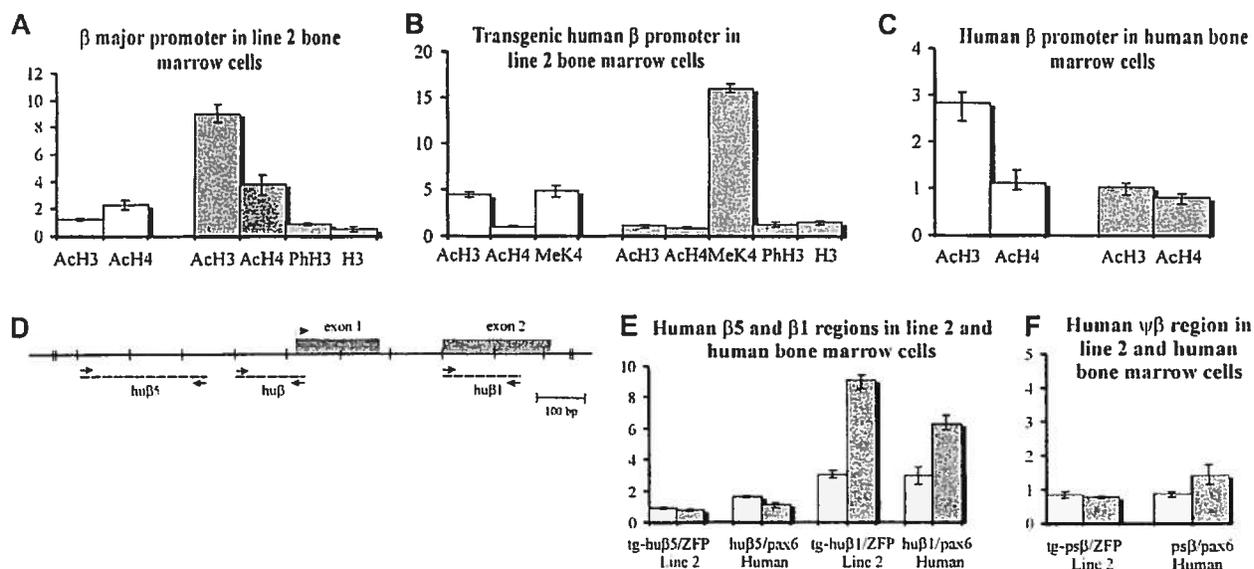


Figure 5. CHIP analysis of mouse and human β -globin genes and promoters. Immunoprecipitated samples were subjected to duplex PCR analysis with one primer set specific for human or mouse β globin regions and a second primer set specific for ZFP37 (ZFP) or pax6 gene. The level of enrichment of globin regions relative to the control regions and input samples is represented by bars, with their corresponding SEM deviations. □ indicates progenitors; and ■, erythroid cells. (A-B) CHIP analysis of In2 HPCs and erythroid cells. Either β maj or the transgenic hu β promoter was analyzed by PCR-based ChIP assay. X-axis indicates antibodies used for ChIP assays. AcH3 indicates antiacetylated H3; AcH4, antiacetylated H4; MeK4, antidimethylated H3; PhH3, antiphosphorylated H3; and H3, antinonmodified histone H3. (C) ChIP analysis of hu β promoter in human HPCs and erythroid cells. For ChIP analysis anti-AcH3 or AcH4 Abs were used. (D) Schematic representation of the hu β region; hu β exon 1 and 2 are indicated by gray boxes and amplicons are shown by dotted lines. (E) hu β 5, hu β 1 and (F) human $\psi\beta$ regions in In2 (tg-hu β 5, tg-hu β 1, and tg-ps β) and human (hu β 5, hu β 1, and ps β) HPCs and erythroid cells were investigated by PCR-based ChIP assays performed with anti-AcH3 Abs.

histone acetylation are observed in human and In2 mouse HPCs and erythroid cells.

