

Université de Montréal

Établissement d'une lignée cellulaire pro-érythroïde de souris : outil d'étude de la  
régulation transcriptionnelle des gènes de globine

Par

HOUSSEIN HAJJ HASSAN

Programme de biologie moléculaire  
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Biologie Moléculaire

Avril 2004

©, Houssein Hajj Hassan, 2004



QH  
506  
U54  
2004  
v.019

## 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 :

Établissement d'une lignée cellulaire pro-érythroïde de souris : outil d'étude de la  
régulation transcriptionnelle des gènes de globine

Présenté par :

HOUSSEIN HAJJ HASSAN

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Dindial Ramotar  
Président-rapporteur

Dr Éric Milot  
Directeur de recherche

Dr Timothy Reudelhuber  
Membre du jury

## Liste des sigles et des abréviations

-/-:	Knock out
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ARN:	Acide ribonucléique
ATP:	Adénosine triphosphate
CBP:	CCAAT binding protein
ChIP:	Chromatin immunoprecipitation
EKLF:	Erythroid Kruppel like factor
Epo:	Érythropoïétine
ER:	Oestrogen receptor
FOG:	Friend of GATA
GFP:	Green fluorescent protein
H3:	Histone 3
H4:	Histone 4
HAT:	Histone acétyle transférase
HDAC:	Histone déacétylase
HMT:	Histone méthyle transférase
HS:	Site hypersensible
IL3:	Interleukine-3
LCR:	Locus control region
MEL:	Murine erythroleukemias
MetK4H3:	Lysine 4 méthylée de l'histone 3
NF-E2:	Nuclear factor-erythroid 2
PCR:	Polymerase chain reaction
PIC:	preinitiation complex
SCF:	Stem cell factor
SCM:	Spleen conditional medium
SWI/SNF:	SWItching/Sucrose Non Fermenting
TBP:	TATA binding protein
TX:	Tamoxifen

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des amorces utilisées pour les réactions de PCR

## Liste des figures

- Figure 1 : Schéma de la structure et des modifications post-traductionnelles des histones dans les nucléosomes.
- Figure 2 : schéma montrant le déplacement du « core » du nucléosome par le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF.
- Figure 3 : Les locus de la  $\beta$  globine de souris et de l'humain
- Figure 4 : deux embryons de souris au jour 14.5 de la gestation; un déficient en EKLf l'autre type sauvage.
- Figure 5 : Le modèle proposé des rôles de P53 et des oncogènes myc et raf dans le processus de l'immortalisation.
- Figure 6 : le virus exprimant les deux oncogènes myc et raf.
- Figure 7 : la manière du fonctionnement du système d'induction de la construction EKLf-ER-IRES- GFP.
- Figure 8 : « western blot » montrant la déficience de la lignée 18-SCF en P53.
- Figure 9 : Protection RNase S1 montrant l'expression de l' $\alpha$  globine dans la lignée cellulaire EKLf-/-
- Figure 10 : Les analyses par FACS de l'immunofluorescence pour l'antigène Ter119 chez les C29.
- Figure 11 : Coloration avec le Wright Giemsa des 18-SCF.
- Figure 12 : Protection RNase (S1) montrant l'expression de deux gènes, l' $\alpha$  globine de souris et le  $\beta$  majeur avec et sans Tamoxifen dans les C29.
- Figure 13 : Analyses par FACS de l'expression du gène  $\beta$  majeur avec et sans Tamoxifen dans les C29.
- Figure 14 : coloration avec le Wright Giemsa des C29 avec et sans Tamoxifen.
- Figure 15 : Exemple de PCR en phase linéaire d'un CHIP.
- Figure 16 : L'enrichissement du TF-IID au promoteur du gène  $\beta$  majeur avec et sans Tamoxifen.
- Figure 17 : Le niveau d'enrichissement pour GATA-1 et NF-E2 au promoteur  $\beta$  majeur avec et sans Tamoxifen.

Figure 18 : Les ChIPs pour les histones H3 et H4 montrant le niveau d'enrichissement au promoteur du gène  $\beta$  majeur avec et sans Tamoxifen.

Figure 19 : Schéma montrant les étapes de la co-transfection des C29 avec les constructions de globine humaine : Le gène  $\beta$  et le  $\mu$ LCR-gène  $\beta$ .

Figure 20 : Une photo d'un gel d'agarose montrant les clones positifs transfectés avec le gène  $\beta$  humain.

Figure 21 : PCRs sur les clones  $\mu$ LCR-gène  $\beta$ .

Figure 22 : les facteurs qui interagissent avec GATA-1.

Figure 23 : Modèle proposé dans la littérature de l'activation du gène  $\beta$  majeur.

Figure 24 : Modèle que nous proposons de l'activation du gène  $\beta$  majeur.



## Résumé

Les mécanismes de la régulation épigénétique modulent l'organisation de la chromatine et l'expression des gènes dans différents systèmes modèles chez les eucaryotes comme la régulation du locus de la  $\beta$ -globine. Sachant que la déficience en EKLF (Erythroïd Krüppel Like Factor) est létale, nous avons décidé d'immortaliser une lignée EKLF<sup>-/-</sup> afin d'étudier le rôle d'EKLF dans la régulation épigénétique et la cinétique de la transcription du gène de la  $\beta$  globine.

Cette lignée cellulaire a été immortalisée à partir d'un foie fœtal EKLF<sup>-/-</sup> de souris prélevé au jour 12,5 post-gestation. Une fois immortalisée, nous avons caractérisé cette lignée en utilisant différentes techniques cellulaires et moléculaires : c'est une lignée pro-érythroïde. Nous avons ensuite introduit un système d'induction qui nous a permis de régénérer l'expression d'EKLF dans cette lignée et d'examiner son influence sur la structure de la chromatine et sur le recrutement des facteurs de transcription (GATA-1, NF-E2 et TFII-D) au niveau du promoteur du gène  $\beta$  majeur du locus murin. Ces résultats nous ont permis de proposer un modèle préliminaire de l'activation du gène de la  $\beta$  globine.

Cette lignée est plus optimale que celles utilisées par les études de ce genre; elle pourrait nous permettre d'établir un modèle de l'activation de la transcription des locus multigéniques chez les mammifères.

## Mots clés

Chromatine, histones, épigénétique, immortalisation, lignée érythroïde, locus de la  $\beta$  globine, EKLF, NF-E2, GATA-1.

## Summary

The mechanisms of epigenetic regulation modulate the organization of chromatin and gene expression in various model systems at the eukaryotes like the regulation of the  $\beta$ -globin locus. Knowing that EKLF deficiency (Erythroïd Krüppel Like Factor) is lethal, we decided to immortalize an EKLF  $-/-$  cell line in order to study the role of EKLF in the epigenetic regulation and the kinetics of the transcription of  $\beta$  globin gene. This cellular line was immortalized starting from a fetal liver EKLF  $-/-$  mouse taken at the day 12.5 post-gestation. Once immortalized, we characterized this cell line by using various cellular and molecular techniques: it is a pro-erythroid cell line. We then introduced an induction system, which enabled us to regenerate the expression of EKLF in this line and to examine its influence on the chromatin structure and the recruitment of the transcription factors (GATA-1, NF-E2 and TFII-D) at the level of the  $\beta$  major promoter of the murin locus. These results enable us to propose a preliminary model of the activation of  $\beta$  globin gene. This line is more optimal than those used by similar studies; it could enable us to establish a model for the transcription activation of the multigenic locus in the mammals.

## Key words

Chromatin, histones, epigenetic, immortalization, erythroid cell line,  $\beta$  globin locus, EKLF, NF-E2, GATA-1.

## Table des matières

Liste des sigles et abréviations.....	iii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures.....	v
Résumé.....	vii
Summary.....	vii
Table des matières.....	viii
Remerciements.....	xii
<b>I.INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>A-La chromatine.....</b>	<b>2</b>
1-Structure de la chromatine.....	3
2-Les modifications des extrémités des histones.....	4
2.1-Codes des histones.....	5
2.2-L'acétylation des histones.....	5
2.3-La méthylation des histones.....	7
2.4-La phosphorylation des histones.....	8
3-Remodelage de la chromatine par des complexes ATP-dépendents.....	9
<b>B-Le Locus de la <math>\beta</math> globine.....</b>	<b>11</b>
1-Structure des gènes du locus de la $\beta$ globine.....	13
2- Régulation de la transcription des gènes de globine.....	13
2-1- Séquences cis-régulatrices.....	14
2-2 Le LCR.....	15
2.2.1-Propriétés du LCR.....	16
2.2.2-Les sites hypersensibles du LCR (HSs) : HS1, 2, 3, 4 et 5.....	17
2.3- Facteurs de transcription.....	20
2.3-1 Facteurs érythroïdes-spécifiques (GATA-1, NF-E2 et EKLF).....	20
2.3-2 Facteurs ubiquitaires (C/EBP, SP1 et YY1.....	25

3-Régulation de l'expression des gènes du locus de la $\beta$ globine au cours du développement.....	26
3.1-Activation du gène $\beta$ globine lors du stade adulte.....	26
3.2- Interaction LCR-gènes.....	28
*Le modèle d'Engel.....	28
*Le modèle de Wijgerde.....	28
*Le modèle de Bulger et Groudine.....	29
<b>C- Immortalisation cellulaire.....</b>	<b>30</b>
1-La P53.....	30
2-Les proto-oncogènes myc et raf.....	31
<b>II-MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>34</b>
1-Constructions et vecteurs.....	35
2-Les souris.....	36
3-Les lignées Scellulaires BHK et J2.....	36
4-La lignée déficiente (« Knock out ») en EKLf (18-scf).....	37
5-Transfection.....	37
6-Induction des C29.....	37
7-ChIP (Chromatin Immunoprécipitation).....	38
8-Anticorps.....	38
9-Analyse semi-quantitative par PCR radioactif en duplex.....	38
10-Les amorces.....	39
11-Protection RNase(S1).....	39
12-Immunofluorescence pour analyse par FACS.....	40
13-Buvarbage du type « Western ».....	40
14-Coloration «Wright-Giemsa » .....	41
<b>III-RÉSULTATS.....</b>	<b>42</b>

<b>A- Immortalisation de la lignée cellulaire</b> .....	43
1-Croisement des souris.....	43
2- Production du rétrovirus myc et raf.....	44
3-Les conditions de culture (cytokines).....	45
3.1-SCM (Spleen Conditional medium).....	45
3.2-SCF (Stem Cell Factor).....	46
3.3-Epo (Erythropoietine).....	46
3.4-IL-3 (Interleukine-3).....	47
4-Conditions finales d'immortalisation.....	47
5-Régénération de l'expression d'EKLF.....	48
<b>B- Caractérisation de la lignée cellulaire EKLF-/-</b> .....	49
1- La lignée est P53-/-.....	50
2- Expression de globine.....	50
3-Les C29 sont Ter119 positifs.....	51
4- Coloration Wright Giemsa.....	53
5-L'induction des C29.....	53
5.1-La protection à la RNase (S1).....	54
5.2-L'immunofluorescence.....	55
5.3-Coloration avec le Wright Giemsa.....	56
<b>C- Les ChIPs (Chromatin Immunoprecipitation)</b> .....	57
1-TF-IID.....	58
2-GATA-1 et NF-E2.....	60
3-Les histones.....	61
<b>D- Les clones avec les transgènes humains</b> .....	64
1- Les clones gène- $\beta$ .....	65
2- Les clones $\mu$ LCR.....	66
<b>IV- DISCUSSION</b> .....	68
A-La lignée EKLF-/- ; plusieurs questions et réponses.....	69

B-Les résultats des ChIPs au promoteur du gène  $\beta$  majeur.....72

**RÉFÉRENCES**.....77

## Remerciements

*J'aimerais remercier le Dr Lee Wall pour le projet motivant qui m'a offert, le Dr Éric Milot pour son accueil généreux dans son laboratoire après le décès du Dr Wall et pour ses précieux conseils qui m'ont permis de finir ma maîtrise et tous les membres de son laboratoire.*

*De sincères remerciements à Mme Nathalie Delvoye pour son énorme travail dans l'immortalisation de la lignée cellulaire.*

*Je tiens finalement à remercier mes parents, ma femme et ma fille pour leur motivation et leur appui moral.*

*Merci à tous!!!*

## Corps de l'ouvrage

### 1-Introduction

- A-La chromatine
- B-Le locus de la  $\beta$  globine
- C-Immortalisation cellulaire

### 2-Matériels et méthodes

### 3-Résultats

- A-Immortalisation de la lignée cellulaire
- B-Characterisation de la lignée cellulaire EKLF<sup>-/-</sup>
- C-Les ChIPs (*Chromatin immunoprecipitation*)
- D-Les clones avec les transgènes humains

### 4-Discussion



## 1.Introduction

### A-La chromatine :

L'information génétique chez les eucaryotes est différenciellement exprimée dans l'espace et dans le temps à travers des mécanismes épigénétiques qui déterminent l'expression en adaptant des régions du génome à maintenir une activation ou un silence d'un gène. Le terme épigénétique décrit l'étude des altérations stables dans le potentiel d'expression d'un gène qui se produisent durant le développement et la prolifération cellulaire.

Les mécanismes épigénétiques sont les facteurs qui affectent l'expression d'un gène autre que la séquence primaire de l'ADN: la structure de la chromatine (euchromatine et hétérochromatine) et les modifications post-traductionnelles des histones (acétylation, méthylation et phosphorylation), la méthylation de l'ADN, les facteurs de transcription et protéines d'hétérochromatine et les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants comme le complexe SWI/SNF (Jaenisch et al., 2003).

Ces mécanismes de régulation épigénétique modulent l'organisation de la chromatine et l'expression des gènes dans différents systèmes modèles chez les eucaryotes comme l'inactivation du chromosome X chez la femelle et l'hétérochromatine péricentrique chez les mammifères, la régulation du locus de la  $\beta$ -globine et les *imprinted gene* (Fournier et al., 2002).

L'organisation de l'ADN sous forme de chromatine joue un rôle critique dans le contrôle de tous les processus nucléaires. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome qui consiste en un octamère de quatre types d'histones: 2 H2A, 2 H2B, 2 H3 et 2 H4, autour duquel 146 paires de bases sont enroulées (figure 1a). Une autre histone, H1, joue le rôle d'un *linker* entre deux nucléosomes aboutissant à un degré plus élevé de compaction. (Forsberg et al., 2001; Fu et al., 2002)

La chromatine, dans le génome, existe sous deux formes : L'euchromatine, c'est la forme relâchée, elle contient des nombreux gènes transcrits et elle est caractérisée par une réplication précoce. Les extrémités des histones H3 et H4 au niveau de cette euchromatine sont généralement hyperacétylées et la lysine 4 de l'histone H3 est

méthylée. Cette forme de chromatine contient des sites hypersensibles à la digestion par la nucléase (DNase-I). L'hétérochromatine, c'est une forme compactée, elle contient des séquences répétitives et peu de gènes. Sa réplication est tardive, les extrémités des histones H3 et H4 sont fréquemment hypoacétylées et la lysine 9 de l'histone H3 est méthylée. Elle est insensible à la DNase-I. (Schübeler et al., 2000 ; Armstrong et al., 1999 ; Forsberg 2001).

#### *1-Structure de la chromatine :*

L'ADN est enroulé sur environ 146 paires de bases (1,65 tours) autour d'octamère d'histones (Kornberg, 1974 ; Kornberg et Thomas, 1974). Le complexe ADN-octamère d'histones forme le cœur du nucléosome. L'enroulement de l'ADN est maintenu grâce à des interactions électrostatiques entre les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN et les charges positives des histones. Cette structure est dite en "collier de perles" ou en "chapelet". Une histone de liaison se fixe aux segments d'ADN (de 20 à 200 pb) séparant deux cœurs nucléosomiaux (c'est l'histone H1 chez les mammifères ou H5 chez la drosophile). L'addition de cette histone permet une condensation en spirale qui donne naissance à une fibre de 30 nm de diamètre. Cette fibre subit alors une série de repliements successifs sur elle-même pour aboutir au chromosome métaphasique condensé.

Il existe 5 types principaux d'histones H2A, H2B, H3, H4 et H1. Ces protéines sont parmi les plus conservées au cours de l'évolution chez les eucaryotes. Les histones dites de "cœur" correspondent aux histones H2A, H2B, H3 et H4. Ce sont des protéines d'environ 14 kDa, organisées en deux domaines distincts : Une extrémité N-terminale peu structurée et un domaine central et C-terminal qui adopte une structure particulière dite en "repliement histone" (ou *histone fold*). La similitude entre les histones H2A, H2B, H3 et H4 en termes de séquence et de structure suggère qu'elles possèdent une origine commune. Leurs extrémités N-terminales sont fortement chargées positivement et riches en lysine pour les histones H3 et H4 ou en arginine pour les histones H2A et H2B (Marks et al., 2001).

## 2-Les modifications des extrémités des histones :

Les histones font l'objet de nombreuses modifications covalentes post-traductionnelles. Ces modifications consistent en des acétylations, méthylations, phosphorylations et ubiquitinations. La figure 1b résume l'ensemble des modifications covalentes existant chez les eucaryotes supérieurs (Marks et al., 2001).

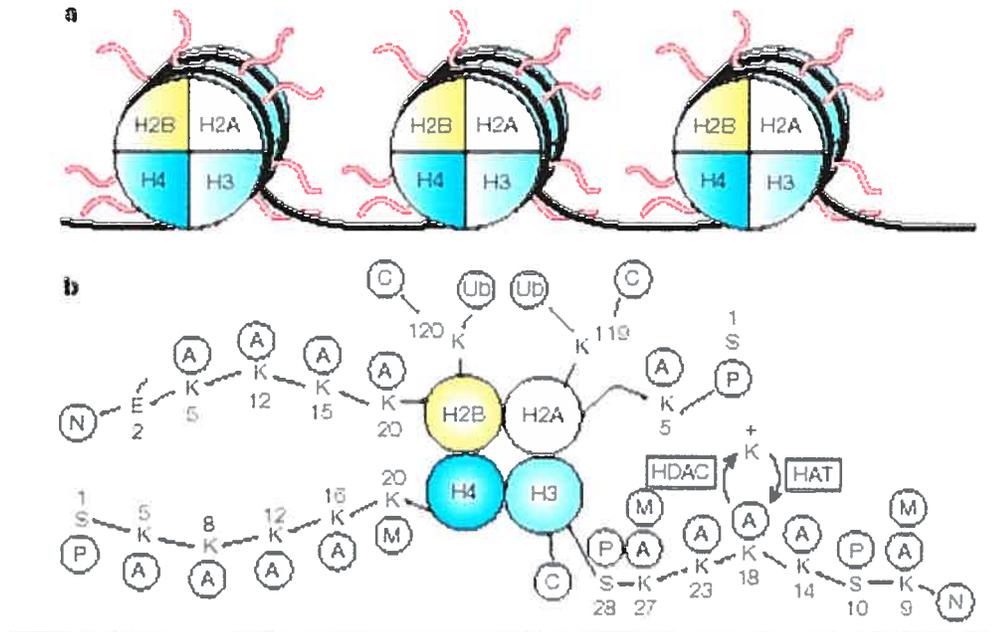


Figure 1(Marks et al., 2001) : Schéma de la structure et des modifications post-traductionnelles des histones dans les nucléosomes. a) Les protéines qui forment le centre (core) du nucléosome : H2A(histone 2A), H2B(histone 2B), H3(histone3), H4(histone 4). Chaque histone est présente en 2 copies, alors l'ADN (fil noir) est enroulé autour de l'octamère des histones. Les filaments oranges représentent les extrémités N-terminales des histones. b) Les modifications des extrémités N-terminales des histones. K : résidu lysine dans ces extrémités, ils sont les sites potentiels d'acétylation et de déacétylation pour les histones-acétyltransférases (HAT) et histones déacétylase (HDAC). A :Acétyle, C : C-terminale, E : acide glutamique, M : méthyle, N : N-terminale, P : phosphate, S : sérine et Ub :ubiquitine.