To exclude the possibility that detectability of AcH3 is lost at the tg-hu β promoter in erythroid cells, we performed ChIP assays with anti-PhH3 and nonmodified histone H3 (H3) Ab. Indeed, it has been shown that the anti-AcH3 Ab used for ChIP assays may not recognize AcH3 when also phosphorylated at S10.³⁷ As shown in Figure 5B, no significant enrichment for PhH3 was detected at the tg-hu β promoter in erythroid cells. Therefore, the weak acetylation of histone H3 is not the consequence of its phosphorylation. Moreover, ChIP performed with anti-H3 Ab showed that nonmodified histone H3 is underrepresented at the β maj promoter in erythroid cells, confirming that histones are mainly acetylated (Figure 5A). Instead, the detection of nonmodified histone H3 at the tg-hu β promoter suggests that the promoter is not devoid of nucleosomes in erythroid cells (Figure 5B). Since histone H3 lysine 4 dimethylation (MeK4) has been shown to play an important role during gene activation,³⁸ MeK4 was investigated at the tg-hu β promoter. Figure 5B shows that the tg-hu β promoter displays a significant level of MeK4 in HPCs, which undergoes a 3-fold enrichment in erythroid cells.

To better define the pattern of acetylation at the tg-hu β gene, AcH3 was investigated at 2 additional regions situated approximately 300 bp 5' (hu β 5) and approximately 400 bp 3' (hu β 1) of the hu β minimal promoter (Figure 5D). In In2 and human HPCs, no enrichment for AcH3 is detected at hu β 5 (Figure 5E), whereas hu β 1 is significantly acetylated. In highly expressing erythroid cells, hu β 5 remains equally hypoacetylated as in HPCs; however, in In2 and human erythroid cells the downstream hu β gene (hu β 1) is significantly more acetylated than observed in HPCs (Figure 5E). As a control, we also analyzed histone acetylation at a nontranscribed region of the locus, the intergenic $\psi\beta$ region. In human and In2 HPCs and erythroid cells, $\psi\beta$ is not AcH3 (Figure 5F).

Thus, the minimal hu β promoter is epigenetically marked by AcH3 and MeK4 in HPCs. In erythroid cells, AcH3 at the minimal promoter decreases, whereas AcH3 across the gene and MeK4 at the tg-hu β promoter further increase. These results suggest the following: (1) globin gene expression in erythroid cells does not depend on promoter acetylation, and (2) AcH3 and MeK4 epigenetically mark the hu β gene and promoter before the establishment of high-level transcription in erythroid cells.

Globin gene transcription: silencing and induction

An interesting aspect of the human β -globin locus is the switching process during development and the possibility of using a variety of drugs interfering with acetylation to modify this switch in β -thalassemic patients. We therefore compared histone acetylation at hu β and hu γ promoters. The γ genes are expressed during embryonic and fetal stages in humans and in In2 mice. In adult In2 and human bone marrow cells, human γ gene expression becomes negligible.^{14,39} ChIP analyses revealed that, in contrast to hu β (Figure 5B-C), histone H3 at γ -promoters (Figure 6A) is not acetylated in HPCs purified from human or In2 bone marrow, suggesting that the acetylation mark in HPCs would specifically occur at promoters of genes that will become active in erythroid cells. If true, this leads to the prediction that hu γ promoters should exhibit H3 acetylation in HPCs at earlier stages of development when γ genes are expressed. We therefore purified HPCs (c-Kit⁺/CD31^{high}/Ly-6C⁻ cells) from In2 11.5-dpc fetal livers for ChIP analysis. At this stage fetal liver HPCs will give rise to erythroid cells that express both human γ and β genes. It should be noted however, that embryonic γ - but not β -expressing cells are still in circulation and thus present

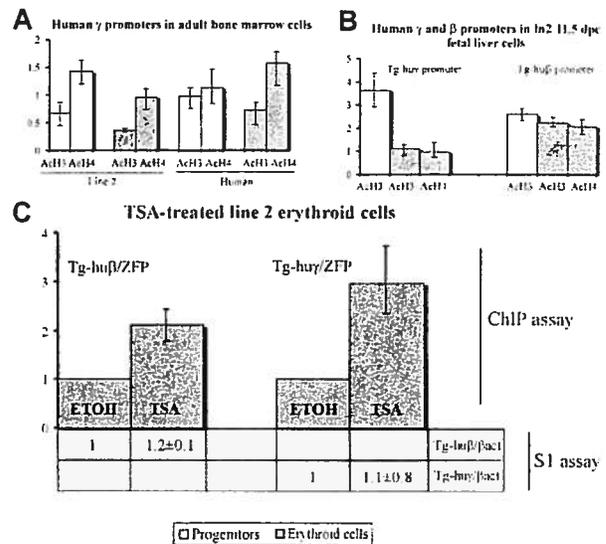


Figure 6. ChIP analysis of human γ and β promoters in bone marrow and 11.5-dpc fetal liver cells. Chromatin from In2 and human bone marrow cells was immunoprecipitated with antiacetylated H3 (AcH3) or H4 (AcH4) Abs. Immunoprecipitated and input samples were subjected to duplex PCR analysis with one primer set specific for hu γ or hu β promoters and another specific for ZFP37 (mouse) or pax6 (human) gene. (A) ChIP analysis of hu γ promoters in In2 and human bone marrow HPCs and erythroid cells. (B) ChIP analysis of hu γ and hu β promoters (tg-hu γ and tg-hu β) in In2 11.5-dpc fetal liver HPCs and erythroid cells. (C) ChIP and S1 nuclease protection assays of tg-hu β and tg-hu γ promoters in In2 TSA-treated Ter119⁺ cells. ChIP assays were performed with anti-AcH3 Abs, and the level of acetylation of TSA-treated samples (TSA) relative to their respective ethanol-treated (ETOH) controls is represented by bars with their corresponding SEM deviations. Mouse β -actin transcript was used as internal control for S1 nuclease protection assay; tg-hu β and tg-hu γ expression level in TSA-treated cells is relative to the ethanol treated controls.

in the fetal liver erythroid cells.¹⁴ In our hands, the HPCs represent 8% of the 11.5-dpc fetal liver and they possess the same morphology, potential in colony assay, and transcriptional activity as bone marrow-derived HPCs (Figure 2; data not shown). As shown in Figure 6B, in In2 fetal liver HPCs, both tg-hu γ and tg-hu β promoters are significantly H3 acetylated. Similar to what was observed for the hu β promoter in adult erythroid cells, AcH3 at tg-hu γ promoters decreases in 11.5-dpc erythroid cells. Hence, H3 deacetylation at tg-hu γ again correlates with gene expression. In effect, AcH3 is largely maintained at tg-hu β promoter in erythroid cells, part of which is embryonic non- β -expressing cells.

We then investigated whether TSA,⁴⁰ a known histone deacetylase inhibitor, would influence the acetylation state of tg-hu γ and/or tg-hu β promoters and change their expression levels. In2 bone marrow was treated with TSA or with ethanol (TSA solvent) and AcH3 level was evaluated at the tg-hu γ and tg-hu β globin promoters in erythroid cells. A 2- to 3-fold enrichment in AcH3 (TSA- relative to ethanol-treated cells) was seen at both tg-hu β and tg-hu γ promoters (Figure 6C). This increase does not significantly modify the level or the balance of expression of these genes, as observed by S1 nuclease assay on ethanol- and TSA-treated bone marrow (Figure 6C). Thus, a higher level of AcH3 at tg-hu β and tg-hu γ promoters in erythroid cells does not modify globin gene transcription.

Discussion

The work presented here assesses, for the first time, variations of chromatin conformation and histone covalent modifications at the

human β -globin locus during hematopoietic differentiation in vivo. Our results suggest that a defined pattern of histone H3 acetylation/dimethylation is important for the specific activation of human globin promoters before high-level expression in erythroid cells. We do not know when this gene-specific potentiation is set, but since multipotent progenitors represent the vast majority of the HPCs investigated (Table 1), it could be present before erythroid lineage commitment.