Ces différentes modifications post-traductionnelles des histones ont été corrélées avec le statut transcriptionnel d'un gène. Les extrémités N-terminales des histones ont des interactions fortes avec l'ADN et sont le principal siège de ce type de modifications. L'intervention des extrémités amino-terminales des histones H3 et H4 dans les

interactions entre nucléosomes laisse supposer que certaines modifications covalentes participent à la déstabilisation de structure d'ordre supérieur.

### 2.1-Code des histones :

L'acétylation des extrémités N-terminales des histones est considérée comme un mécanisme de l'activation transcriptionnelle. Cependant, il existe un niveau basal d'acétylation des histones. L'acétylation ciblée de certains résidus se fait dans un contexte global d'acétylation et de déacétylation (Vogelauer et al., 2000). L'acétylation d'une lysine n'est pas systématiquement synonyme d'activation de la transcription. Par exemple, la lysine 14 de l'histone H4 est acétylée dans l'hétérochromatine (Braunstein et al., 1996). Réciproquement, la déacétylation d'un résidu ne provoque pas toujours la répression des gènes concernés. Ceci suggère donc que le profil d'acétylation est déterminant et que l'effet transcriptionnel de l'acétylation des histones fait sans doute intervenir une combinaison de modifications et non seulement un effet de charge. De même, les autres modifications covalentes des histones entraînent, selon le contexte, des réponses différentes. L'association des différentes modifications formerait alors un code (le *histone code*) déchiffré par d'autres protéines, et déterminerait la voie dans laquelle s'engage la cellule (Strahl et Allis, 2000 ; Jenuwein et Allis, 2001).

### 2.2-L'acétylation des histones :

La réaction d'acétylation est un transfert d'un groupement acétyle depuis l'acétylcoenzyme A sur un résidu lysine de la protéine cible. Dans le cas des histones, elle est catalysée par les histones acétyltransférases. La réaction est réversible (catalysée alors par des histones déacétylases). Cette réaction a lieu sur les extrémités aminotermiales des histones. L'acétylation des lysines diminue les charges positives de ces extrémités N-terminales. Elle pourrait de ce fait affaiblir les interactions entre les extrémités des histones et l'ADN ou entre nucléosomes (Luger et al., 1997). Cette modification des histones provoque une sensibilité accrue des nucléosomes à la digestion par des nucléases (DNase-I), ce qui indique que l'ADN est plus accessible. La corrélation entre la présence d'histones acétylées et la chromatine transcriptionnellement active a été établie dans les années 1960 (Pogo et al., 1967). Des

anticorps dirigés contre les histones hyperacétylées reconnaissent des fragments de chromatine contenant beaucoup de gènes transcriptionnellement actifs (Reeves, 1984). Le lien entre acétylation des histones et transcription a ensuite été renforcé par la découverte de complexes co-activateurs possédant une activité histone acétyltransférase (HAT ; revue dans Roth et al., 2001). Au niveau du locus de la  $\beta$  globine, des études chez le poulet ont montré des fortes corrélations entre gène actif et l'hyperacétylation des histones H3 et H4. Ces mêmes études ont montré que l'histone H2B aussi est plus hyperacétylée au niveau des gènes les plus transcrits (Myers et al., 2001; 2003).

\* *Les histones acétyltransférases (HAT)* : Les histones acétyltransférases ont pour substrats privilégiés les histones H3 et H4. Les autres histones peuvent servir de substrat mais l'affinité est toutefois inférieure. Historiquement, deux catégories d'histone acétyltransférases ont été définies. Les HATs de type B ont une localisation cytoplasmique et acétylent les histones H4 avant leur entrée dans le noyau et leur dépôt sur l'ADN néosynthétisé. Les HATs de type A sont nucléaires et acétylent les histones déjà incorporées au sein de nucléosomes, ceci probablement en liaison avec les processus transcriptionnels. De nombreux complexes HATs ont été isolés chez différents organismes. En dehors de leur activité sur les histones, les HATs sont également capables d'acétyler d'autres substrats dont des protéines qui se fixent sur la chromatine et des facteurs de la transcription (Sternier et Berger, 2000). L'acétylation de ces protéines régulent leur activité. Ainsi, les HAT participent à la régulation de transcription à plusieurs niveaux.

\* *Les histones déacétylases (HDAC)* : Le corollaire de l'effet de l'acétylation des histones sur l'activation de la transcription est que la déacétylation de ces résidus entraîne une répression transcriptionnelle. De la même manière que de nombreuses histones acétyltransférases ont été initialement isolées comme des co-activateurs transcriptionnels, beaucoup de co-répresseurs de la transcription ont des activités histone-déacétylases.

La protéine humaine HDAC1 est la première histone-déacétylase à avoir été isolée (Taunton et al., 1996). Son homologue chez *S. cerevisiae*, la protéine Rpd3, est

nécessaire à l'activation et la répression de nombreux gènes. La réunion des informations biochimiques sur Hdac1 et génétiques sur Rpd3 a fourni la première connexion entre répression de la transcription et déacétylation des histones (Vidal et Gaber, 1991).

Les histones déacétylases se classent en trois catégories. La première classe, à laquelle appartiennent les protéines humaines Hdac1, Hdac2, Hdac3 et Hdac8, est définie par la protéine de levure Rpd3. La classe II contient les protéines humaines Hdac5, Hdac6, Hdac7 et Hdac9, homologues à la déacétylase de levure Hda1 (Khochbin et al., 2001). Les différentes HDAC sont capables de déacétyler les histones H2A, H2B, H3 et H4. Le troisième groupe de déacétylases est constitué des protéines homologues à la protéine de levure Sir2. Il a été démontré que cette protéine possède *in vitro* une activité déacétylase dépendante du NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) et est capable de déacétyler les histones H3 et H4 (Smith et Boeke, 1997 ; Imai et al., 2000 ; Landry et al., 2000 ; Smith et al., 2000).

Il apparaît donc que les histones acétyltransférases et les histones déacétylases peuvent exercer une activité ciblée après un recrutement par des régulateurs transcriptionnels.

### 2.3-La méthylation des histones :

La méthylation est un transfert d'un groupement méthyle depuis la S-adénosylméthionine vers la protéine cible. Les histones peuvent être méthylées par des histones méthyltransférases (HMT) au niveau de résidus lysine ou arginine. Contrairement à l'acétylation, la méthylation ne modifie pas la charge globale des histones (Jenuwein et Allis, 2001). Cependant, il semble que la méthylation puisse être réversible bien qu'aucune histone déméthylase n'ait été encore isolée.

Comme l'acétylation, la méthylation des histones a été corrélée à la régulation de la transcription. Cependant, la méthylation des histones n'a pas comme conséquence systématique une activation transcriptionnelle. Le résidu, son emplacement, le nombre de méthylation ainsi que la combinaison avec d'autres modifications covalentes des histones déterminent l'effet transcriptionnel.

Les premières histones méthyltransférases agissant sur les résidus lysine à avoir été caractérisées sont les protéines Suv39H (Aagaard et al., 1999). Les protéines Suv39H1

méthylent *in vitro* la lysine 9 de l'histone H3 et sont des homologues de suppresseurs de l'effet de variéation chez la drosophile et *S. pombe* (Rea et al., 2000). Les Suv39H1 ont aussi une influence sur l'effet de variéation chez les mammifères (McMorrow et al. 2000). Plusieurs familles d'histone méthyltransférases ont été identifiées, contenant toutes un motif SET nécessaire à l'activité (Rea et al., 2000).

La méthylation du résidu lysine 9 de l'histone H3 a été associée à la formation d'hétérochromatine. Cette modification est reconnue par le répresseur transcriptionnel Hp1 chez l'humain (M31 chez la souris) par son homologue Swi6 chez *S. pombe*, et peut entraîner la formation d'hétérochromatine (Bannister et al., 2001 ; Lachner et al., 2001).

L'histone H3 peut également être méthylée sur la lysine 4. Contrairement à la méthylation de la lysine 9, la méthylation de la lysine 4 semble avoir un effet activateur sur la transcription (Strahl et al., 1999). Chez *S. pombe*, une méthylation de la lysine 4 est détectée dans l'euchromatine. Cette méthylation de l'histone H3 est fréquente chez *S. cerevisiae*. Il semble qu'elle soit associée à la fois à l'activation et à la répression transcriptionnelle. Le nombre de méthylation d'un résidu joue un rôle capital. La lysine 4 est en effet diméthylée dans les régions codantes. Il semble qu'elle participe à l'activation transcriptionnelle en bloquant la déacétylation des régions concernées (Bernstein et al., 2002 ; Dover et al., 2002).

#### 2.4-La phosphorylation des histones :

La phosphorylation des histones, comme leur acétylation, modifie leur charge. La fonction de la phosphorylation de l'histone H3 n'est pas claire. La modification de la sérine 10 a été impliquée dans la condensation (Van Hooser et al., 1998 ; Wei et al., 1999) et dans la cohésion des chromosomes (Kaszas and Cande, 2000). Cependant un rôle direct de cette phosphorylation a été remis en cause (De la Barre et al., 2001). La phosphorylation des histones a aussi été impliquée dans l'activation transcriptionnelle (Berger, 2001). La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 module l'activité d'acétylation. Des études chez *S. cerevisiae* ont montré que certains gènes dont l'activation est dépendante de l'histone acétyltransférase Gcn5 sont également dépendants de la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (Lo et al., 2000).



Il existe donc des coopérations entre les différentes machineries de modifications des histones qui permettent de réguler leurs activités.

### *3-Remodelage de la chromatine par des complexes ATP-dépendants :*

Différents complexes de remodelage de la chromatine sont classés en quatre groupes, SWI/SNF, ISWI, MI-2/CHD et INO80, en fonction de leur sous-unité catalytique. Leur domaine ATPase est conservé et ressemble à celui d'ADN hélicases (Shen et al., 2000).

Le premier membre de la famille ISWI est le complexe de drosophile NURF (*NUcleosome Remodeling Factor*). En plus de NURF, la famille ISWI contient entre autres les complexes de drosophile CHRAC (*CHromatin Remodeling and Assembly Complex*) et ACF (*ATP-utilizing Chromatin remodeling and assembly Factor*), de levure ISW1 et ISW2, humains RSF (*Remodeling and Spacing Factor*), WCRF (*Williams syndrome transcription factor Chromatin Remodeling Factor*), CHRAC et NoRC (*Nucleolar Remodeling Complex* ; Langst and Becker, 2001).

La famille MI-2/CHD est caractérisée par son ATPase fondatrice qui est la protéine humaine Mi-2 (Zhang et al., 1998). Cette protéine possède un chromodomaine et appartient au complexe NuRD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylating* ; Xue et al., 1998)

Concernant la famille INO80, la protéine Ino80 représente un nouveau type d'ATPase. En effet, son domaine ATPase est éclaté en deux sous-domaines. L'aptitude du complexe INO80 à remodeler la structure de la chromatine a été démontrée *in vitro* (Shen et al., 2000)

Dans cette introduction, nous allons détailler les caractéristiques du complexe SWI/SNF (pour *mating type SWItching/Sucrose Non Fermenting*) car il est déjà montré qu'il s'associe *in vivo* avec EKLF, le facteur de transcription auquel on s'intéresse (voir la section B de l'introduction). SWI/SNF est le premier complexe de remodelage de la chromatine à avoir été isolé chez la levure (Winston et Carlson, 1992). Des études génétiques et biochimiques ont par la suite montré que ces différentes protéines forment un même complexe, composé d'au moins 11 sous-unités (Côté et al., 1994).

Il a été établi que SWI/SNF est capable de modifier le positionnement et la structure des nucléosomes (figure 2) de manière ATP-dépendante (Kingston and Narlikar, 1999). L'activité ATPase est portée par la sous-unité Swi2/Snf2 (Laurent et al., 1993). Cette protéine définit une classe d'ATPase impliquée dans le remodelage de la chromatine.

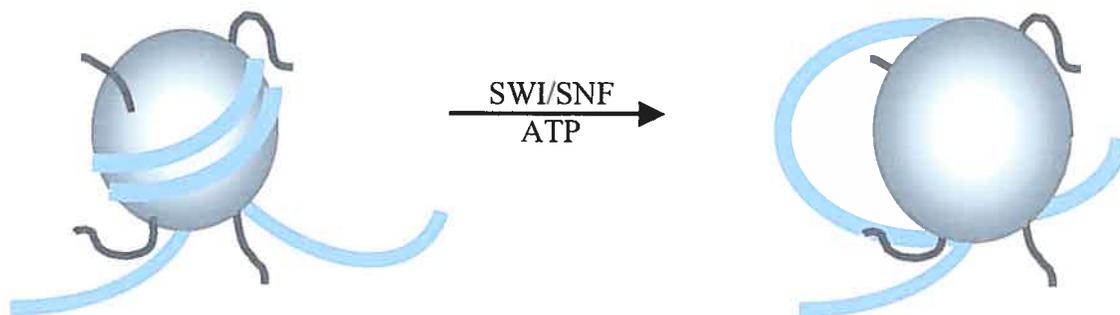


Figure 2 : schéma montrant le déplacement du « core » du nucléosome (l'octamère des histones : Cercle gris) par le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF. ADN : violet, Les extrémités des histones : filaments gris foncés.

La répartition dans le génome des gènes dont la transcription est dépendante de SWI/SNF est homogène. Ceci montre que ce complexe ne régit pas à la transcription de domaines chromatiniens particuliers, mais que ce contrôle s'exerce individuellement sur chaque gène (Holstege et al., 1998 ; Sudarsanam et al., 2000).

Le fait que SWI/SNF ne soit pas requis pour la transcription de la totalité du génome indique soit qu'il n'intervient effectivement qu'au niveau d'un nombre restreint de gènes, soit que sa fonction est partiellement redondante avec celle d'un autre facteur (de remodelage ou de modification des histones). En dehors de ces fonctions transcriptionnelles, le complexe SWI/SNF semble également impliqué dans la réplication de l'ADN (Flanagan et Peterson, 1999).

Les mécanismes de modifications covalentes des histones et de remodelage des nucléosomes ne sont pas indépendants. Une des implications de la théorie du code des histones est que ces différentes machineries peuvent s'influencer mutuellement. L'action des complexes de modification des histones et de remodelage de la chromatine peut être

ciblée au niveau de certains promoteurs. Certains régulateurs transcriptionnels interagissent avec les deux types de machineries, ce qui suggère que les deux mécanismes peuvent coopérer (Agalioti et al., 2000 ; Fazzio et al., 2001).

### **B-Le Locus de la $\beta$ globine :**

Les gènes de la famille de globine des vertébrés ont été intensivement étudiés. Ils constituent en effet un outil pour la compréhension des mécanismes moléculaires à la base de la diversité génique d'une part et d'autre part, ils représentent un modèle remarquable pour l'étude des structures, fonctions et régulations de l'expression des gènes d'eucaryotes: l'étude de la régulation des gènes de globine a permis une avancée importante dans la compréhension des mécanismes contrôlant la transcription des gènes au cours de la différenciation tissulaire et du développement.

Les hémoglobines humaines sont des tétramères constitués de deux types de sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans le globule rouge de l'adulte sain, trois hémoglobines différentes coexistent : L'hémoglobine A ou adulte ( $\alpha_2 \beta_2$ ) qui représente la majorité des hémoglobines retrouvées dans le globule rouge (97% de l'hémoglobine totale), l'hémoglobine A<sub>2</sub>, ( $\alpha_2 \delta_2$ ) qui constitue moins de 3% des hémoglobines érythrocytaires et l'hémoglobine F ou fœtale ( $\alpha_2 \gamma_2$ ) qui est présente à l'état de traces (moins de 1% ; Koshe et al., 1985).

Cinq gènes fonctionnels et un seul pseudogène forment le locus de la  $\beta$  globine qui s'étend sur 50 kb. On retrouve, chez l'humain, de 5' à 3' le gène embryonnaire  $\epsilon$ , les deux gènes fœtaux  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ , et les gènes adultes  $\delta$  et  $\beta$ . Chez la souris, les gènes sont organisés de 5' à 3' selon :  $\epsilon y$ ,  $\beta H1$ ,  $\beta$  majeur et  $\beta$  mineur (figure 3). En amont du gène embryonnaire du locus, se trouve une région régulatrice dont l'importance dans l'expression des gènes a été démontrée par de nombreux travaux: le LCR (Locus Control Region). Au niveau du locus- $\beta$ , tous les gènes de globine sont disposés suivant l'ordre

dans lequel ils s'expriment au cours du développement: 5'  $\epsilon$ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\delta$ - $\beta$  3'. De même chez la souris (Myers et al., 1986).

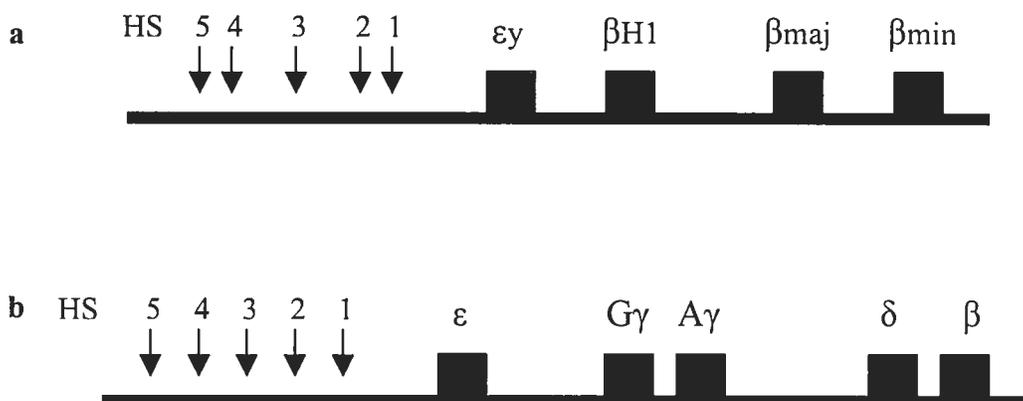


Figure 3 : Les locus de la  $\beta$  globine de souris (a) et chez l'humain (b). Elle montre les gènes de chaque locus et les sites Hypersensibles (HS, flèches noires) au niveau du LCR. Les boîtes noires représentent les gènes.  $\epsilon$  : epsilon, maj : majeur, min : mineur.

Les gènes de globine présentent une double spécificité: tissulaire et du stade de développement.