Chromatin modifications of the human globin LCR in HPCs and erythroid cells

It has been shown that chromatin within lineage-restricted regulatory regions,^{8,10,41} including the mouse β -globin locus,^{7,17} can be remodeled in HPCs. Using transgenic mice and human bone marrow, we demonstrate here that chromatin at the human β -globin LCR is acetylated and accessible (to DNase I) in HPCs in vivo. Previous in vitro investigations using uninduced MEL cells²² provided some evidence in this transformed erythroid-committed cell line that the human LCR displays characteristics of chromatin poised for transcriptional activation. We now provide evidence that the human β -globin LCR is activated in a population of HPCs purified from fresh bone marrow and composed mostly of uncommitted progenitors. Accessibility at HS2, HS3, and HS5 increases in mature erythroid cells when compared with HPCs, suggesting that the LCR is further remodeled during differentiation to allow high-level β -globin gene expression. The human LCR therefore follows an activation pattern similar to that of other hematopoietic loci.^{10,41} Thus, the LCR may already be activated to some extent by partial HS occupancy in HPCs, but complete occupancy of HS and extended chromatin remodeling would only be attained in erythroid cells upon additional binding of stage-specific transactivators. The analysis of histone modifications at different HSs within the LCR suggests that histone acetylation has already facilitated an activated structure at the human LCR, with the exception of HS3, in both human and In2 bone marrow HPCs. In mature erythroid cells the acetylation is further increased at all sites including HS3. The exceptional behavior of HS3 is possibly related to its "chromatin opening" ability⁴² and/or to the particular chromatin organization of the HS3 core region.⁴³

Chromatin at the human β and mouse β major genes is differently activated during erythropoiesis

The hu β and mouse β maj promoters show different patterns of histone modifications and DNase I accessibility during differentiation from HPCs to erythroid cells. The mouse β maj promoter is already largely accessible to DNase I digestion in HPCs with a low level of acetylated H3 and a moderate level of acetylated H4. During differentiation, accessibility is further increased (in particular, the appearance of the hypersensitive site in the promoter illustrated by the early points in the curve in Figure 3C), H3 acetylation is increased several fold, whereas H4 acetylation only doubles when compared with controls. In contrast, in human bone marrow the endogenous hu β promoter shows a very different pattern and, importantly, maintains this pattern when the locus is introduced in mice. It is not accessible to DNase I in HPCs and shows a low level of H4 acetylation but, curiously, a high level of H3 acetylation. Upon cell differentiation, the hu β promoter becomes more accessible to DNase I, H4 acetylation hardly changes, but H3 acetylation decreases significantly. The upstream part of the promoter shows a low level of H3 acetylation, which barely changes upon differentiation, whereas downstream in the gene

histone H3 is already acetylated in HPCs and the level increases several folds upon differentiation. Using a cell culture-based system (transformed MEL cells), it has been reported that the hu β promoter is highly acetylated when active²²; however, we cannot be certain whether our data agree or contradict those results as it is not clear whether the human locus in MEL cells was analyzed before (nonexpressing) or after induction of differentiation (expressing).

We conclude that the activation of the human and mouse β -globin promoters is different and that this difference is intrinsic to these loci since the hu β promoter maintains its own activation program when the human β -globin locus is introduced in the mouse. These differences may explain some of the controversies that have arisen with respect to activation of β -globin loci, where data from patients and mice show that expression and DNase I accessibility at the hu β globin gene are lost when the LCR is deleted (see Grosveld¹³ for review), whereas expression and sensitivity at the mouse β maj gene is not lost when the LCR is deleted.⁴⁴ Our data indicate that the mouse β maj, but not the hu β globin gene, is already accessible to DNase I digestion in HPCs, suggesting that the LCR may indeed not be required to achieve accessibility across the mouse locus. Therefore, even though studies on the mouse β -globin locus have been invaluable tools to understand aspects of globin gene regulation, differences between the epigenetic regulation of the human and the mouse loci should be considered before comparing results obtained with these 2 β -globin loci.

Interestingly, histone hypoacetylation as we observed at the active hu β promoter is not unique. Indeed, it has been shown that several active genes are as hypoacetylated as the surrounding bulk chromatin.^{45,46} For example, histone acetylation, as exemplified at interferon β (*IFN- β*)⁴⁷ and hormone receptor-dependent genes⁴⁸ in mammals, or at *PHO8* gene in *Saccharomyces cerevisiae*,⁴⁹ is a transient signal that does not engender chromatin accessibility by itself but rather provides a mark that facilitates recruitment of remodeling complexes. The synergy between histone acetylation and the activity of switching/sucrose nonfermenting (SWI/SNF)-related chromatin-remodeling complex has been reported previously.⁵⁰

Our results are consistent with a multistage activation model in which the hu β gene and promoter would first be epigenetically marked by histone H3 acetylation and K4 dimethylation in bone marrow HPCs before the onset of high-level transcription. This mark would subsequently be recognized by activators and/or remodeling complexes that in turn would guarantee high-level globin expression in erythroid cells, where indeed chromatin at the hu β promoter is dimethylated and remodeled but no longer acetylated.

The observed decrease of acetylation at the hu β promoter in erythroid cells can be either the consequence of an active deacetylation mechanism (carried out by HDACs) or of a passive process. In TSA-treated Ter119⁺ cells the tg-hu β promoter is significantly more acetylated than in nontreated cells, which suggests that the tg-hu β promoter is actively deacetylated by TSA-sensitive HDACs in erythroid cells. The transcription factor erythroid Krüppel-like factor (EKLF), which is involved in hu β promoter regulation, might play a causal role in hu β promoter deacetylation in erythroid cells since EKLF was found to interact with HDAC1.⁵¹ However, to date it is still unknown whether the EKLF-HDAC1 interaction at the hu β promoter occurs sometime during hematopoiesis.

In summary, we show that the hu β gene and promoter are epigenetically marked in adult HPCs, presumably poising the promoter for activation. The mark at the promoter occurs within a very defined region, spanning the promoter TATA, CCAAT, and

CACCC boxes since no significant H3 acetylation at the upstream $\text{hu}\beta 5$ and $\psi\beta$ intergenic regions was detected. During differentiation, the $\text{hu}\beta$ promoter undergoes an extensive chromatin remodeling accompanied by histone H3 deacetylation, as revealed by hypersensitivity to DNase I digestion and histone H3 hypoacetylation in erythroid cells. Such a pattern of modification is not unlike what has been observed for the hepatocyte nuclear factor 4 α (*HNF 4 α*) gene in differentiating CaCo-2 (human, white, colon, adenocarcinoma) cells.⁵²

Human β versus human γ gene epigenetic regulation during development

The fetal γ globin genes are silenced around birth in humans, but in $\text{ln}2$ the transgenic locus switches from γ to β gene expression in the early fetal liver stage, and only β is expressed in erythroid cells derived from adult bone marrow.¹⁴ We show that $\text{hu}\gamma$ promoters are not acetylated in $\text{ln}2$ and human bone marrow HPCs, whereas in HPCs derived from 11.5-dpc fetal livers these are H3 acetylated. The fact that the $\text{hu}\beta$ promoter is acetylated in both 11.5-dpc and adult HPCs suggests that this acetylation is linked to an epigenetic and developmental gene-specific regulatory mechanism. Using somatic cell hybrids between fetal human or murine transgenic erythroblasts and MEL cells, it was shown that fetal erythroblasts could express the γ genes also in an adult MEL environment.^{53,54} This observation together with other cell fusion experiments^{55,56} invoked the suggestion that epigenetic changes taking place sometime during erythroid differentiation might be important for globin gene switching. Here, we have provided evidence that in freshly isolated human and murine HPCs, defined epigenetic mark(s) are linked to developmental-specific globin gene expression in mature erythroid cells.

Interestingly, TSA-induced H3 acetylation is not sufficient to reactivate $\text{tg-hu}\gamma$ gene expression in bone marrow erythroid cells. As previously shown, some HDAC inhibitors are able to induce γ globin gene reactivation in human erythroid cells.⁵⁷⁻⁶¹ From these studies, it is unclear whether or not these HDAC inhibitors directly influence histone acetylation of the human β -globin locus. On the other hand, treatment of bone marrow cells with HDAC inhibitors is not sufficient to modify the pattern of globin gene expression in

adult β -yeast artificial chromosome (β -YAC) transgenic mice⁶² carrying the whole human β -globin locus. Thus, epigenetic mechanisms other than histone acetylation might influence $\text{hu}\gamma$ gene regulation. As previously suggested,⁶³ the difference in γ gene reactivation in human and transgenic mouse could also be explained by the absence of a "fetal-regulated" globin gene in mice. Then, in human cells, HDAC inhibitors could influence the expression of *trans*-acting factors, which in mice are either missing or not influenced by HDAC inhibitors.