\* *Spécificité tissulaire* : les gènes de globine ne s'expriment que dans les cellules et tissus strictement érythroïdes dont l'emplacement évolue en fonction du développement ontogénique : sac vitellin lors de la période embryonnaire, foie et rate lors de la vie fœtale et moelle osseuse au stade adulte. (Behringer et al., 1987)

\* *Spécificité du stade de développement* : les gènes sont activés d'une façon séquentielle au cours du développement ontogénique résultant en une double commutation (*switch*) d'hémoglobine, observée d'abord lors du passage de la vie embryonnaire à la vie fœtale (hémoglobine embryonnaire – hémoglobine fœtale) puis de la vie fœtale à la vie adulte (hémoglobine fœtale – hémoglobine adulte) chez l'Homme. Chez la Souris, une seule commutation a été retrouvée: hémoglobines embryonnaire et fœtale-hémoglobine adulte. Ce sont les gènes  $\epsilon\gamma$ ,  $\beta H1$ , homologues des gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$  humains, et ne s'exprimant que dans le sac vitellin qui produisent les hémoglobines embryonnaires et fœtales. Après leur extinction, la synthèse d'hémoglobines adultes,

assurée par les gènes  $\beta$ Majeur et  $\beta$ Mineur, n'a lieu que dans les cellules érythroïdes définitives. (Antoniou et al., 1988)

Cette double spécificité de l'expression des gènes de globine est le reflet de multiples interactions entre les régions régulatrices (LCR) et les régions promotrices des gènes d'une part et les facteurs protéiques agissant en *trans* d'autre part (Collis et al., 1990).

### *1-Structure des gènes du locus de la $\beta$ globine :*

La structure de tous les gènes de globine est identique : trois exons séparés par deux introns (*intervening sequence* ou IVS); le second intron étant plus long que le premier dans la famille des gènes  $\beta$  globine. Cette similitude de structure a été conservée tout au long de l'évolution des gènes de globine des vertébrés. Il existe peu d'homologie de séquence entre les IVS2 des gènes de  $\beta$  globine à l'exception de ceux des gènes  $A\gamma$  et  $G\gamma$ . Toutefois les séquences consensus en 5' et 3' des IVS1 et IVS2, nécessaires à l'excision et à l'épissage, ont été hautement conservées. (Papadakis et Patrinos, 1999)

Comme chez tous les eucaryotes, la synthèse de globine débute par celle des transcrits primaires d'ARN, leur maturation nucléaire et leur transport vers le cytoplasme où se fera la traduction de l'ARNm. Les gènes  $\epsilon$ ,  $A\gamma$ ,  $G\gamma$ ,  $\delta$  et  $\beta$  globine codent tous des chaînes de 146 acides aminés. Les chaînes  $\delta$  et  $\beta$  ne diffèrent que par 10 acides aminés et les chaînes fœtales par un seul acide aminé ( position 136) alanine pour  $A\gamma$  et glycine pour  $G\gamma$  (Russel et Liebhaber, 1996).

### *2- Régulation de la transcription des gènes de globine :*

La régulation de la transcription des gènes de globine requiert trois éléments: les séquences *en cis* (promoteurs, "*enhancers*" et "*silencers*"), le LCR (activateur de l'ensemble du locus) et les facteurs protéiques nucléaires ou facteurs transcriptionnels érythroïde-spécifiques et ubiquitaires. L'interaction physique du LCR avec les régions promotrices *via* les facteurs trans-régulateurs est nécessaire à l'activation transcriptionnelle des gènes.

### 2-1- Séquences *cis*-régulatrices :

Dans le locus de la  $\beta$  globine, chaque promoteur proximal (région de 150 pb environ flanquant en 5' le gène structural) est caractérisé par une combinaison unique de séquences ADN, hautement conservées pendant l'évolution, et liant différents facteurs transcriptionnels (GATA-1, NF-E2 et EKLF) dont la coopération est essentielle à une expression appropriée.

Les éléments régulateurs en 5' des gènes structuraux sont la boîte TATA, présente dans tous les promoteurs, et où se forme le complexe basal d'initiation de la transcription, les boîtes CACCC, CCAAT et la séquence consensus fixant le facteur érythroïde spécifique GATA-1.

Dans cette étude on s'intéresse au promoteur du gène  $\beta$ . La régulation de l'expression du gène de la  $\beta$  globine est assurée aussi bien par des séquences présentes dans les 160 pb qui constituent le promoteur proximal que par des éléments dans le gène structural lui-même (IVS2) et dans les séquences le flanquant en 3' (Antoniou et al., 1998; Rubin et al., 2000).

C'est l'étude, d'abord phénotypique puis fonctionnelle, des mutants naturels  $\beta$  thalassémiques ayant un défaut moléculaire au niveau de certaines séquences nucléotidiques dans le promoteur qui a permis d'assigner un rôle précis, dans la synthèse de la chaîne  $\beta$  globine, aux différents éléments proximaux ainsi qu'aux facteurs protéiques régulateurs s'y fixant.

Des mutations affectant différents nucléotides de la boîte TATA, (séquence ATAAA, située entre -27 et -31), ont été décrites: en -30 T  $\rightarrow$  C (Cai et al., 1989), en -29 A  $\rightarrow$  G (Antonarakis et al., 1984), en -28 A  $\rightarrow$  G (Orkin et al., 1983; Pawar et al., 1997) et en -31 A  $\rightarrow$  G. Toutes ces mutations se traduisent sur le plan phénotypique par une  $\beta^+$  thalassémie (réduction très modérée de la production des chaînes  $\beta$ ) due à une diminution de l'efficacité transcriptionnelle comme l'ont montré les analyses fonctionnelles (Surrey et al., 1985; Takihara et al., 1986). Sur le plan moléculaire, elles affectent la fixation de TBP au niveau de la boîte TATA (Antoniou et al., 1995). Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont montré que des mutations affectant la fixation de Sp1 en -19, GATA-1 en -12 et +5, YY1 en -9 n'altèrent pas la quantité des transcrits  $\beta$  globine.

L'unique boîte CAAT (-72 à -76) fixe GATA-1, CP1 (Antoniou et al., 1988; DeBoer et al., 1988) ainsi que deux autres facteurs ubiquitaires désignés comme DSF-1 (*Differentiation-Specific Factor*), et DSF-r (*Differentiation-Specific Factor-related*) (Delvoye et al., 1993) de la famille des C/EBP (*CAAT Enhancer Binding Protéin*). DSF-1 ou C/EBP $\gamma$ , ne peut agir qu'en synergie avec CP1 (Wall et al., 1996). L'implication de C/EBP $\gamma$ , dans l'activation stade-spécifique du gène  $\beta$  globine par le LCR demeure controversée (Zafarana et al., 2000).

Le promoteur  $\beta$  globine possède deux boîtes CACCC: Une proximale (-86 à -90) et une distale (-101 à -105). La boîte proximale fixe EKLF (*Erythroïd Krüppel Like Factor*) (Miller et Bieker, 1993) avec une affinité plus élevée, (Mantovani et al., 1988; Hartzog et Myers, 1993). Ce facteur est nécessaire à l'expression du gène  $\beta$  (stade adulte) (Perkins et al., 1995; Wijgerde et al., 1996; Guy et al., 1998).

Les différentes mutations, en -90, -87, -88, dans le motif CACCC proximal résultent en une  $\beta^+$  thalassémie. Celle-ci est due à une diminution de la fixation d'EKLF sur sa séquence consensus (Feng et al., 1994; Faustino et al., 1996); Alors que la seule mutation détectée en -101 (CACCC distale) est associée à une  $\beta$  thalassémie silencieuse (Gonzales-Redondo et al., 1989, Baysal et al., 1994). Ces données suggèrent que la boîte distale ne joue pas un rôle important dans la transcription du gène  $\beta$  globine.

En plus des régions promotrices situées en 5' du gène, d'autres séquences *en cis* régulent positivement (*enhancers*) ou négativement (*silencers*) l'expression des gènes de globine.

## 2-2 Le LCR:

La régulation de l'expression des gènes du locus de la  $\beta$  globine s'effectue en partie à travers l'interaction de leurs séquences régulatrices, en particulier le promoteur avec des facteurs protéïques nucléaires. Toutefois cette régulation ne peut pleinement s'exercer qu'en présence d'une région éloignée des gènes structuraux ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\beta$ ), différente des *enhancers* et située en 5' du Locus  $\beta$ : le LCR ou Locus Control Region. Cette région, dont l'importance a été soulignée par de nombreux travaux, intervient à différents niveaux de régulation et possède plusieurs propriétés dont le niveau d'expression tissu-spécifique élevé des gènes du locus.

### 2.2.1-Propriétés du LCR :

Les travaux de Grosveld et al. (1987) ont montré, en souris transgénique, l'importance fonctionnelle du LCR. Dans une construction incluant les régions 5' et 3' du cluster  $\beta$  humain ainsi que le gène  $\beta$  globine, ces auteurs ont montré que le niveau d'expression du transgène est non seulement élevé et au moins équivalent à celui du gène  $\beta$  globine murin mais qu'il est aussi directement corrélé au nombre de copies intégrées dans le génome hôte. De plus, le gène  $\beta$  globine humain s'exprime indépendamment de son site d'intégration.

Le LCR est caractérisé par quatre propriétés majeures:

- \* C'est un puissant activateur transcriptionnel, tissu-spécifique, des gènes *en cis*.
- \* Il abolit l'effet de position car il est capable de conférer au transgène une expression indépendante de son site d'intégration en l'isolant de l'environnement chromatinien du génome hôte (Forrester et al., 1989; Collis et al., 1990; Fraser et al., 1990)
- \* Il influe sur l'origine et la temporalité de la réplication d'ADN.
- \* Il intervient dans l'ouverture du domaine chromatinien. L'implication du LCR $\beta$  a été suggérée par l'analyse *in vivo* (Driscoll et al., 1989) et *in vitro* (Fraser et al., 1990) de la ( $\gamma\delta\beta$ ) thalassémie hispanique où tout le cluster  $\beta$  globine est dans une conformation chromatinienne fermée et résistante à la Dnase-I résultant en une inactivation des gènes *en cis*.

C'est cette propriété du LCR qui permettrait d'une part une expression transgénique corrélée au nombre de copies intégrées dans le génome hôte et d'autre part une transcription efficace des gènes du locus de la  $\beta$  globine humain, dans leur contexte chromosomique d'origine, en rendant l'ADN accessible aux facteurs de transcription. Toutefois de nouvelles données suggèrent que le rôle majeur du LCR réside dans l'activation de la transcription des gènes *en cis* et non dans l'ouverture de la structure chromatinienne qui serait assurée quant à elle par une acétylation générale des histones du locus (Schübeler et al., 2000). L'ouverture de la structure chromatinienne reste généralement nécessaire à un niveau élevé de transcription. Cependant, une étude récente montre que la chromatine est accessible et ouverte au niveau du LCR dans des cellules progéniteurs hématopoïétiques (HPCs) non commises, c'est à dire qu'elles sont



multipotentes et ne sont pas engagées dans une voie de différenciation (Bottardi et al., 2003).

### 2.2.2-Les sites hypersensibles du LCR (HSs) :

Afin de définir de manière précise la fonction de chaque site hypersensible (HS), de mettre en relief les caractéristiques communes et le degré de coopération des sites HS dans la régulation de l'expression des gènes *en cis*, mais également de déterminer les séquences minimales nécessaires au maintien des propriétés du LCR du locus  $\beta$ , diverses constructions ont été testées *in vivo* et *in vitro*. Il s'agit plus particulièrement du LCR dont un ou plusieurs sites HSs ont été délétés (Milot et al., 1996, Bungert et al., 1995), ou du LCR avec tous les sites HSs mais dont la taille a été réduite de manière à obtenir des mini locus (LCR de 6.5 au lieu de 20 kb) (Talbot et al., 1989) et micro locus (2.5kb) (Forrester et al., 1989).

Ces études ont permis de caractériser chaque site HS et de localiser dans les sites HS4 (Lowrey et al., 1992; Pruzina et al., 1991), HS3 (Philipsen et al., 1990 ; 1993 ) et HS2 (Collis et al., 1990 ; Talbot et al., 1990) des séquences minimales ou régions "cores" de 200 à 500 bp.

L'importance fonctionnelle de ces régions, hautement conservées durant l'évolution (Moon et Ley; 1990 ; Jimenez et al., 1992), a été confirmée par analyse phylogénique (Hardison et al., 1997). Ces séquences minimales reproduisent toutes les propriétés du LCR complet: niveau d'expression élevé en fonction du nombre de copies intégrées et indépendamment du site d'intégration Ces séquences correspondent aux régions accessibles à l'action des nucléases grâce au déplacement d'un ou de deux nucléosomes. Elles ont alors la capacité de fixer des facteurs protéiques ubiquitaires ou érythroïdes spécifiques et d'induire l'activation transcriptionnelle des gènes, *en cis* et à des stades de développement précis.

Le taux de transcription le plus élevé n'est observé qu'en présence du LCR complet c'est à dire en présence de tous les sites (Talbot et al., 1989 ; Pasceri et al., 1998). Cependant l'activité majeure du LCR semble résider au niveau des sites HS2 et HS3.

### \*Site HS1 :

Ce site situé à environ 6 kb en amont du gène  $\epsilon$ , joue un rôle important dans l'expression indépendante de la position du gène  $\beta$  globine humain. En fait le HS1 seul ne prévient pas la position d'effet mais un LCR sans HS1 ne prévient pas efficacement contre la position d'effet (Milot et al., 1996). *In vivo*, il est incapable d'activer le gène  $\beta$  globine (Driscoll *et al.*, 1989) alors qu'*in vitro* il en induit très faiblement l'expression (en comparaison avec les autres sites HS) (Fraser et al., 1990) et à n'importe quel stade de développement (Fraser et al.; 1993). Des données récentes indiquent qu'une activation optimale du gène  $\beta$  requiert la présence du site HS1 dans le LCR. Ce site fixe les facteurs érythroïde spécifique GATA-1 et ubiquitaire SP1 (Hardison et al., 1997; Pasceri et al., 1998).

### \*Site HS2 :

Le site HS2 seul peut activer le gène  $\beta$  globine en *cis* (Fraser et al., 1990). En souris transgénique, la délétion de ce site est favorable à l'expression anormale des gènes de la globine (Milot et al., 1996). L'activation par le site HS2 représente 40 à 50% de celle obtenue en présence de tous les sites HS (Collis et al., 1990; Talbot et al., 1990) et persiste même lors d'essais de transfections à expression transitoire (Tuan et al., 1989). Cette propriété, caractéristique du site HS2, est due à la présence d'un *enhancer* puissant (Ney et al., 1990.1; 1990.2; Liu et al., 1992; Chang et al., 1992) spécifique de HS2 car sa délétion (Bungert et al., 1999) ou sa substitution par un *enhancer* ubiquitaire abolit son potentiel transcriptionnel (Tanimoto et al., 1999). Par contre, il paraît qu'un transgène HS2-gène $\beta$  en copie multiple peut fonctionner comme un LCR dans des souris transgéniques (Ellis et al., 1993 ; 1996). L'activité *enhancer* érythroïde spécifique du site HS2 est localisée dans une séquence de 46pb (Sorrentino et al.; 1990) et ne peut être induite qu'après la fixation d'AP1 (Activating Protein 1) et de NF-E2 en tandem (Moi et Kan, 1990 ; Bean et Ney, 1997 ; Forsberg et al., 2000). En fait, l'activation des gènes en *cis* par l'*enhancer* nécessite la formation d'un complexe multiprotéique (Talbot et al., 1991) comprenant notamment GATA-1 (Reddy et Shen, 1991). En 3' du « *enhancer* » de HS2 existe une séquence « *silencer* » polymorphe de type (AT)<sub>x</sub> N<sub>12</sub> (AT)<sub>y</sub>, fixant une protéine répressive BP1 (Labie et Elion, 1996). Un second élément de 20 pb régulant

négativement l'activité enhancer du site HS2 et situé en 5' des séquences cores ou minimales a été décrit récemment (Elnitski et al., 2001).

**\*Site HS3 :**

En souris transgénique, la délétion du site HS3 entraîne une forte diminution de l'expression du gène de la  $\beta$  globine humain ainsi qu'une susceptibilité accrue à l'effet de position (Fraser et al., 1990; Bungert et al., 1995; Milot et al., 1996).

C'est une région de 225 pb qui serait directement impliquée dans la régulation de la transcription indépendamment du site d'intégration (Philipsen et al., 1990) et dans l'ouverture de la structure chromatinienne. Cette propriété est due à l'existence d'une combinaison spécifique de motifs répétitifs fixant GATA-1 en amont des séquences liant Sp1 et en aval (Philipsen et al., 1993). Des sites de fixation pour EKLF (Gillemans et al., 1998) ainsi que pour YY1 ont été également retrouvés dans cette séquence (Shelton et al., 1997).

L'activation transcriptionnelle par HS3 observée en lignée cellulaire n'a pas été établie lors des transfections à expression transitoire. Ce qui signifie que le site HS3, contrairement à HS2, nécessite une intégration chromatinienne afin d'être actif (Moon et Ley 1991; Hug et al., 1992). Le HS3 possède une activité d'ouverture et de remodelage de la structure de la chromatine (Ellis et al., 1996)

**\*Site HS4 :**

Le site HS4 et plus précisément une région de 280 pb a un effet positif sur l'expression du gène  $\beta$  globine en souris transgénique ou en cellule MEL (Pruzina et al., 1991). Il contient des sites de fixation pour GATA-1, NF-E2 et SP1 (Lowrey et al., 1992). La fixation concomitante de GATA-1 et de NF-E2 (facteurs érythroïde-spécifiques) serait nécessaire à la formation d'une structure chromatinienne hypersensible à la DNase I (Stamatoyannopoulos et al., 1995; Pomerantz et al., 1998). Le HS4 contient un HSFE (*Erythroid-Specific hypersensitive-site Forming Element*) qui est capable d'augmenter l'expression du gène  $\beta$  placé en aval dans des souris transgéniques (Nemeth et al., 2001).

### **\*Site HS5 :**

Dans le LCR du locus de la  $\beta$  globine, le site HS5 est le seul qui ne soit pas érythroïde spécifique (Tuan et al., 1985; Forrester et al., 1987) et sa fonction précise demeure encore inconnue. Par contre, le HS5 est hématopoïétique spécifique ; il a une activité *insulator* stage-spécifique du développement (Wai et al., 2003).

Des différents travaux sont effectués sur les relations structure-fonction des sites HS du LCR  $\beta$  globine humain et il ressort qu'il existe une similitude dans l'arrangement des sites de fixation des protéines régulatrices importantes que sont GATA-1, NF-E2, EKLF, YY1 et Sp1 dans les séquences minimales des sites HS2, HS3 et HS4. Cependant des spécificités fonctionnelles caractérisent chaque site. Ainsi HS2 est le seul à avoir une activité *enhancer* classique définie par les transfections à expression transitoire, et directement liée à la fixation de NF-E2.

### 2.3- Facteurs de transcription :

Un facteur de transcription est une protéine définie par sa capacité à reconnaître, à se lier à une séquence spécifique d'ADN et à moduler, négativement ou positivement, l'expression du gène cible. Toutefois, un facteur de transcription intervient rarement seul dans la régulation de l'expression du gène qui est le plus souvent assurée par un complexe protéique. Les facteurs de transcription contrôlant l'expression des gènes de globine peuvent être subdivisés en deux groupes: les facteurs érythroïdes spécifiques comme (GATA1, NF-E2 et EKLF), et les facteurs ubiquitaires (comme YY1, Sp1) et cofacteurs (comme CBP).

#### *2.3-1 Facteurs érythroïdes-spécifiques :*

Les trois facteurs de transcriptions érythroïdes-spécifiques les plus importants dans la régulation du gène  $\beta$  sont : GATA-1, NF-E2 et EKLF.

### \*GATA-1

Comme les autres membres de la famille GATA, GATA-1 comporte 2 domaines similaires dits en doigt de gant ou *zinc finger* dont la base est constituée par 4 cystéines

liées à un ion  $Zn^{++}$  (Ko et Engel, 1993). C'est le domaine C terminal qui est nécessaire à la fixation de GATA-1 à sa séquence consensus nucléotidique [(A/T) GATA (A/G)] (d'où son nom) alors que le domaine N-terminal assure la stabilité du complexe ADN-protéine (Yang et Evans, 1992).

Alors que GATA-2 est retrouvé dans les cellules érythroïdes, nerveuses, endothéliales et cardiaques; GATA-3 dans les lymphocytes T et tissus nerveux; GATA-4 et -6 dans les cellules cardiaques et intestinales, et GATA-5 dans le cœur et les poumons (Laverriere et al., 1994 ; Pandolfi et al., 1995; Ting et al., 1996 ; Tsai et Orkin, 1997), seul GATA-1 est retrouvé exclusivement dans les cellules hématopoïétiques (Tsai et al., 1989; Yamamoto et al., 1990). Il se fixe sur sa séquence consensus dans les promoteurs des gènes de globine (Tsai et al., 1989; Evans et Felsenfield, 1989) ainsi que dans les séquences « cores » des sites HS du LCR suggérant un rôle clé de GATA-1 dans la régulation de l'expression des gènes du locus  $\beta$ . Ce facteur de transcription qui reconnaît également le motif (T/C) AAG, retrouvé dans la boîte CCAT distale du gène  $A\gamma$ , interviendrait dans l'extinction de l'expression de ce gène au cours du développement.

L'expression de GATA-1 est particulièrement importante dans les lignées érythroïdes et mégacaryocytaires. L'absence de GATA-1 provoque un arrêt du développement au stade pro-érythroblaste (Pevny et al., 1991; Fujiwara et al., 1996; Weiss et al., 1997) dans les cellules de la lignée érythrocytaire et une thrombocytopénie due à l'absence de différenciation et de maturation des mégacaryocytes. Ces résultats obtenus *in vitro* (modèles cellulaires) et *in vivo* (souris déficientes en GATA-1) ont été corroborés récemment par la mise en évidence d'une anémie dysérythropoïétique et une thrombocytopénie liées au X chez l'Homme (Nichols et al., 2000), le gène GATA-1 ayant été localisé sur ce chromosome (Zon et al., 1990). Ces syndromes résultent de la substitution d'une méthionine par une valine dans la structure primaire de la protéine GATA-1, substitution qui empêcherait la fixation d'un cofacteur essentiel à l'activité de GATA-1, le FOG-1 (*Friend of GATA-1*) (Tsang et al., 1997, 1998; Fox et al., 1998, 1999). La régulation de la fonction érythropoïétique requiert également l'interaction de GATA-1 avec d'autres facteurs tels que EKLF et Sp1 (Mérika et Orkin, 1995 ; Gregory et al., 1996) et la présence de GATA-2 (Tsai et Orkin, 1997). D'autres facteurs

interviendraient, en synergie avec GATA-1, dans la différenciation et la maturation des cellules érythroïdes (Wadman et al., 1997, Begley et Green, 1999). Dans des cas leucémiques, GATA-1 interagit avec PU.1, un oncogène impliqué dans l'érythro-leucémie chez la souris (Cantor et Orkin 2002). GATA-1 interagit avec l'histone acétyl-transférase CBP/p300 et aboutit à l'acétylation des histones au niveau du LCR et du promoteur de  $\beta$  majeur (Blobel et al., 1998 ; Letting et al., 2003).

L'expression du gène GATA-1 est régulée au niveau transcriptionnel (Tsai et al., 1991; Seshesayee et al., 2000) et post-transcriptionnel (Partington et Patient, 1998), l'affinité de GATA-1 pour son site de fixation dépendant de son degré de phosphorylation.

### **\*NF-E2**

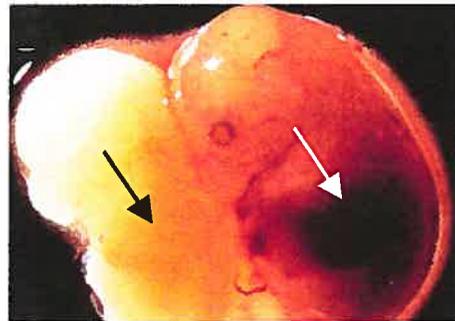
NF-E2 est un hétérodimère constitué de deux sous-unités protéiques 45 (p45) et 18 kDa (p18). L'élément p45 n'est retrouvé que dans les cellules des lignées érythrocytaire et mégacaryocytaire (Andrews et al., 1993.1) comme GATA-1. Chez l'Homme, il est codé par un gène localisé sur le chromosome 12 en 12q13 (Ney et al., 1993).

L'activation de p45 nécessite son interaction avec p18, une protéine ubiquitaire de la famille MAF (Igarashi et al., 1994; Andrews et al., 1993.2). C'est p18 qui reconnaît la séquence consensus de NFE-E2: TGCTGA(C/G)TCA(T/C). Ce motif, sur lequel se fixe également un autre facteur ubiquitaire, AP-1 (Activating-Protein-1), n'a été retrouvé que dans les promoteurs des gènes s'exprimant dans les cellules hématopoïétiques (Mignotte et al., 1989; Andrews et al., 1993.1), et dans les sites HS2, HS3 et HS4 du LCR. La fixation de NF-E2 est nécessaire à l'activité de 5'HS2 (Forsberg et al., 2000). Bien que le rôle de NF-E2 dans la maturation des mégacaryocytes soit bien établi (Shivadsani et Orkin, 1995), son rôle exact dans la régulation de l'expression des gènes de la globine reste encore mal élucidé. Il s'associe avec CBP/p300 mais son implication dans l'acétylation des histones et le remodelage de la chromatine reste controversée (Hung et al., 2001 ; Kiekhäfer et al., 2002 ; Johnson et al. 2002). Il semble que NF-E2 coopère avec les autres facteurs de transcription pour établir un patron d'acétylation et de méthylation des histones surtout avec GATA-1 (Johnson et al., 2002).

### \*EKLF

Ce sont les travaux de Donze et al. (1995) en lignées cellulaires et ceux de Wijgerde et al. (1996) chez la souris transgénique qui ont établi pour la première fois l'implication d'un facteur de transcription, EKLF (Erythroïd Krüppel Like Factor), dans la commutation  $\gamma$  globine- $\beta$  globine. En utilisant comme modèle des souris (embryons) EKLF<sup>-/-</sup> ayant intégré dans leur génome le locus  $\beta$  globine humain (souris transgéniques Hu<sup>+/+</sup> et EKLF<sup>-/-</sup>), Wijgerde et al. (1996) ont montré que l'absence d'EKLF n'influe pas sur l'expression des gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$  mais se traduit par une inactivation totale du gène  $\beta$  globine ainsi que par une augmentation des chaînes  $\gamma$  au stade adulte chez la souris, stade où normalement les transcrits de  $\beta$  sont largement supérieurs à ceux de  $\gamma$  globine.

Figure 4 : deux embryons de souris au jour 14.5 de la gestation. Flèche noire : embryon déficient en EKLF (anémique). Flèche blanche : embryon type sauvage.



Nuez et al. Nature 1995

EKLF, une protéine de 362 acides aminés (chez l'humain, et 376 acides aminés chez la souris), est formé de deux domaines essentiels : un domaine de transactivation riche en proline et un domaine de liaison à l'ADN (DBD : *DNA binding domain*) composé de trois doigts de zinc (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>). Un NLS (signal de localisation nucléaire) est présent entre les deux domaines (revue, Perkins, 1999). EKLF est nécessaire à l'expression du gène  $\beta$ , l'inactivation du gène EKLF provoque une anémie mortelle chez la souris. Les embryons déficients en EKLF meurent environ au jour 15 de la gestation (*in utero*)(Perkins et al., 1995; Nuez et al., 1995; Perkins et al., 2000). Ce facteur reconnaît une séquence de 9 pb 5'CCACACCCT3' (Miller et Bieker, 1993) et possède une forte affinité pour le motif CACCC dans le promoteur du gène de la  $\beta$  globine (Donze et al., 1995), affinité qui dépend de son degré de phosphorylation (Bieker 1998). Cette interaction est spécifique car toute substitution d'un nucléotide dans le motif CACCC se traduit par un phénotype  $\beta^+$  thalassémique *in vivo* (Faustino et al., 1996) et *in vitro* (Feng

et al., 1994; Bieker et Southwood, 1995). C'est d'ailleurs la grande divergence de séquence entre la boîte CACCC du promoteur  $\delta$  et celle de  $\beta$  qui serait à l'origine de l'absence de fixation d'EKLF dans le promoteur  $\delta$  et ne permettrait pas une expression adéquate du gène  $\delta$  globine (Donze et al., 1996).

EKLF s'associe avec le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF *in vivo* et forment le complexe E-RC1 (EKLF coactivator-remodeling complex 1) pour générer un site hypersensible à la DNase-I au promoteur du gène  $\beta$  actif. E-RC1 contient les homologues des sous unités BRG1, BAF170, BAF155 et INI (BAF47) du complexe SWI/SNF chez la levure, aussi bien la sous unité BAF57 des eucaryotes qui est critique pour le remodelage de la chromatine et pour la transcription avec EKLF (Armstrong et al., 1999 ; Brown et al., 2002). D'autre part, EKLF est acétylé par CBP sur les résidus lysine 288 (dans son domaine de transactivation) et 302 (dans son domaine à doigts de Zinc). Son acétylation augmente beaucoup son affinité au complexe SWI/SNF (Zhang et al., 2001). Dans un autre contexte de la globine, avec un gène rapporteur GAL4, EKLF s'associe *in vivo* avec les corépresseurs mSin3A et HDAC1 (histone déacétylase 1) et montre une activité répressive *via* son domaine à doigts de Zinc (Chen et al., 2001).

Bien qu'il soit plus exprimé dans les tissus érythroïdes adultes que fœtaux, EKLF est présent et actif à tous les stades de développement (Donze et al., 1995 ; Tewari et al., 1998). Or ce facteur ne régule pas l'expression stade-spécifique des gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$  globine (Perkins et al., 1995; Nuez et al., 1995 ; Asano et Stamatoyannopoulos, 1998), bien que ces derniers possèdent une boîte CACCC fonctionnelle dans leurs promoteurs respectifs. Des données récentes suggèrent que l'activation transcriptionnelle du gène  $\beta$  par EKLF ne se fait pas uniquement *via* sa fixation au niveau de la boîte CACCC car l'expression de ce gène reste EKLF-dépendante même en absence de boîte CACCC (Guy et al., 2000). Elle dépendrait également du contexte entier du promoteur du gène  $\beta$  globine qui permettrait à EKLF de recruter les éléments nécessaires à la transcription et de former avec les autres facteurs transactivateurs un complexe spécifique, différent de celui du gène  $\gamma$  globine.

Ce concept de coopération et d'interaction entre protéines activatrices a été également émis par Merika et Orkin (1995) qui ont montré que l'interaction physique de GATA-1,



d'EKLF et de Sp1 (une protéine ubiquitaire reconnaissant également le motif CACCC) intervenait dans l'activation de la transcription du gène contigu.

Par ailleurs, le promoteur du gène  $\beta$  globine participerait au recrutement d'EKLF par le site 5'HS3 du LCR (Lee et al., 1999). En plus de ses effets sur l'expression génique, le facteur de transcription EKLF bloque la prolifération cellulaire et l'induction de la différenciation terminale des cellules érythroïdes (Coghill et al., 2001).

Une étude récente (Xue et al., 2004) montre que la voie de signalisation BMP4/Smad joue un rôle critique dans l'induction d'EKLF et qu'une région de 950bp adjacente au site d'initiation de la transcription d'EKLF est suffisante pour une forte transcription hautement érythroïde-spécifique. En utilisant des souris transgéniques avec LacZ, Xue et al. (2004) ont montré que l'expression d'EKLF commence au jour 7.5-8 de la gestation; cette expression montre une spécificité érythroïde stricte.

L'expression du gène  $\gamma$  ne dépend pas de EKLF (Wijgerde et al., 1996) mais de deux autres facteurs de la même famille qu'EKLF mis en évidence récemment, FKLF et FKLF-2 (*embryonic/ Fetal  $\beta$  like globin gene activating Krüppel Like Factor*), (Asano et al., 1999; 2000). FKLF serait spécifique des gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$  alors que FKLF-2 active aussi *in vitro*, quoique à un degré moindre, la transcription du gène  $\beta$  ainsi que d'autres gènes érythroïdes.

### 2.3-2 Facteurs ubiquitaires :

#### \*C/EBPs (CCAAT Enhancer Binding Proteins):

C'est une famille de cofacteurs de transcription impliquée notamment dans la différenciation cellulaire, dont celle des cellules érythroïdes ainsi que dans la régulation de la transcription des gènes. Des modèles de souris *Knock out* pour chaque type de C/EBPs (C/EBP  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , et  $\zeta$ ) ont permis de définir leur rôle dans de nombreux tissus (Lekstrom-Himes et Xanthopoulos, 1998).

#### \*Sp1

D'abord identifié dans un virus (SV 40), Sp1 a été retrouvé dans de nombreuses cellules eucaryotes. Bien que cet activateur transcriptionnel ait une très forte affinité pour la

séquence 5'CCGCCC3' appelée boîte GC (Kadonaga et al., 1987), il peut également se fixer, mais avec une affinité moindre, sur le motif GCCCCACCCC3' (substitution du nucléotide G central par A), et sur les boîtes CACCC des promoteurs de gènes de globine (Yu et al., 1991).

**\*Facteur YY1** (*Yin et Yang 1*)

Appelé ainsi en raison de sa dualité de fonctions car il est tantôt activateur et tantôt répresseur de l'activité transcriptionnelle du gène contigu. Cette double propriété dépend en fait de son interaction directe avec d'autres protéines telles que Sp1 (Lee et al., 1993) ou de la compétition avec d'autres facteurs protéiques pour des séquences consensus qui se chevauchent (Raich et al., 1995). Dans le locus  $\beta$  globine, 21 sites de fixation de YY1 ont été identifiés dont 10 en amont du gène  $\epsilon$  et un en amont de chaque gène  $\gamma$  globine (Gumucio et al., 1996). Selon Raich et al. (1995), YY1 en combinaison avec GATA-1, serait fortement impliqué dans l'inactivation du gène  $\epsilon$  au cours du développement ontogénique.

*3- Régulation de l'expression des gènes du locus de la  $\beta$  globine au cours du développement :*

La régulation différentielle de l'expression des gènes de globine représente un élément-clé dans l'évolution des hémoglobines au cours de l'ontogenèse. Cette régulation est spatio-temporelle car elle implique des mécanismes intervenant dans la spécificité tissulaire (lignée érythroïde uniquement) et dans la spécificité du stade de développement (embryon, fœtus et adulte). Elle repose sur l'action synergique et concertée de plusieurs éléments des séquences d'ADN et de leur interaction avec des facteurs nucléaires érythroïde-spécifiques, stade-spécifiques et ubiquitaires.

3.1-Activation du gène  $\beta$  globine lors du stade adulte :

Au cours de la commutation stade fœtal-stade adulte, se produit un changement subtil et progressif de cet environnement dans lequel interviendrait EKLF, considéré comme le principal facteur impliqué dans cette commutation (Donze et al., 1995; Perkins et al.,

1996). EKLF favoriserait alors l'interaction préférentielle du LCR avec le gène  $\beta$  globine. En effet, chez les souris "knock-out" pour EKLF, et au stade adulte, l'expression de  $\beta$  est fortement réduite alors que celle de  $\gamma$  est élevée (Wijgerde et al., 1996). De plus, Tewari et al. (1998) ont montré qu'une surexpression d'EKLF s'accompagnait d'une commutation précoce.

EKLF se fixe spécifiquement sur les boîtes CACCC du gène  $\beta$  globine (Perkins et al., 1995, Nuez et al., 1995, Lee et al., 2000) et dans le site HS3 du LCR (Tewari et al., 1998; Gillemans et al., 1998; Guy et al., 2000). La fixation simultanée de ce facteur sur le LCR et dans le promoteur du gène  $\beta$  serait requise pour une activation transcriptionnelle du gène  $\beta$  (Gillemans et al., 1998; Lee et al., 1999). Des séquences dans l'intron 2 et dans l'enhancer en 3' du gène  $\beta$  globine seraient nécessaires à son activation par le site HS3 (Rubin et al., 2000). Cette implication du site HS3 dans l'activation de l'expression génique au stade adulte semble contredire Fraser et al. (1993) qui ont montré que le site HS3 est le principal déterminant de l'expression des gènes embryonnaires et fœtaux dans le sac vitellin et le foie fœtal.

L'expression ontogénique des gènes de globine (régulation temporelle) est assurée par l'extinction et la compétition géniques avec la participation du LCR.

Le site HS2 interviendrait d'une manière équivalente à tous les stades et activerait, en tant qu'enhancer, la transcription des gènes *en cis*. (Fraser et al., 1993). Toutefois, il a été montré que la délétion du site HS2 dans le locus  $\beta$  globine murin natif (Fiering et al., 1995) et humain en souris transgénique (Peterson et al., 1996) réduit modérément le taux de transcription et n'influe pas sur le profil d'expression des gènes au cours du développement. Ces données suggèrent donc que le site HS2 n'est pas le seul site dans le LCR à posséder une propriété enhancer et qu'il existerait une redondance des sites HS dans le LCR.

La délétion des séquences minimales et flanquant le site HS3 (2.3 kb) montre qu'il est spécifiquement impliqué dans l'activation du gène  $\epsilon$  dans le sac vitellin embryonnaire et dans celle du gène  $\gamma$  dans le foie fœtal mais elle n'affecte pas, tout comme celle du site HS2, l'expression ontogénique des gènes (Hug et al., 1992; Peterson et al., 1996; 1998). Par ailleurs, la substitution du site HS3 par HS4 ne compense que partiellement la perte

de HS3 alors que le remplacement de HS4 par HS3 n'influe aucunement sur l'expression des gènes (Bungert et al., 1995).

Il est important de noter que la délétion des séquences minimales (séquences "core") du site HS3 (225 ou 234 pb) a un effet beaucoup plus prononcé que celle de 2.3 Kb sur l'expression des gènes (Bungert et al., 1995; Navas et al., 1998). Navas et al. (1998) et Peterson et al. (1998) ont suggéré que la délétion de 2.3kb résulte en une nouvelle conformation du LCR où les sites HSs restants formeraient quand même une structure alternative bien que moins efficace que le LCR entier.

Enfin, il semblerait qu'un changement conformationnel physiologique du LCR puisse intervenir lors des différents stades du développement et que différents sites HS puissent activer le même gène, en particulier  $\gamma$ , mais à des stades de développement différents (Navas et al., 1998).