It has been shown that mouse and human globin genes can be expressed at basal levels in adult HPCs but it is not known whether this transcription is involved in the maintenance of a local "potentiated" chromatin structure. Our results confirm that $\text{hu}\gamma$ and $\text{hu}\beta$ genes are transcribed in bone marrow and fetal liver HPCs and show for the first time that this basal expression is neither linked to the level of promoter acetylation nor to the stage-specific activation of these genes in erythroid cells. Thus, basal globin gene expression in HPCs appears to be linked to the human β -globin locus potentiation during hematopoiesis but not to the developmental-specific regulation of globin genes.

Taken together, our results strongly suggest that the pattern of histone acetylation in HPCs is important for the transcriptional potentiation of globin genes and, more interestingly, for the developmentally regulated expression of these genes in erythroid cells. We show that the human γ and β globin genes and promoters are epigenetically marked by histone H3 acetylation/dimethylation in HPCs and we suggest that this mark can be recognized during differentiation by activators and/or remodeling complexes, such as EKLF coactivator-remodeling complex 1 (E-RC1),⁶³ to allow proper expression in terminally differentiated erythroid cells.

Acknowledgments

We thank Silvana Lachance and Sophie Ouellette for technical assistance, Marella de Bruijn for useful comments, Denis-Claude Roy for providing us with leukapheresis samples, and Elliot Drobetsky and Marie Trudel for critical review of the manuscript.

References

- Simon JA, Tamkun JW. Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12:210-218.
- Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature.* 2003;421:448-453.
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001;293:1074-1080.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997;389:251-260.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa J-P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998;72:141-196.
- Redner RL, Wang J, Liu JM. Chromatin remodeling and leukemia: new therapeutic paradigms. *Blood.* 1999;94:417-428.
- Jimenez G, Griffiths SD, Ford AM, Greaves MF, Enver T. Activation of the beta-globin locus control region precedes commitment to the erythroid lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:10618-10622.
- Kontaraki J, Chen HH, Riggs A, Bonifer C. Chromatin fine structure profiles for a developmentally regulated gene: reorganization of the lysozyme locus before trans-activator binding and gene expression. *Genes Dev.* 2000;14:2106-2122.
- Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jamnik M, Zaret K-S. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell.* 2002;9:279-289.
- Tagoh H, Himes R, Clarke D, et al. Transcription factor complex formation and chromatin fine structure alterations at the murine c-fms (CSF-1 receptor) locus during maturation of myeloid precursor cells. *Genes Dev.* 2002;16:1721-1737.
- Carler D, Chakalova L, Osborne CS, Dai YF, Fraser P. Long-range chromatin regulatory interactions in vivo. *Nat Genet.* 2002;32:623-626.
- Tolhuis B, Palstra RJ, Splinter E, Grosveld F, de Laat W. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell.* 2002;10:1453-1465.
- Grosveld F. Activation by locus control regions? *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9:152-157.
- Strouboulis J, Dillon N, Grosveld F. Developmental regulation of a complete 70-kb human beta-globin locus in transgenic mice. *Genes Dev.* 1992;6:1857-1864.
- Townes TM, Behringer RR. Human globin locus activation region (LAR): role in temporal control. *Trends Genet.* 1990;6:219-223.
- Hu M, Krause D, Greaves M, et al. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev.* 1997;11:774-785.
- Delassus S, Titley I, Enver T. Functional and molecular analysis of hematopoietic progenitors derived from the aorta-gonad-mesonephros region of the mouse embryo. *Blood.* 1999;94:1495-1503.
- Hebbes TR, Clayton AL, Thorne AW, Crane-Robinson C. Core histone acetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J.* 1994;13:1823-1830.
- Litt MD, Simpson M, Gaszner M, Allis C-D, Felsenfeld G. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science.* 2001;293:2453-2455.
- Sawado T, Halow J, Bender MA, Groudine M. The beta-globin locus control region (LCR) functions primarily by enhancing the transition from transcription

- initiation to elongation. *Genes Dev.* 2003;17:1009-1018.
21. Forsberg EC, Downs KM, Christensen HM, Im H, Nuzzi PA, Bresnick EH. Developmentally dynamic histone acetylation pattern of a tissue-specific chromatin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:14494-14499.
 22. Schübeler D, Francastel C, Cimbora DM, Reik A, Martin DI, Groudine M. Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus. *Genes Dev.* 2000;14:940-950.
 23. McMorrow T, van den Wijngaard A, Wollenschlaeger A, et al. Activation of the beta globin locus by transcription factors and chromatin modifiers. *EMBO J.* 2000;19:4986-4996.
 24. van der Loo JC, Slieker WA, Kieboom D, Ploemacher RE. Identification of hematopoietic stem cell subsets on the basis of their primitiveness using antibody ER-MP12. *Blood.* 1995;85:952-962.
 25. Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood.* 1997;90:1345-1364.
 26. Kina T, Ikuta K, Takayama E, et al. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *Br J Haematol.* 2000;109:280-287.
 27. Andrews RG, Singer JW, Bernstein I-D. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood.* 1986;67:842-845.
 28. Greenwall DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson G-A. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood.* 1992;80:1105-1115.
 29. van Schravendijk MR, Handunnetti SM, Barnwell JW, Howard RJ. Normal human erythrocytes express CD36, an adhesion molecule of monocytes, platelets, and endothelial cells. *Blood.* 1992;80:2105-2114.
 30. Papayannopoulos T, Priestley GV, Rohde A, Peterson KR, Nakamoto B. Hemopoietic lineage commitment decisions: in vivo evidence from a transgenic mouse model harboring micro LCR-beta_{pro}-LacZ as a transgene. *Blood.* 2000;95:1274-1282.
 31. Reik A, Telling A, Zitnik G, Cimbora D, Epner E, Groudine M. The locus control region is necessary for gene expression in the human beta-globin locus but not the maintenance of an open chromatin structure in erythroid cells. *Mol Cell Biol.* 1998;18:5992-6000.
 32. Epner E, Reik A, Cimbora D, et al. The beta-globin LCR is not necessary for an open chromatin structure or developmentally regulated transcription of the native mouse beta-globin locus. *Mol Cell.* 1998;2:447-455.
 33. Plaza S, Saule S, Dozier C. High conservation of cis-regulatory elements between quail and human for the Pax-6 gene. *Dev Genes Evol.* 1999;209:165-173.
 34. Nakada Y, Taniura H, Uetsuki T, Inazawa J, Yoshikawa K. The human chromosomal gene for neclin, a neuronal growth suppressor, in the Prader-Willi syndrome deletion region. *Gene.* 1998;213:65-72.
 35. Zhu X, Cheng J, Gao J, et al. Isolation of mouse THP gene promoter and demonstration of its kidney-specific activity in transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;282:F608-F617.
 36. Kuo MH, Allis CD. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein: DNA associations in a chromatin environment. *Methods.* 1999;19:425-433.
 37. Thomson S, Clayton AL, Mahadevan LC. Independent dynamic regulation of histone phosphorylation and acetylation during immediate-early gene induction. *Mol Cell.* 2001;8:1231-1241.
 38. Kiekhäfer CM, Grass JA, Johnson KD, Boyer ME, Bresnick EH. Hematopoietic-specific activators establish an overlapping pattern of histone acetylation and methylation within a mammalian chromatin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:14309-14314.
 39. Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW. Hemoglobin switching. In: Majerus P-W, Varmus H, eds. *The Molecular Basis of Blood Diseases.* Philadelphia, PA: Saunders; 1994:66-105.
 40. Yoshida M, Horinouchi S. Trichostatin and leptomycin: inhibition of histone deacetylation and signal-dependent nuclear export. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;886:23-36.
 41. Ford AM, Bennett CA, Healy LE, Towatari M, Greaves MF, Enver T. Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:10838-10843.