### 3.2- Interaction LCR-gènes :

Différents modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme de "recrutement" préférentiel des promoteurs de gènes de la globine par le LCR au cours du développement, dont:

#### \*Le modèle d'Engel: (Engel 1993)

Ce modèle propose que le LCR forme des boucles de manière à ce que chaque site HS, à l'exception du site HS1, puisse se lier individuellement au promoteur de chaque gène. La stabilité de cette interaction est variable selon le stade de développement.

#### \*Le modèle de Wijgerde: (Wijgerde et al.,1995)

Il propose que le LCR ne puisse activer qu'un seul gène à la fois. Dans ce modèle, tous les sites HSs du LCR s'associent et forment un holocomplexe qui, par la formation d'une boucle (mécanisme de *looping*), viendrait à proximité du promoteur du gène cible et en augmenterait la transcription *via* la présence de facteurs nucléaires et de co-activateurs. Ce modèle, établi à partir de la quantification des transcrits primaires synthétisés dans les cellules érythroïdes d'embryon de souris transgénique lors de la période de commutation  $\gamma \rightarrow \beta$  (jour 12), suggère que le LCR est une structure

dynamique, capable de se mouvoir d'un gène à un autre par un mécanisme de *flip-flop*, et qui a la capacité de former des interactions avec les promoteurs des gènes  $\gamma$  et  $\beta$  dont le taux de transcription est déterminé par la fréquence, la stabilité et la durée de vie du complexe LCR-promoteur. C'est principalement la disponibilité en facteurs nucléaires et la distance relative par rapport au LCR qui modulerait la fréquence et la stabilité des interactions gène-LCR au cours du développement. L'étude de Dillon et al. (1997) supporte le modèle de la formation de l'holocomplexe et l'interaction directe entre le LCR et les gènes du locus.

\*Le modèle de Bulger et Groudine (Bulger et Groudine, 1999)

Ce modèle propose un mécanisme faisant intervenir une liaison (modèle *linking*) plutôt que la formation d'une boucle (*looping*). Dans ce modèle, le LCR active la formation d'une chaîne constituée de protéines "facilitatrices" qui s'étend le long du locus entre le LCR et les gènes. Quand cette chaîne atteint le promoteur du gène  $\gamma$  lors du stade fœtal (sac vitellin murin et foie fœtal humain), les protéines facilitatrices augmentent la fixation des facteurs transcriptionnels qui activent l'expression du gène  $\gamma$ . Ces protéines agissent également comme une barrière qui inhibe l'extension de cette chaîne, ce qui maintient le gène  $\beta$  en état d'inhibition.

La diversité des modèles proposés et des hypothèses avancées pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression des gènes de globine au cours du développement ainsi que l'obtention de résultats expérimentaux parfois contradictoires montrent que, loin d'être encore élucidée, la régulation épigénétique du locus de la  $\beta$  globine reste un phénomène complexe. D'ailleurs, de nouvelles données suggèrent l'implication d'autres éléments en plus de ceux qui ont été décrits jusqu'ici: facteurs intervenant dans l'ouverture de la structure chromatinienne en amont du gène  $\beta$  globine et permettant une activation de son expression au stade adulte par une fixation accrue des facteurs transcriptionnels (O'Neill et al., 1999) ainsi qu'une perte de sensibilité stade-spécifique vis-à-vis du LCR (Bauchwitz et Costantini, 2000).

### C- Immortalisation cellulaire :

Plusieurs raisons nous ont poussés à immortaliser une nouvelle lignée cellulaire EKLF « Knock out » ; ces raisons sont détaillées dans la section de discussion. D'autre part, nous avons procédé à l'immortalisation de cette lignée à partir d'un foie fœtal de souris en se basant sur deux phénomènes : la déficience en P53 et l'infection des cellules par un rétrovirus J2 codant deux oncogènes, *c-myc* et *v-raf*.

#### *1-La P53 :*

La protéine P53 est un facteur de transcription qui se comporte comme un suppresseur de tumeur (Meek, 1999; Bosari et al. 1995). Le gène de la P53 est le gène que l'on trouve le plus fréquemment muté dans les cancers humains (Ljungman, 2000; Hollstein et al., 1991; Rubin et Fraber J.L. 1994). Il code pour une protéine de 393 acides aminés. La P53 est un facteur de transcription qui induit l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose en réponse à une altération de l'ADN selon le taux de P53, le type de cellule, l'importance de l'altération de l'ADN, la présence ou l'absence de facteurs de survie dans l'environnement externe (May P. et May E., 1999).

La protéine P53 est une protéine considérée comme un facteur suppresseur de tumeur qui agit comme régulateur négatif de la croissance cellulaire en induisant l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. En effet l'activation de la P53 après une altération de l'ADN mène à l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre, soit une réparation de la cellule soit son apoptose, ce qui empêche la survenue de mutations dans la cellule et le développement d'une tumeur (Meek, 1999; Bosari et al. 1995). Pour acquérir son avantage de prolifération, qui est à la base de la création d'une tumeur, les 2 allèles de la P53 doivent être inactivés (Hunter et al., 1993).

Après une altération de l'ADN la protéine P53 s'accumule et augmente sa capacité à lier l'ADN, permettant ainsi l'activation de la transcription. Ceci mène à une activation des gènes dont les produits favorisent l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la réparation

de l'ADN (Albrechtsen et al., 1999; Lakin et Jackson, 1999; Matlashewski, 1999). La protéine P53 agit en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en G1 ; ce qui est supposé prévenir la réplication de l'ADN endommagé et permettre sa réparation avant l'entrée de la cellule en phase S (May P. et May E., 1999).

Pour induire l'apoptose de la cellule, l'arrêt du cycle cellulaire se fait en G2 via l'induction de l'expression de la protéine  $\sigma$  14-3-3 (Lakin et Jackson, 1999). La P53 peut fonctionner via un mécanisme indirect, qui implique la séquestration des facteurs de transcription, ou via un mécanisme direct impliquant l'inhibition de gènes spécifiques par une déacétylation des histones (Ljungman, 2000).

Alors, la P53 est impliqué dans la restriction du potentiel de la division cellulaire. Après un nombre limité de divisions (la limite de Hayflick), les cellules normales entre en sénescence alors que les cellules tumorales sont immortelles (Bond et al., 1994).

### *2-Les proto-oncogènes myc et raf :*

Concernant les proto-oncogènes *myc* et *raf*, plusieurs lignées cellulaires ont été immortalisées en les infectant par des rétrovirus exprimant ces deux oncogènes. Rapp U.R. et al. (1985) ont montré que des souris infectées avec un rétrovirus recombinant murin exprimant les oncogènes *raf* et *myc* développent des néoplasies hématopoïétiques. En utilisant ce rétrovirus (J2) produit par une lignée cellulaire (la lignée J2, Rapp U.R. et al., 1985), plusieurs lignées cellulaires ont été immortalisées. Des cellules rénales primaires de souris ont été immortalisées par infection avec le rétrovirus J2 (Dambrough et al., 1992). En 1993, avec le même rétrovirus (J2), Adami et al. ont immortalisé des macrophages. Ces mêmes études ont montré aussi que dans plusieurs cas, le rétrovirus J2 aboutissait à la mort des cellules par apoptose.

Ce phénomène a été résolu par Hermeking et Eick en 1994. Ils ont montré que, dans des cellules type-sauvage, l'oncogène *myc* induit l'apoptose, alors que dans des cellules déficientes en P53 (P53<sup>-/-</sup>), *myc* inhibe l'apoptose et permet aux cellules de ré-entrer dans le cycle cellulaire après l'arrêt de ce dernier en phase G1. Sachant que la P53

inhibe la progression du cycle cellulaire par activation directe de la P21 (un inhibiteur des cdks : *cyclin dependent kinases*) et que le proto-oncogène *myc* induit la progression du cycle cellulaire en absence des facteurs de croissance, Hermeking et al. (1995) ont montré que *myc* abroge l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 induit par P53 et il permet aux cellules de ré-entrer dans le cycle cellulaire sans augmentation de l'expression des cdks. Cela suggère que *myc* s'interfère avec l'action inhibitrice de P21.

Myc est une phosphoprotéine nucléaire avec une capacité de liaison à l'ADN séquence-spécifique; il montre une synergie avec l'oncogène *raf* (Cleveland et al., 1994). L'oncogène *v-raf*, et pas *c-raf*, aide les cellules à être indépendantes des facteurs de croissance et il les pousse à entrer en phase S du cycle cellulaire après l'arrêt en G1. il prolonge la survie des cellules et inhibe l'apoptose. Une étude plus profonde des voies des signalisations montre qu'il y a une synergie entre *v-myc* et *v-raf* dans la transformation et l'immortalisation des cellules; il semble que cette synergie est due à la capacité de *v-raf* à inhiber la mort cellulaire induit par *c-myc* (Cleveland et al., 1994).

En se basant sur ces données, une lignée cellulaire hématopoïétique de souris a été immortalisée. Cette lignée est P53<sup>-/-</sup> et elle est infectée par le rétrovirus J2. En plus, cette lignée montre une différenciation érythroïde normale comprenant tous les stades de l'érythropoïèse ; donc l'absence de P53 n'a pas influencé la différenciation (Metz et al., 1995). Le rétrovirus J2 a été utilisé aussi afin d'immortaliser une lignée cellulaire érythroïde de souris à partir d'un foie fœtal jours 14.5 de la gestation. Cette lignée est déficiente en EKLF (Coghill et al., 2001); Les auteurs disent que la déficience en EKLF a aidé beaucoup à l'immortalisation; il semble que EKLF est impliqué dans la différenciation des cellules.

Metz et al. (1995) proposaient un modèle des rôles de *myc*, *raf* et la déficience en P53 dans la contribution à la prolifération indéfinie et l'immortalisation. Ce modèle est montré dans la figure 5.



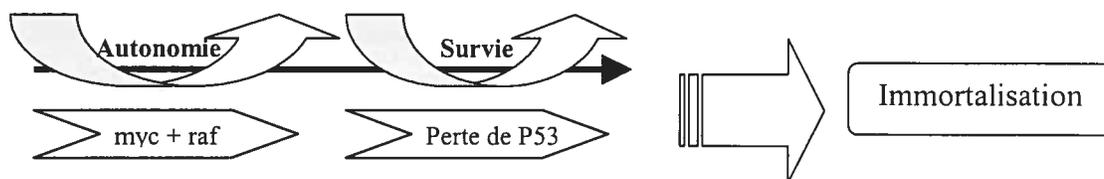


Figure 5 : Le modèle proposé des rôles de P53 et des oncogènes *myc* et *raf* dans le processus de l'immortalisation. Myc et Raf confèrent une autonomie aux cellules des facteurs de croissances alors que la perte de P53 aide les cellules à survivre.

Toutes ces études montrent que cette façon d'immortalisation est efficace et elle n'affecte pas la voie d'érythropoïèse. Sachant que la déficience en EKLF est létale, on a décidé d'immortaliser une lignée EKLF<sup>-/-</sup> en utilisant le rétrovirus J2 et des souris déficientes en P53. Les détails des étapes de l'immortalisation sont présentés dans la section des résultats. Le but de ce projet est d'obtenir une lignée immortelle et qui vient pas d'un tissu transformée pour être le plus proche d'une lignée normale afin d'étudier le rôle d'EKLF dans la régulation épigénétique et la cinétique de la transcription du gène de la  $\beta$  globine. Cette lignée peut nous permettre d'établir un modèle de l'activation de la transcription chez les mammifères et surtout dans un locus assez complexe comme celui de la  $\beta$  globine.

Alors, notre hypothèse est que les facteurs de transcription ne sont pas recrutés au promoteur du gène de la  $\beta$  globine en même temps, c'est à dire qu'il y a un facteur recruté premièrement pour changer l'état de la chromatine au promoteur à un certain niveau, ce qui facilite la liaison et le recrutement d'un autre facteur aboutissant à un état de chromatine plus ouverte et ainsi de suite; puis finalement le recrutement de la machinerie transcriptionnelle générale au promoteur accessible sera établi et il aura une formation du complexe de préinitiation (PIC) et l'activation de la transcription.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons performé plusieurs essais de biologie cellulaire et moléculaire qui vont être détaillés dans la section des résultats.

## 1.Introduction

### A-La chromatine :

L'information génétique chez les eucaryotes est différenciellement exprimée dans l'espace et dans le temps à travers des mécanismes épigénétiques qui déterminent l'expression en adaptant des régions du génome à maintenir une activation ou un silence d'un gène. Le terme épigénétique décrit l'étude des altérations stables dans le potentiel d'expression d'un gène qui se produisent durant le développement et la prolifération cellulaire.

Les mécanismes épigénétiques sont les facteurs qui affectent l'expression d'un gène autre que la séquence primaire de l'ADN: la structure de la chromatine (euchromatine et hétérochromatine) et les modifications post-traductionnelles des histones (acétylation, méthylation et phosphorylation), la méthylation de l'ADN, les facteurs de transcription et protéines d'hétérochromatine et les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants comme le complexe SWI/SNF (Jaenisch et al., 2003).

Ces mécanismes de régulation épigénétique modulent l'organisation de la chromatine et l'expression des gènes dans différents systèmes modèles chez les eucaryotes comme l'inactivation du chromosome X chez la femelle et l'hétérochromatine péricentrique chez les mammifères, la régulation du locus de la  $\beta$ -globine et les *imprinted gene* (Fournier et al., 2002).

L'organisation de l'ADN sous forme de chromatine joue un rôle critique dans le contrôle de tous les processus nucléaires. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome qui consiste en un octamère de quatre types d'histones: 2 H2A, 2 H2B, 2 H3 et 2 H4, autour duquel 146 paires de bases sont enroulées (figure 1a). Une autre histone, H1, joue le rôle d'un *linker* entre deux nucléosomes aboutissant à un degré plus élevé de compaction. (Forsberg et al., 2001; Fu et al., 2002)

La chromatine, dans le génome, existe sous deux formes : L'euchromatine, c'est la forme relâchée, elle contient des nombreux gènes transcrits et elle est caractérisée par une réplication précoce. Les extrémités des histones H3 et H4 au niveau de cette euchromatine sont généralement hyperacétylées et la lysine 4 de l'histone H3 est

méthylée. Cette forme de chromatine contient des sites hypersensibles à la digestion par la nucléase (DNase-I). L'hétérochromatine, c'est une forme compactée, elle contient des séquences répétitives et peu de gènes. Sa réplication est tardive, les extrémités des histones H3 et H4 sont fréquemment hypoacétylées et la lysine 9 de l'histone H3 est méthylée. Elle est insensible à la DNase-I. (Schübeler et al., 2000 ; Armstrong et al., 1999 ; Forsberg 2001).

### *1-Structure de la chromatine :*

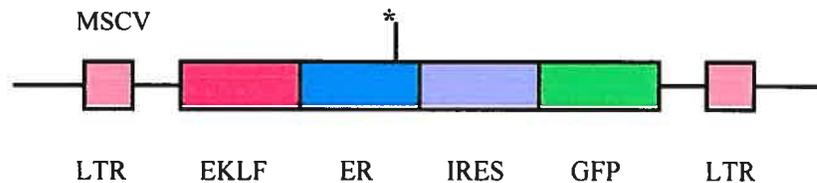
L'ADN est enroulé sur environ 146 paires de bases (1,65 tours) autour d'octamère d'histones (Kornberg, 1974 ; Kornberg et Thomas, 1974). Le complexe ADN-octamère d'histones forme le cœur du nucléosome. L'enroulement de l'ADN est maintenu grâce à des interactions électrostatiques entre les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN et les charges positives des histones. Cette structure est dite en "collier de perles" ou en "chapelet". Une histone de liaison se fixe aux segments d'ADN (de 20 à 200 pb) séparant deux cœurs nucléosomiaux (c'est l'histone H1 chez les mammifères ou H5 chez la drosophile). L'addition de cette histone permet une condensation en spirale qui donne naissance à une fibre de 30 nm de diamètre. Cette fibre subit alors une série de pliements successifs sur elle-même pour aboutir au chromosome métaphasique condensé.

Il existe 5 types principaux d'histones H2A, H2B, H3, H4 et H1. Ces protéines sont parmi les plus conservées au cours de l'évolution chez les eucaryotes. Les histones dites de "cœur" correspondent aux histones H2A, H2B, H3 et H4. Ce sont des protéines d'environ 14 kDa, organisées en deux domaines distincts : Une extrémité N-terminale peu structurée et un domaine central et C-terminal qui adopte une structure particulière dite en "repliement histone" (ou *histone fold*). La similitude entre les histones H2A, H2B, H3 et H4 en termes de séquence et de structure suggère qu'elles possèdent une origine commune. Leurs extrémités N-terminales sont fortement chargées positivement et riches en lysine pour les histones H3 et H4 ou en arginine pour les histones H2A et H2B (Marks et al., 2001).

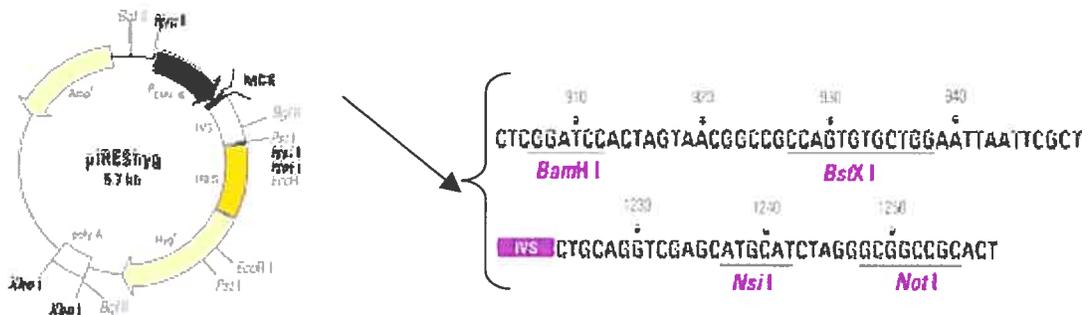
## **2. Matériels et méthodes**

### 1-Constructions et vecteurs :

1.1- La construction 519 m (Coghill et al 2001) : Cette construction a été utilisée pour transfecter les cellules de la lignée cellulaire déficiente en EKLF (EKLF<sup>-/-</sup>) afin d'introduire un système d'induction qui nous a permis de régénérer l'expression d'EKLF dans cette lignée. MSCM: *Murine Stem Cell Virus*. IRES: *Internal Ribosome Entry Site*. LTR: *Long Terminal Repeat*. ER: *Estrogen Receptor*. GFP: *Green Fluorescent Protein*.



1.2-Le vecteur pIRESHyg (*Clontech*) : Ce vecteur a été utilisé pour la co-transfection de la lignée EKLF<sup>-/-</sup> avec la construction 519 m.