 42. Ellis J, Tan-Un KC, Harper A, et al. A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human beta-globin locus control region. *EMBO J.* 1996;15:562-568.
 43. Leach KM, Nightingale K, Igarashi K, et al. Reconstitution of human beta-globin locus control region hypersensitive sites in the absence of chromatin assembly. *Mol Cell Biol.* 2001;21:2629-2640.
 44. Bender MA, Bulger M, Close J, Groudine M. Beta-globin gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous beta-globin locus in mice do not require the locus control region. *Mol Cell.* 2000;5:387-393.
 45. O'Neill LP, Turner BM. Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription-independent manner. *EMBO J.* 1995;14:3946-3957.
 46. Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12:142-148.
 47. Agalloti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T, Thanos D. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell.* 2000;103:667-678.
 48. Dilworth FJ, Fromental-Ramain C, Yamamoto K, Chambon P. ATP-driven chromatin remodelling activity and histone acetyltransferases act sequentially during transactivation by RAR/RXR in vitro. *Mol Cell.* 2000;6:1049-1058.
 49. Reinke H, Gregory PD, Horz W. A transient histone acetylation signal marks nucleosomes for remodelling at the PHO8 promoter in vivo. *Mol Cell.* 2001;7:529-538.
 50. Hassan AH, Neely KE, Workman JL. Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell.* 2001;104:817-827.
 51. Chen X, Bieker JJ. Unanticipated repression function linked to erythroid Kruppel-like factor. *Mol Cell Biol.* 2001;21:3118-3125.
 52. Soutoglou E, Tallanidis I. Coordination of PIC assembly and chromatin remodelling during differentiation-induced gene activation. *Science.* 2002;295:1901-1904.
 53. Papayannopoulos T, Brice M, Stamatoyannopoulos G. Analysis of human hemoglobin switching in MEL x human fetal erythroid cell hybrids. *Cell.* 1986;46:469-476.
 54. Stanworth S-J, Roberts NA, Sharpe JA, Sloane-Stanley JA, Wood WG. Established epigenetic modifications determine the expression of developmentally regulated globin genes in somatic cell hybrids. *Mol Cell Biol.* 1995;15:3969-3978.
 55. Peterson KR, Zitnik G, Huxley C, et al. Use of yeast artificial chromosomes (YACs) for studying control of gene expression: correct regulation of the genes of a human beta-globin locus YAC following transfer to mouse erythroleukemia cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:11207-11211.
 56. Vassilopoulos G, Navas PA, Skarpidi E, et al. Correct function of the locus control region may require passage through a nonerythroid cellular environment. *Blood.* 1999;93:703-712.
 57. Perrine SP, Miller BA, Faller DV, et al. Sodium butyrate enhances fetal globin gene expression in erythroid progenitors of patients with Hb SS and beta thalassemia. *Blood.* 1989;74:454-459.
 58. Stamatoyannopoulos G, Blau CA, Nakamoto B, et al. Fetal hemoglobin induction by acetate, a product of butyrate catabolism. *Blood.* 1994;84:3198-3204.
 59. Liakopoulou E, Blau CA, Li Q, et al. Stimulation of fetal hemoglobin production by short chain fatty acids. *Blood.* 1995;86:3227-3335.
 60. Swank RA, Skarpidi E, Papayannopoulos T, Stamatoyannopoulos G. The histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, reactivates the developmentally silenced gamma globin expression in somatic cell hybrids and induces gamma gene expression in adult BFUe cultures. *Blood Cells Mol Dis.* 2003;30:254-257.
 61. Skarpidi E, Cao H, Heltweg B, et al. Hydroxamide derivatives of short-chain fatty acids are potent inducers of human fetal globin gene expression. *Exp Hematol.* 2003;31:197-203.
 62. Pace B, Li Q, Peterson K, Stamatoyannopoulos G. Alpha-Amino butyric acid cannot reactivate the silenced gamma gene of the beta locus YAC transgenic mouse. *Blood.* 1994;84:4344-4353.
 63. Armstrong JA, Bieker JJ, Emerson BM. A SWI/SNF-related chromatin remodelling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell.* 1998;95:93-104.