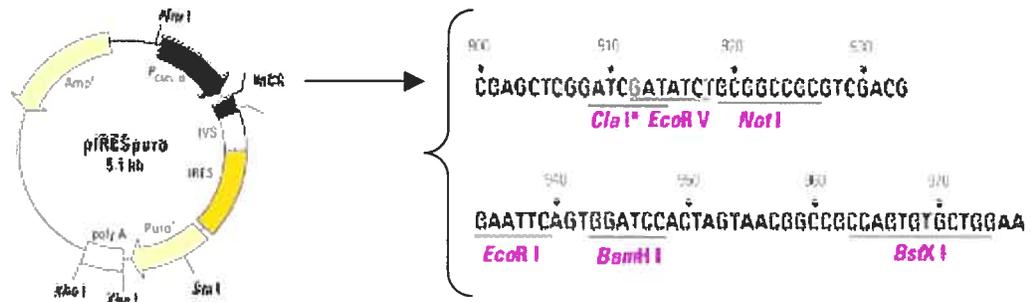


1.3-Les constructions du gène  $\beta$  de la globine humaine : une construction (A) est formée du gène  $\beta$  humain avec son promoteur (rectangle blanc) contenant toutes les séquences régulatrices (CAAT, TATA, CACC, GATA,...). L'autre construction (B) contient en plus de la première un micro LCR (*Locus Control Region*) formé des 4 sites

hypersensibles (HSs) à la DNase (HS1, 2, 3 et 4). Ces deux constructions ont été utilisées pour établir des clones individuels à fin d'étudier le rôle d'EKLf.



1.4-Le vecteur pIRESpuro (*Clontech*) : ce vecteur a été utilisé pour établir les clones individuels transfectés soit avec le gène  $\beta$  humain soit avec la construction  $\mu$ LCR-gène  $\beta$ .



## 2-Les souris :

Des souris EKLf+/- (Dr Stewart Orkin) et P53-/- (Dr Pierre Chartrand) ont été croisées pour obtenir des souris EKLf+/-, P53+/- . Ces dernières ont été accouplées entre elles et au jour 12.5 post-gestation, nous avons prélevé les embryons anémiques (ils sont déficients en EKLf), à partir desquels nous avons immortalisé la lignée EKLf-/- P53-/- .

## 3-Les lignées cellulaires BHK et J2 :

La lignée cellulaire BHK produit le SCF (*Stem Cell Factor*) et elle a été maintenue en culture dans du DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* : Gibco) avec du FBS (*fetal bovin serum* : Hyclone) à 10 % et 1% pénicilline/streptomycine. Cette lignée vient du laboratoire du Dr Yaacov Ben-David.

La lignée J2 produit le rétrovirus J2 présenté dans la figure 6. Cette lignée nous a été fournie par le Dr Ulf R Rapp. Cette lignée a été maintenue dans du DMEM avec 10% FBS et 1% pénicilline/streptomycine (*Gibco*).

#### **4-La lignée déficiente (« Knock out ») en EKLf (18-SCF) :**

La lignée déficiente (*Knock out*) en EKLf (18-SCF) est une lignée cellulaire immortalisée à partir d'un foie fœtal EKLf<sup>-/-</sup> de souris pris au jour 12,5 post-gestation. Pour les détails sur l'immortalisation, voir la section « résultats ». Elle a été maintenue en culture dans du IMDM (*Iscove's modified Dulbecco's medium : Cell Grow*) avec 10% du FBS, 10% SCF (provenant de la lignée BHK) et 1% pénicilline/streptomycine (*Gibco*).

#### **5-Transfection :**

La lignée 18-SCF a été co-transfectée par les deux constructions suivantes : EKLf-ER-IRES-GFP et un vecteur contenant le gène de résistance à l'hygromycine (*Clontech*). La co-transfection a été faite, en prenant  $2 \times 10^7$  cellules, on les a incubées dix minutes à 37°C avec 1µg d'ADN de la construction pIRESHyg et 5µg d'ADN de 519m. La transfection a été faite par électroporation à 250 volts et 960Ω. Après deux semaines de sélection, un clone individuel exprimant la GFP a été sélectionné, c'est le clone 29 (C29). Les C29 ont été maintenus dans le même milieu des 18-SCF ajouté de l'hygromycine (50mg/ml : *Invitrogen*).

#### **6-Induction des C29 :**

L'induction des C29, c'est-à-dire le passage de EKLf-ER du cytoplasme vers le noyau, a été faite par le Tamoxifen (*Sigma*). La concentration finale utilisée du Tamoxifen était de 10 micro molaires (µM). La durée totale de l'induction était de 48 heures.



### **7-ChIP (Chromatin Immunoprécipitation) :**

C'est une technique permettant de savoir si une protéine lie l'ADN. Les cellules ont été fixées avec du formaldéhyde 1%(crosslink), une lyse cellulaire a fait suite. L'étape suivante était la sonication de l'ADN pour obtenir des fragments dont la taille est entre 500 et 800 paires de base. Nous avons pris une partie du matériel qui a été utilisée comme *Input*. Le produit de lyse a été incubé avec l'anticorps de la protéine ou le facteur en question. Une élution, un reverse de *crosslink* et une précipitation d'ADN ont eu lieu. La procédure suivie pour le ChIP est celle proposée par *Upstate Biotechnology*.

### **8-Anticorps :**

Les anticorps anti-TF-IID, anti-GATA-1, anti-NF-E2 et l'anti-P53 venaient de chez *Santa Cruz Biotechnolgy*. Alors que les anti-histones acétylées H3 et H4 et la lysine 4 méthylée de l'histone 3 venaient de chez *Upstate Biotechnology*.

L'anti-actine a été fourni par *Chemicon*.

### **9-Analyse semi-quantitative par PCR radioactif en duplex :**

L'ADN des échantillons de ChIP a été analysé par des réactions de PCR (*polymerization chain reaction*) en duplex : C'est une réaction de PCR où deux jeux d'amorces spécifiques amplifient, en même temps, deux régions distinctes. Après migration des réactions de PCR sur un gel polyacrylamide, elles ont été quantifiées par *PhosphorImager* 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 pour une région contrôle (interne) qui nous a permis de normaliser la réaction de PCR. Ensuite, chaque échantillon de ChIP a été normalisé une deuxième fois par rapport à une réaction de PCR effectuée avec l'ADN de l'input (ADN récupéré avant l'immunoprécipitation). L'enrichissement a été calculé de la façon suivante :

-Intensité de la région d'intérêt dans le ChIP : A

-Intensité de la région contrôle dans le ChIP : B

-Intensité de la région d'intérêt dans l'input : C

-Intensité de la région contrôle dans l'input : D

Nous avons divisé A par B :  $A/B = X$ . Ensuite C par D :  $C/D = Y$

À la fin, nous avons divisé X par Y :  $X/Y = \text{Enrichissement}$

Les conditions de PCR en duplex étaient 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.

### 10-Les amorces :

Les régions amplifiées étaient le promoteur du gène  $\beta$ -majeur du locus de la globine et celui du gène ZFP37 de souris :

	Séquence en 5'	Séquence en 3'	Fragment(bp)
Promoteur $\beta$ -majeur	5'CAGTGAGTGGCAC AGCATCC 3'	5'CAGTCAGGTGCACC ATGATGT 3'	222
Promoteur ZFP37	5'TTACTTAGAAGGA ATGGGAGCAGCT 3'	5'ACTTGAGAAAGAA GGGATTGCAGT 3'	149
Promoteur $\beta$ -humain	5'GCTGGTGGTCTACC CTTGGA 3'	5'AGGTTGTCCAGGTG AGCCAG 3'	150
Site hypersensible-2 (HS2) humain	5'CCATAGTCCAAGC ATGAGCAG 3'	5'CACTCTAGGCTGAG AACATCTGG 3'	175

Tableau 1 : liste des amorces utilisées

### 11-Protection Rnase (S1) :

Elle permet de détecter la présence de l'ARNm du gène candidat. Une sonde d'ADN, couvrant une partie d'exon et une partie d'intron et marquée par le  $\gamma$ dATP32, a été hybridée avec l'ARN total extrait des cellules en question. L'étape suivante était la

digestion par la nucléase S1(*Roche*). Après la précipitation, le matériel hybridé a été séparé sur un gel de polyacrylamide à 6%. Le niveau d'expression (la quantité de l'ARNm) du gène en question a été révélé en exposant le gel séché sur un écran fourni avec le *phosphorImager* et en quantifiant les bandes avec le logiciel *Image quant 5.2*.

### ***12-Immunofluorescence pour analyse par FACS :***

Les cellules ont été incubées avec du formaldéhyde 10% à 37°C pour une heure pour les perméabiliser. Après un lavage avec du PBS (*phosphate buffered saline*)/BSA (*bovin serum albumin*) 0.5%, une incubation avec du lait sec sans gras à 5% pour 10 minutes, un lavage (*idem*), une incubation avec du NP40 0.1% pour 10 minutes et un lavage (*idem*), nous avons incubé les cellules avec le premier anticorps (anti-hémoglobine de souris : *Research plus*) pour une heure à la température de la pièce. De même pour l'anticorps secondaire qui est conjugué à un fluorochrome (PE : *Phycoerythrin*). Les échantillons ont été analysés par FACS (*fluorescence-activated cell sorter*).

### ***13-Buvar dage du type « Western » :***

Les protéines extraites par le tampon de lyse *RIPA* (*Radioimmunoprecipitation* : 150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.2, 0.1% SDS, 1.0% Triton X-100, 1% Deoxycholate et 5 mM EDTA) ont été séparées sur un gel d'acrylamide à 10%/ 0.1% SDS. Après migration et transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose (*BIORAD*), cette dernière a été bloquée dans du lait sec sans gras 5% puis hybridée avec l'anticorps primaire (anti-P53 dans notre cas) ; Un lavage (avec du TBS-T : *Tris Buffered Saline-Tween*) a fait suite, puis l'hybridation avec l'anticorps secondaire ( conjugué au *HRP* : *Horseradish Peroxidase* : *Chemicon*). La membrane a été finalement exposée sur un film (*kodak*) pour révéler la présence des bandes.

**14-Coloration «Wright-Giemsa »:**

Entre  $5 \times 10^4$  et  $10^5$  cellules ont été fixées pendant 30 secondes dans le méthanol sur des lames de verre traitées avec la polylysine. Après la fixation, les lames ont été incubées dans le colorant *Wright Giemsa* (*Sigma*) pour 3 minutes puis dans l'eau distillée pour 5 minutes. En fin, les lames ont été rincées avec un jet d'eau distillée jusqu'à que le verre (de la lame) est revenu incolore.

### **3. Résultats**

### A-Immortalisation de la lignée cellulaire :

La majorité des études sur la régulation transcriptionnelle du locus de la  $\beta$  globine a été faite dans des lignées cellulaires transformées comme la lignée de souris MEL (*Murine ErythroLeukemias*) et la lignée humaine K562. Les lignées transformées ne sont pas dans un contexte normal car elles viennent de tissus leucémiques où plusieurs fonctions cellulaires et gènes sont dérégulés. Plus précisément, dans les MEL le facteur de transcription PU.1 de la famille ETS est surexprimé; récemment, une étude a montré que PU.1 inhibe l'acétylation médiée par le coactivateur CBP (une acétyl transférase) de plusieurs facteurs de transcription comme GATA-1, NF-E2 et EKLF dont l'acétylation est nécessaire pour leurs activités (Hong W. et al. 2002). Ce sujet est détaillé dans la section de discussion. D'autre part, aucune étude de régulation épigénétique du locus de la  $\beta$  globine n'a été faite dans un contexte EKLF<sup>-/-</sup> dans des cellules qui viennent des tissus non transformés. Rappelons que la déficience en EKLF (le *Knock out*) est létale (voir introduction), toutes ces raisons nous ont amenées à décider d'immortaliser une lignée cellulaire EKLF<sup>-/-</sup> qui peut servir comme un outil efficace pour étudier la régulation épigénétique chez les mammifères. Pour les avantages de cette lignée, voir discussion.

Le phénomène de l'immortalisation est compliqué et il exige plusieurs essais et de nombreux tests de culture que nous allons les détailler un peu plus tard.

#### *1-Croisement des souris :*

Puisque les souris déficientes en EKLF (EKLF<sup>-/-</sup>) meurent *in utero* environ au jour 15 de la gestation, nous avons croisé des souris déficientes hétérozygotes en EKLF (EKLF<sup>+/-</sup>) entre elles. Le quart des embryons (théoriquement) doit être EKLF<sup>-/-</sup>. D'autre part, sachant que P53 est un gène suppresseur de tumeur et aide à l'immortalisation (voir introduction), nous avons croisé des souris EKLF<sup>+/-</sup> avec des souris P53<sup>-/-</sup>. Les souris qui naissent doivent être soit EKLF<sup>+/-</sup>\_P53<sup>+/-</sup>, soit EKLF<sup>+/+</sup>\_P53<sup>+/-</sup>.

Les souris déficientes hétérozygotes (+/-) pour les deux gènes (EKLF et P53) ont été croisées entre elles. Au jour 12,5 de la gestation les foies anémiques (EKLF-/-) ont été prélevés et mis en culture à différentes conditions (Voir conditions de culture).

### 2-Production du rétrovirus *myc/raf* :

Étant donné que les oncogènes *myc* et *raf* sont impliqués dans la transformation et l'immortalisation cellulaires (voir introduction), les cellules des foies isolés ont été incubées avec le surnageant des cellules J2 (lignée produisant le rétrovirus J2 : Figure 6 ; Rapp UR et al.1985). Des études précédentes ont utilisé ce rétrovirus pour immortaliser des lignées cellulaires (Coghill E. et al. 2001) où des cellules de foie sont mises en culture dans un pétri en même temps avec des cellules J2 (cellules adhérentes). Dans notre étude nous avons prélevé le surnageant des cellules J2 en culture (qui contient le rétrovirus J2). Ce surnageant a été ajouté aux cellules de foie EKLF-/- mises en culture dans un rapport de 2/10 (2ml de surnageant plus 8 ml de milieu IMDM). Nous avons trouvé que cette quantité de rétrovirus était suffisante pour infecter les cellules de foie (la morphologie des cellules se change quand les cellules sont infectées).

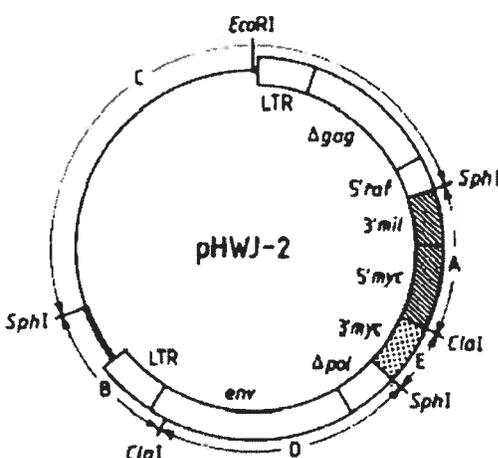


Figure 6 : le virus exprimant les deux oncogènes *myc* et *raf*.

### 3-Les conditions de culture (cytokines) :

Au début du processus d'immortalisation, les cellules exigent plusieurs facteurs de croissance qui leur permettent de survivre et de résister à l'apoptose, alors que d'autres facteurs de croissance et certaines cytokines sont indispensables pour que les cellules gardent leurs caractéristiques spécifiques. Les deux genres de facteurs de croissance et de cytokines varient selon le type cellulaire. Puisque notre but était d'immortaliser une lignée érythroïde, nous avons cherché dans la littérature les facteurs de croissance et les cytokines qui peuvent avoir une influence sur le processus d'immortalisation d'une part et sur les caractéristiques de la lignée voulue (érythroïde dans notre cas) d'autre part.

Quand les cellules entrent dans une voie de différenciation, elles perdent leur potentiel d'auto-renouvellement et elles sortent du cycle cellulaire et se trouvent dans un arrêt en phase G1-S. Nous avons expliqué dans l'introduction que la déficience en P53 et l'infection des cellules par le rétrovirus J2 aboutissent à l'immortalisation des cellules; Alors pour favoriser l'immortalisation d'une lignée érythroïde, plusieurs facteurs de croissance peuvent être utilisés. Parmi ces facteurs, on a choisi le SCM (*Spleen Conditional Medium*), le SCF (*Stem Cell Factor*), l'Epo (Érythropoïétine) et L'IL-3 (Interleukine 3) pour des raisons que nous allons les expliquer pour chaque facteur dans les 4 sous-paragraphes suivants :

3.1-SCM (*Spleen Conditional medium*): Le SCM a été préparé en mettant la rate d'une souris adulte en culture dans du milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) avec de *pokeweed* (1g/10ml; *Gibco*). Après 48 heures, le surnageant a été prélevé, centrifugé à 3000 rpm (rotation par minute) pendant 10 minutes pour enlever le plus gros de déchets cellulaires puis il a été filtré en utilisant un filtre de porosité de 0.4 micron. Le SCM a aidé beaucoup dans l'établissement de la lignée, les cellules ont vécu plus longtemps et on a distingué les groupes des cellules survivantes plus rapidement et elles étaient en « meilleure Santé ». Au début de la mise des cellules en culture primaire, le nombre de cellules qui ont vécu et qui ont résisté à l'apoptose était faible car les cellules ont besoin de certains facteurs de croissance qui sont présents, à ce stade de culture, en faible quantité non suffisante dans le milieu de culture (nous parlons des



facteurs sécrétés par les cellules elles même); Le SCM, a fourni ces facteurs aux cellules. Il a été ajouté à un pourcentage de 20%. Une fois les cellules survivantes et immortelles ont été devenues confluentes, nous avons remarqué que le SCM n'était plus nécessaire car les facteurs de croissance, à ce stade de culture, ont été fournis par les cellules elles même.

3.2-SCF (*Stem Cell Factor*): Connue comme un facteur de croissance qui protège les cellules de l'apoptose (McNiece et al., 1991), le SCF a un rôle très important dans la génération et l'auto-renouvellement des progéniteurs érythroïdes comme les proérythroblastes. En liant son récepteur c-Kit, le SCF active une voie (ou des voies) de signalisation qui pousse les cellules à proliférer et bloque la différenciation (Dranoff et al., 1994; Nishinakamura et al., 1995).

Dans une autre étude (Tamir et al., 2000), les auteurs ont montré que le SCF et l'Epo contribuent à l'augmentation de la prolifération des cellules érythroïdes et bloquent leur différenciation en activant et/ou inhibant plusieurs régulateurs du cycle cellulaire (comme P27, c-myc, cdk, PKC et plusieurs autres). Cette même étude insiste que SCF et Epo ensemble assument ce rôle, alors que Epo seule enclenche la différenciation. Toutes ces études et plusieurs autres montrent l'importance du SCF dans la survie des cellules érythroïdes.

Dans notre cas, le SCF (produit par la lignée BHK) était nécessaire pour la maintenance de la lignée cellulaire; il a aidé les cellules à survivre et à se proliférer. En présence du SCF, les cellules poussaient plus rapidement, conservaient leur forme, c'est-à-dire grosses et rondes, et gardaient leur caractéristique érythroïde. En son absence, les cellules devenaient petites, changeaient de morphologie et poussaient très lentement.

3.3-Epo (*Erythropoietine*): L'Epo, l'hormone primaire qui régule la maturation des cellules érythroïdes immatures en érythrocytes, est nécessaire pour la prolifération, la différenciation et la prévention de l'apoptose des cellules érythroïdes (Bao et al., 1999). Ces trois rôles sont assurés *via* des voies de signalisation différentes et ils dépendent du type cellulaire et des facteurs de croissance présents.

Concernant le rôle anti-apoptotique de l'Epo, il est supporté le plus dans les proérythroblastes et les érythroblastes (Koury et Bondurant, 1992; Kapur et Zhang, 2001). Ces études ont montré que la stimulation du récepteur c-Kit par le SCF, après stimulation par l'Epo, est nécessaire pour la maintenance de l'expression du récepteur de l'Epo (Epo-R) et de la protéine STAT5, ce qui enclenche une induction significative de Bcl-x<sub>L</sub> (protéine anti-apoptotique) et la survie des progéniteurs érythroïdes.

Concernant notre étude, nous avons trouvé que l'Epo est nécessaire pour environ la moitié des clones isolés. Le rôle de l'Epo était très important dans le cas de la lignée 18-SCF qui a été maintenue avec l'Epo pour une concentration finale de 0.1 unité /ml.

3.4-IL-3 (Interleukine-3): Anzai et al., (2001) ont suggéré que l'IL-3 favorise la génération et la prolifération des cellules érythroïdes à partir de la lignée de cellules souches A-6. Dans une autre étude (Coghill E. et al 2001), l'IL-3 a été utilisée pour favoriser l'immortalisation d'une lignée cellulaire érythroïde. Pour la majorité des clones que nous avons isolés, l'IL-3 n'avait pas d'influence sur le processus de l'immortalisation ni sur la maintenance de la lignée cellulaire. Au début, en absence du SCF, elle semble aider à maintenir les cellules et les garder en bonnes conditions.

#### *4-Conditions finales d'immortalisation :*

Le quart d'un foie fœtal EKLF<sup>-/-</sup> (anémique) a été découpé en petits morceaux. Nous avons pipeté ces derniers dans du PBS (*phosphate buffered saline*) pour suspendre les cellules; une centrifugation à 1500 rpm pour 10 minutes a fait suite. Les cellules ont été mises en culture dans du IMDM avec 10% FBS, 1% Pénicilline/streptomycine, 20 % SCM, 10% SCF et 20% du surnageant contenant le virus *myc/raf*. Après trois jours, la plupart des cellules étaient mortes et des fibroblastes adhérents apparaissaient au fond du pétri et elles ont finies par mourir par apoptose, alors que des petites grappes de cellules en suspension ont été observées. Ces grappes étaient à l'origine de plusieurs clones (environ 30) qui ont été maintenus en culture. Une partie des clones mourraient par apoptose après quelques passages. À la fin, 10 clones sont survécus et sont devenus immortels. Deux clones (C1 et C4) avaient les caractéristiques érythroïdes. Le clone C1

était à l'origine de la lignée EKLf<sup>-/-</sup> qui a été caractérisée en appliquant plusieurs tests et essais.

#### 5-Régénération de l'expression d'EKLf :

Pour régénérer l'expression d'EKLf, les cellules de la lignée EKLf<sup>-/-</sup> ont été co-transfectées par électroporation avec la construction EKLf-ER-IRES-GFP (519) et un vecteur de résistance à l'hygromycine (voir matériels et méthodes). Après la co-transfection, un clone individuel exprimant la GFP a été isolé, c'est le clone 29 (C29). La construction 519 est transcrite en un ARNm bisstronique. Cet ARNm est traduit en deux protéines séparées : l'EKLf-ER (une protéine de fusion) et la GFP (c'est le rôle du IRES).

Le ER (récepteur d'œstrogène) a été modifié (muté) pour qu'il soit inducible par le Tamoxifène (TX) et non pas par l'œstrogène endogène (Coghill et al. 2001). La protéine de fusion EKLf-ER reste dans le cytoplasme. En présence du TX, elle est transportée vers le noyau alors que la GFP reste dans le cytoplasme. De cette façon on peut contrôler la présence d'EKLf dans les compartiments cellulaires, c'est-à-dire, on peut contrôler l'expression du  $\beta$  majeur. Ce système d'induction est schématisé dans la figure 7.

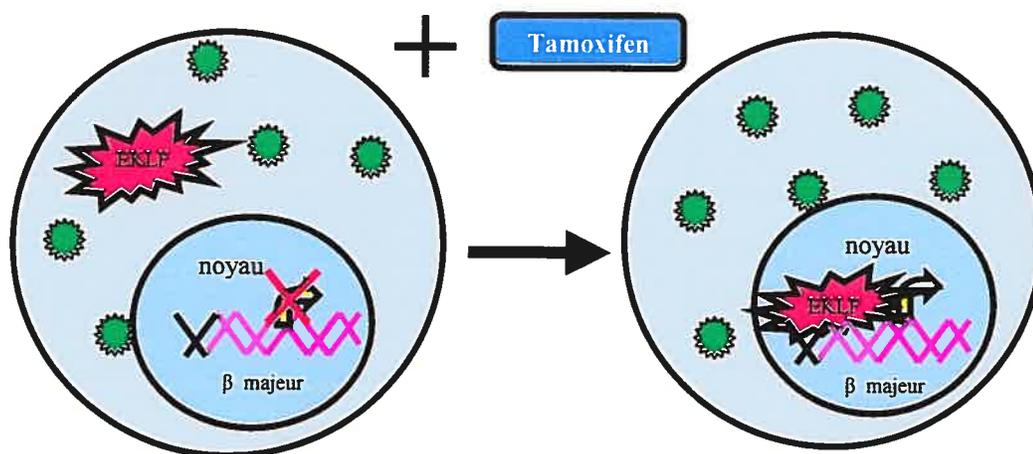


Figure 7 : la manière du fonctionnement du système d'induction de la construction EKLf-ER-IRES-GFP. Les cercles verts avec une ligne en étoiles : GFP

### **B- Caractérisation de la lignée cellulaire EKLF-/- :**

Pour caractériser la lignée cellulaire, plusieurs tests et essais ont été choisis selon les buts et les résultats que nous cherchons. Tout d'abord, pour savoir si la lignée EKLF-/- est P53+/- ou P53-/-, nous avons vérifié la présence de P53 par immunobuvardage.

Le 2<sup>ème</sup> but était de vérifier si la lignée est érythroïde et à quel stade de l'érythropoïèse elle appartient. La première chose à laquelle nous avons pensé c'était l'expression des gènes de globine (dans notre cas nous parlons de l' $\alpha$  globine car en absence d'EKLF, il n'y a pas d'expression du gène  $\beta$  : Voir introduction). L'expression de l' $\alpha$  globine a été détectée en utilisant la technique de la protection à la RNase (S1) qui est plus sensible et plus quantitative que le buvardage du type « northern ».

D'autre part, puisque l'hybridome Ter119 est un marqueur des cellules érythroïdes à partir du stade proérythroblaste jusqu'aux cellules érythroïdes matures (Kina et al, 2000), nous avons vérifié sa présence à la surface membranaire de notre lignée cellulaire par la technique de l'immunofluorescence.

Concernant la morphologie et la forme des cellules, une expérience très utilisée, la coloration avec le *Wright Giemsa* a pu nous montrer la forme, la grosseur et le rapport noyau/cytoplasme des cellules, ce qui nous a donné une idée sur le stade de l'érythropoïèse auquel elles appartiennent.

Notre 3<sup>ème</sup> étape était la vérification du système d'induction (EKLF-ER) introduit dans la lignée cellulaire. Nous avons testé l'efficacité de ce système en utilisant les mêmes techniques qu'avant : L'expression du gène de la globine adulte ( $\beta$  majeur) par la technique de protection à la RNase (S1), la présence et la formation de l'hémoglobine de souris par immunofluorescence, la morphologie et le type cellulaire par la coloration avec le *Wright Giemsa*. Tous ces tests ont été faits avant et après induction.

### 1-La lignée est P53<sup>-/-</sup> :

La présence de P53 a été vérifiée par un Buvar dage du type « *Western* ». On a pris l'extrait protéique de cellules de type sauvage comme un contrôle positif et celui de  $2 \times 10^6$  cellules de la lignée cellulaire en question (18-SCF). Comme contrôle de l'essai, nous avons hybridé la même membrane avec un anticorps anti-actine (figure 8) après un *stripping* qui consiste à incuber la membrane avec un tampon (Tris PH 7.5, SDS et  $\beta$ -mercapto-éthanol) à  $53^{\circ}\text{C}$  pour 30 minutes en agitant la bouteille chaque 10 minutes. Trois lavages (de 15 minutes chacun) avec du PBST ont fait suite. Le but du *stripping* est d'enlever les anticorps hybridés avec la membrane dans le premier immunobuvar dage. Nous avons exposé la membrane sur un film pour s'assurer que les anticorps déjà hybridés avec la membrane (P53 et l'anticorps secondaire) sont enlevés. Ensuite, nous avons hybridé la même membrane avec le deuxième anticorps (anti-actine) et les mêmes procédures qu'avant (pour P53) ont fait suite. Nous avons trouvé que la lignée EKLF<sup>-/-</sup> est aussi P53<sup>-/-</sup> : Figure 8.

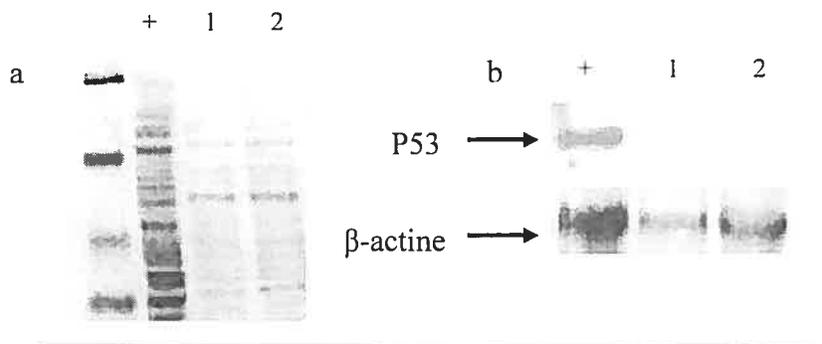


Figure 8 : a) membrane de nitrocellulose colorée avec le ponceau après le transfert. b) « western blot » montrant la déficience de la lignée 18-SCF en P53. + : contrôle positif, 1 :  $25\mu\text{g}$  d'extrait protéique des cellules 18-SCF et 2 :  $45\mu\text{g}$ .

### 2-Expression de globine:

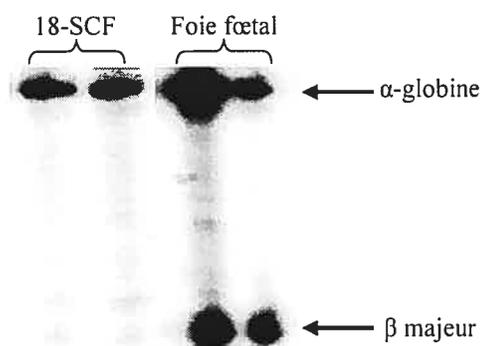
L'expression de l' $\alpha$  et de la  $\beta$  globine a été vérifiée par protection à la RNase S1. Les ARNs extraits à partir de  $5 \times 10^6$  cellules de la lignée EKLF<sup>-/-</sup> et d'un foie fœtal (comme

contrôle positif de l'expression des deux gènes) d'une souris de type sauvage ont été hybridés avec deux sondes d'ADN : une pour l' $\alpha$  globine et l'autre pour  $\beta$  majeur. Ces deux sondes ont été marquées radioactivement par le  $\gamma$ P32 (*Amersham*). La sonde d'ADN utilisée couvre une partie de l'exon et une partie de l'intron.

Après marquage des sondes par le P32, nous les avons précipitées avec les ARNs extraits des 18-SCF et du foie fœtal et nous les avons hybridés pendant une nuit à 53<sup>0</sup>C; ensuite, nous avons ajouté la nucléase S1 qui dégrade la partie simple brin des deux fragments hybridés (ADN <sup>p32</sup>-ARN). Après deux heures de l'ajout de la S1, une extraction au phénol/chloroforme et une précipitation ont eu lieu.

L'ADN hybridé avec l'ARN ont été chargé dans les puits d'un gel de polyacrylamide de 6%. La révélation des bandes a été faite en exposant le gel séché sur un écran fourni par la compagnie *storm*. Dans la figure 9, nous montrons que la lignée exprime bien l' $\alpha$  globine. Elle n'exprime pas la  $\beta$  globine car elle est EKLf-/- et ce qui était attendu. Alors la lignée 18-SCF est une lignée érythroïde.

Figure 9: Protection RNase S1 montrant l'expression de l' $\alpha$  globine dans la lignée cellulaire EKLf-/-, alors c'est une lignée érythroïde. L'ARN du foie fœtal est un contrôle positif de l'expression des gènes de globine  $\alpha$  et  $\beta$ .



### 3-Les C29 sont Ter119 positifs :

Étant donné que l'antigène de surface Ter119 est un marqueur des cellules érythroïdes à partir du stade proérythroblastes (Kina et al., 2000), sa présence à la surface des cellules C29 a été investiguée par immunofluorescence et analyse par FACS. Comme contrôle positif nous avons pris des cellules de la moelle osseuse d'une souris type sauvage (CD-1). Les résultats de l'immunofluorescence sont présentés dans la figure 10. On voit que 62% des C29 expriment l'antigène Ter119 alors que 73% expriment la GFP (GFP

positifs). Le fait que nous avons deux pics de GFP peut être dû à deux populations de cellules GFP positives différentes (comme des cellules quiescentes et des cellules en divisions ou des populations de cellules à des stades de différenciation différents). Dans notre cas, nous avons considéré que 73% des cellules sont GFP positives. La figure 10 montre que les C29 sont Ter119 positifs, c'est-à-dire qu'elles expriment l'antigène Ter119 à la surface de la membrane cytoplasmique. Ce résultat nous confirme aussi que la lignée EKL<sup>-/-</sup> est une lignée érythroïde et elle est au stade proérythroblaste ou à un plus avancé de la différenciation érythroïde.

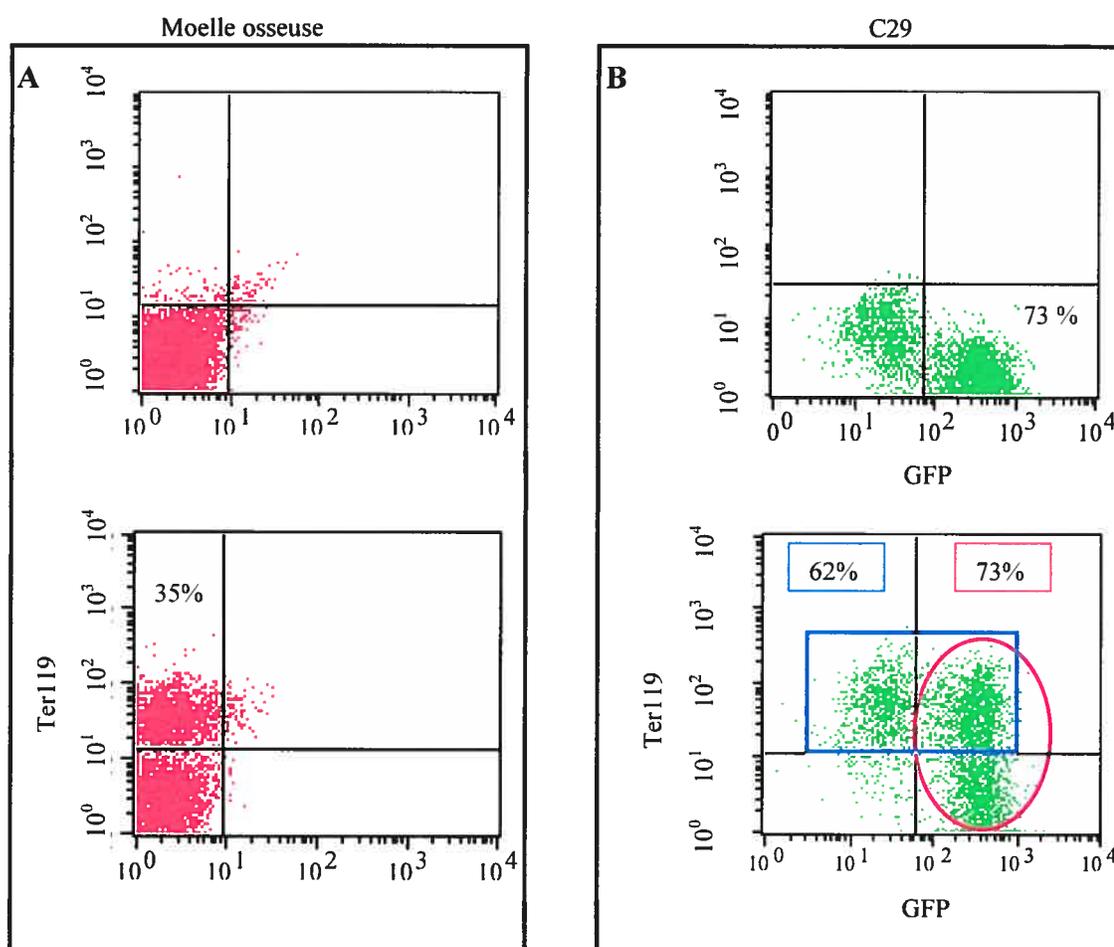


Figure 10 : Les analyses par FACS de l'immunofluorescence pour l'antigène Ter119. A) Cellules de la moelle osseuse d'une souris adulte. 35% des cellules de la moelle osseuse sont Ter119 positives. B) Les C29. 73% des C29 sont GFP positifs (cercle rouge) et 62% (carré bleu) sont TER119 positifs.

#### 4-Coloration « Wright Giemsa » :

Les cellules de la lignée 18-SCF ont été fixées sur une lame de verre traitée avec la polylysine en les incubant 30 secondes dans le méthanol. Après la fixation, elles ont été colorées avec du *Wright Giemsa*. Cette coloration nous a permis de voir le phénotype des cellules (forme, grosseur, rapport cytoplasme/noyau,...).

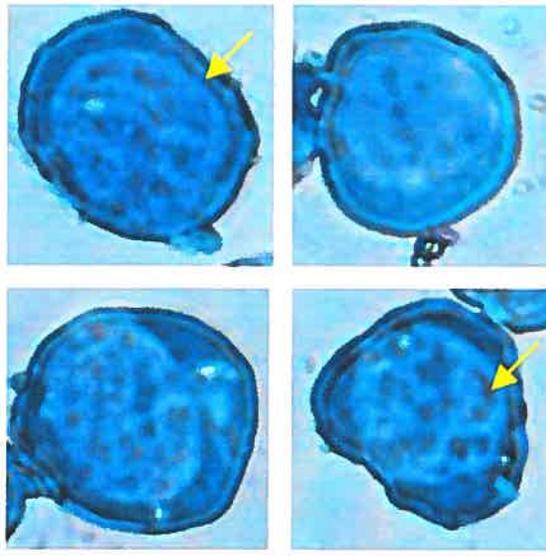


Figure 11 : Coloration avec le *Wright Giemsa*. Les 18-SCF sont grosses (des blastes) avec un noyau (flèches jaunes) qui occupe une grande partie du cytoplasme. Elles ressemblent beaucoup aux proérythroblastes (magnification : 100x10).

La figure 11 nous montre que les cellules semblent être des blastes, des grosses cellules où le noyau occupe la plupart du cytoplasme. En les comparant avec le phénotype des cellules de différents stades de l'érythropoïèse, les cellules de la lignée EKLF<sup>-/-</sup> (18-SCF) ressemblent fortement aux proérythroblastes (résultats non présentés).

#### 5-L'induction des C29 :

D'après la figure 7, le Tamoxifen va transporter l'EKLF du cytoplasme vers le noyau où il peut agir sa fonction. Puisque l'expression de la  $\beta$  globine dépend de la présence



d'EKLF, le système d'induction a été testé en investiguant l'expression du gène de la globine adulte ( $\beta$  majeur) avec et sans Tamoxifen (c'est-à-dire avec et sans EKLF) par la technique de protection à la RNase (la nucléase S1), la présence de l'hémoglobine de souris par immunofluorescence et la différenciation en érythrocytes par la coloration avec le *Wright Giemsa*.

La technique de protection à la RNase nous a permis de savoir le niveau d'expression du gène  $\beta$  majeur en présence et en absence d'EKLF en utilisant comme contrôle le gène de l' $\alpha$  globine dont l'expression n'est pas affectée par EKLF surtout à ce stade de l'érythropoïèse (proérythroblaste).

L'immunofluorescence (pour détecter la formation d'hémoglobine) nous a donné une idée sur le pourcentage d'induction des C29 par le Tamoxifen, c'est-à-dire combien de cellules des C29 vont exprimer la globine adulte ( $\beta$  majeur) après l'induction. De plus, nous allons savoir s'il y a une fuite d'EKLF du cytoplasme vers le noyau avant l'ajout du Tamoxifen (induction) et s'il y a un pourcentage des cellules qui sont capables de se différencier toutes seules sans induction.

Finalement, la coloration avec le *Wright Giemsa* va montrer la morphologie et le type cellulaire avant et après l'induction par le Tamoxifen.

#### 5.1-La protection à la RNase (S1) :

Le rôle d'EKLF au niveau de l'expression du gène  $\beta$  majeur du locus de la globine de souris et le système d'induction EKLF-ER (Fig.7) ont été investigués par l'essai de la protection à la RNase (S1). Le gène de l' $\alpha$  globine est exprimé sans (EKLF est dans le cytoplasme) et avec (EKLF est dans le noyau) Tamoxifen, alors que le gène  $\beta$  majeur n'est exprimé qu'en présence du Tamoxifen (Fig.12a).

Comme contrôle, nous avons regardé l'expression du gène de l'actine. En présence d'EKLF, l'expression de  $\beta$  majeur est 100 fois plus qu'en son absence (figure 12b). En fait, aucune expression du  $\beta$  majeur n'a été détectée en absence d'EKLF. Cette

expérience nous montre deux phénomènes : le premier est que EKLF est essentiel pour l'expression de la globine adulte ( $\beta$  majeur) alors que le deuxième est que le système d'induction introduit dans la lignée cellulaire est fonctionnel d'une manière efficace.

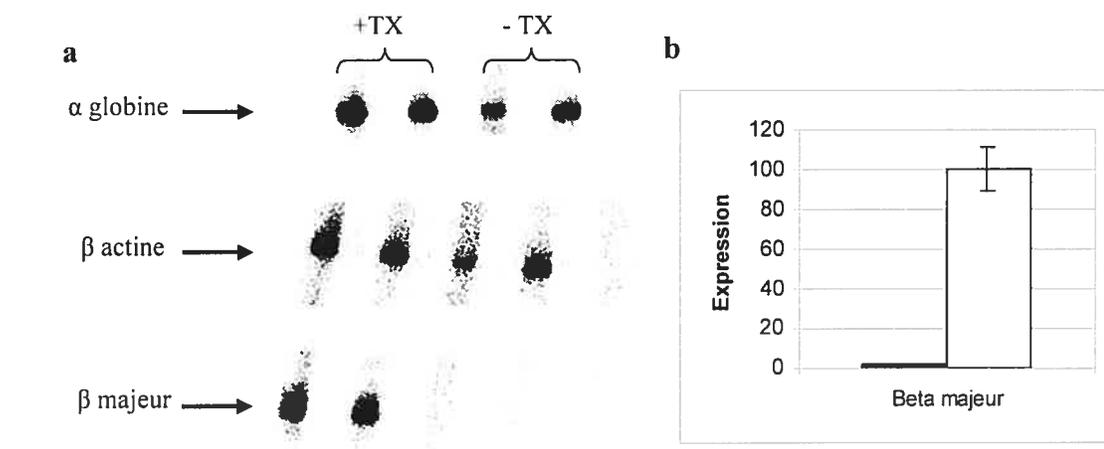


Figure 12 : a) Protection RNase (S1) montrant l'expression de deux gènes, l' $\alpha$  globine de souris et le  $\beta$  majeur. - TX : sans Tamoxifen (EKLF est dans le cytoplasme), +TX : Avec Tamoxifen (EKLF est dans le noyau) dans les C29. b) En présence d'EKLF (+TX, bandes pointillées), l'expression du gène  $\beta$  majeur est 100 fois plus qu'en son absence (-TX, bandes noires). L'expression de  $\beta$  majeur est normalisée par celle l'  $\alpha$  globine en premier temps, et par celle du  $\beta$  actine en deuxième temps.

### 5.2-L'immunofluorescence :

Pour savoir le pourcentage d'induction des C29, c'est-à-dire quel est le pourcentage des cellules qui se différencient et expriment la globine adulte ( $\beta$  majeur) après l'ajout du Tamoxifen,  $5 \times 10^6$  cellules ont été induites pour 48 heures avec une concentration finale de Tamoxifen de 10 micromolaires ( $\mu$ M). Après la perméabilisation des cellules (Tween 20) et leur fixation avec du formaldéhyde 10%, nous les avons incubées avec un anticorps anti-hémoglobine de souris (*Research plus*) puis avec un anticorps secondaire conjugué au PE. Dans la figure 13, nous montrons que les C29 sont GFP positifs à environ 95% c'est-à-dire que 95% des cellules expriment l'EKLF et presque 0% expriment la globine adulte ( $\beta$  majeur). Après l'induction par le Tamoxifen, 98% des cellules expriment la globine adulte. Nous avons remarqué que le pourcentage des

cellules GFP positives après induction diminue; Ce phénomène peut être du à la différenciation des cellules. Cette expérience nous a montré que le système d'induction EKLf-ER fonctionne efficacement et qu'on peut induire les cellules jusqu'à 98%, ce qui diffère cette lignée d'autres connues (MEL et K562, voir discussion).

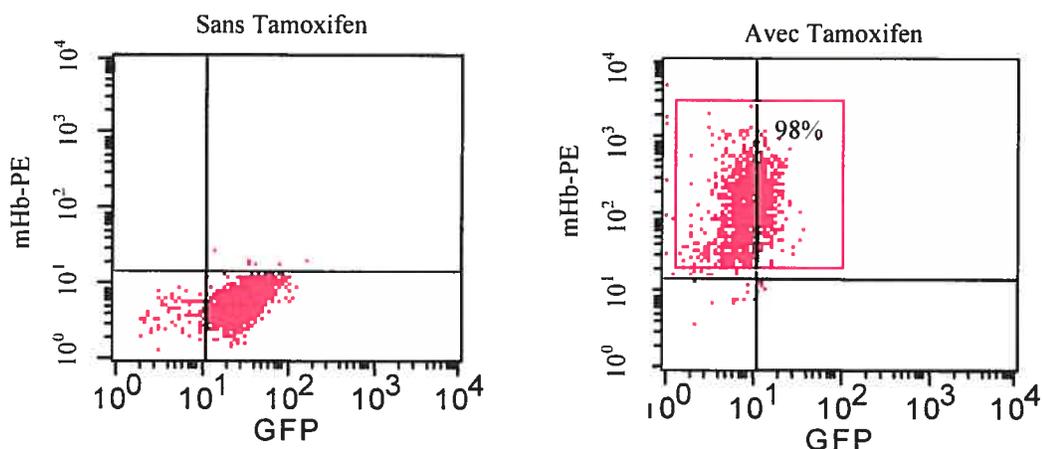


Figure 13 : Analyses par FACS de l'expression du gène  $\beta$  majeur avec et sans Tamoxifen. Le pourcentage des cellules (C29) qui expriment la globine adulte est environ 98%.

### 5.3-Coloration avec le *Wright Giemsa* :

La morphologie et le type des cellules (C29) avant et après induction (sans et avec Tamoxifen) ont été vérifiés par une coloration avec le *Wright Giemsa*. Environ  $5 \times 10^4$  cellules ont été fixées sur des lames traitées avec la polylysine. La figure 14 montre qu'avec Tamoxifen (cellules induites), un grand pourcentage des cellules sont des érythrocytes (cellules roses, figure 14 c et d). Le fait que les cellules ne sont pas des érythrocytes à 98% (en accord avec le résultat de l'immunofluorescence : Paragraphe 5.2) est du à ce que, en présence du Tamoxifen, pas toutes les cellules se différencient en érythrocytes. Elles se différencient (pendant les 48 heures d'induction) en des cellules appartenant à différents stades de l'érythropoïèse après le stade proérythroblaste auquel les cellules appartiennent, mais ça ne les empêchent pas d'exprimer la globine adulte ( $\beta$  majeur) et former l'hémoglobine. Alors 98% des cellules expriment la  $\beta$  globine après induction par le Tamoxifen, mais pas 98% des cellules sont des érythrocytes (figure 14d).

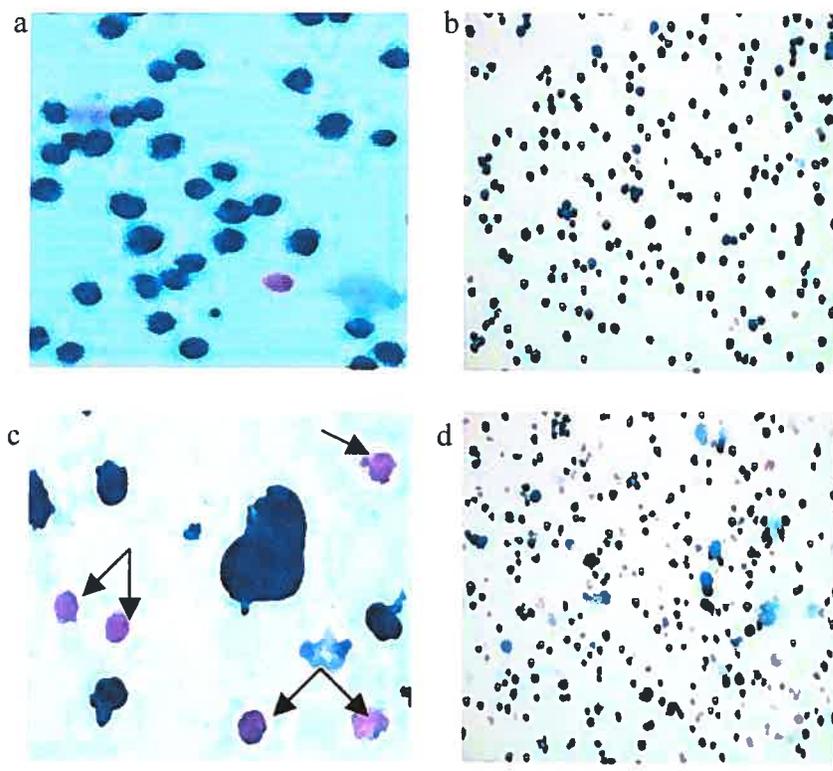


Figure 14 : coloration avec le *Wright Giemsa* des C29. a (magnification 40x10) et b (magnification 10x10) : Sans Tamoxifen. c (magnification 40x10) et d (magnification 10x10) : Avec Tamoxifen.

### **C- Les ChIPs (Chromatin Immunoprecipitation) :**

Plusieurs études ont été faites sur la régulation épigénétique du locus de la  $\beta$  globine de souris concernant les modifications post-traductionnelles des histones et le recrutement des facteurs de transcription spécifiques et ubiquitaires au niveau du LCR et du promoteur du gène  $\beta$  majeur. La plupart de ces études ont été faites dans des lignées transformées (comme les MEL ou les K562) d'où vient l'importance de notre lignée dont le contexte est considéré comme normal.

Après la caractérisation de la lignée et partant de l'hypothèse que les facteurs de transcription sont recrutés au promoteur selon une certaine cinétique, nous avons vérifié le rôle d'EKLF dans le recrutement des facteurs de transcription ubiquitaires (TFII-D) et érythroïde- spécifiques (NF-E2 et GATA-1) et les modifications post-traductionnelles (acétylation et méthylation) des histones H3 et H4 au niveau du promoteur du gène  $\beta$  majeur afin de valider cette lignée pour une étude de régulation épigénétique. La technique utilisée est l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Le niveau d'enrichissement par un facteur de transcription ou par une histone acétylée ou diméthylée a été vérifié par des PCR en duplex, c'est-à-dire en amplifiant deux régions en même temps : la région d'intérêt (le promoteur du gène  $\beta$  majeur dans notre cas) et une région d'un gène non exprimé dans la lignée érythroïde comme contrôle interne (le promoteur du gène ZFP37 dans notre cas : Bottardi et al., 2003). Les PCRs ont été faites en suivant une concentration croissante de l'ADN obtenue à partir des ChIP en restant dans la phase linéaire (Figure 15).

Pour tous les résultats de ChIP, nous avons utilisé le test de comparaison d'échantillons non paramétrique de *Wilcoxon-Mann-Whitney* puisque nos résultats n'ont pas une distribution normale.

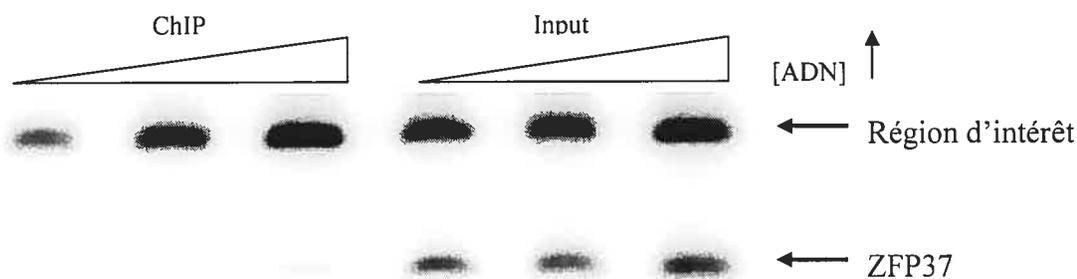


Figure 15 : Exemple de PCR en phase linéaire d'un ChIP montrant l'amplification de deux régions, celle d'intérêt et celle de contrôle. ChIP : ADN obtenu après l'immunoprécipitation. Input : ADN récupéré avant l'immunoprécipitation.

#### *1-TF-IID :*

TF-IID est un composant du complexe d'initiation de la transcription et parmi les

premiers facteurs généraux recrutés au promoteur des gènes avant l'ARN polymérase II afin d'initier la transcription. Son recrutement au niveau du promoteur du gène  $\beta$  majeur a été vérifié en présence et en absence d'EKLF par l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). On sait que sans EKLF il n'y a pas d'expression de la globine adulte alors qu'en sa présence, il y a une expression (figure 12).

Alors, la chromatine de  $1 \times 10^6$  cellules des C29 sans Tamoxifen et celles de  $1 \times 10^6$  cellules des C29 avec Tamoxifen ont été immunoprécipitées avec l'anticorps anti TF-IID. Le résultat est montré dans la figure 16. En absence d'EKLF, le TF-IID n'est pas présent au promoteur du gène  $\beta$  majeur, alors qu'il lie l'ADN (enrichissement de 10 fois;  $\alpha \leq 0.1\%$ ) au niveau du promoteur quand l'EKLF est transporté vers le noyau. Ce résultat est logique et attendu puisque la transcription du gène  $\beta$  majeur est liée à la présence d'EKLF. Par contre, on ne peut pas dire que TF-IID est recruté au promoteur par EKLF. On sait que EKLF interagit avec le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (voir introduction); alors c'est possible qu'après le remodelage par EKLF, les composants du complexe d'initiation de la transcription s'installent au promoteur dont TF-IID fait partie.

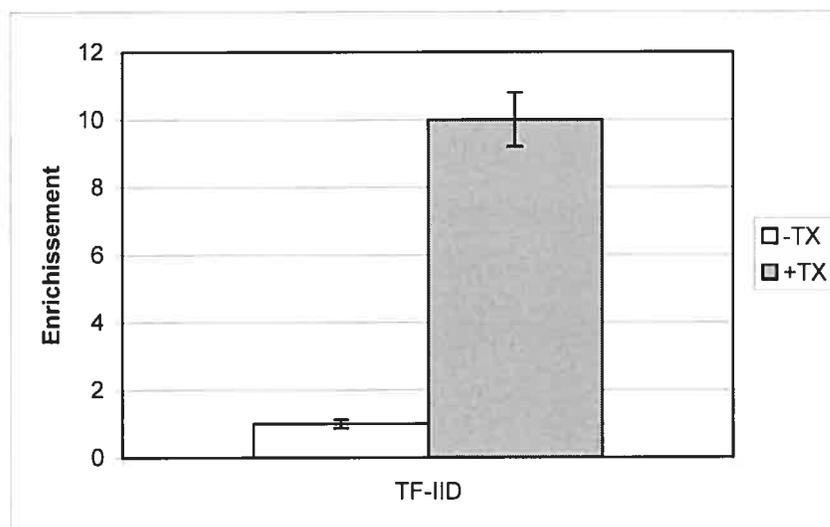


Figure 16 : L'enrichissement du TF-IID au promoteur du gène  $\beta$  majeur; il est 10 fois plus en présence d'EKLF (+TX) qu'en son absence (-TX). TX : Tamoxifen.

## 2-GATA-1 et NF-E2 :

Après TF-IID, nous avons regardé l'influence d'EKLF sur le recrutement des facteurs de transcription érythroïdes-spécifiques afin d'établir la cinétique d'activation du gène de la globine adulte ( $\beta$  majeur). Comme dans le cas de TF-IID, des essais de CHIP ont été effectués sur des cellules induites et non induites (c'est-à-dire en présence et en absence d'EKLF).

Concernant GATA-1, les résultats des CHIP (figure 17) montrent qu'il est présent au niveau du promoteur du gène  $\beta$  majeur en présence et en absence d'EKLF. Le niveau d'enrichissement est de 5 fois supérieur à ce qui est observé au ZFP37 (le gène de contrôle). Alors, nous pouvons dire que GATA-1 est recruté au promoteur avant EKLF et/ou son recrutement n'est pas affecté par EKLF. Ce résultat est en accord avec des études qui montrent que l'expression d'EKLF est régulée par GATA-1. Ces études montrent aussi que GATA-1 est parmi les premiers facteurs recrutés au promoteur du gène  $\beta$  majeur (voir introduction).

Pour NF-E2, il n'a pas un site de liaison complet dans le promoteur du gène  $\beta$ , mais il est déjà montré qu'il s'associe au promoteur (Sawado et al., 2003). Le résultat est un peu surprenant; en absence d'EKLF, NF-E2 est présent au promoteur du gène  $\beta$  alors qu'en présence d'EKLF, il n'est pas lié au promoteur (enrichissement de 6.5;  $\alpha \leq 0.1\%$ ).

Cette observation nous amène à plusieurs explications qui vont être détaillées dans la section de discussion. Cependant, on sait que NF-E2 est plutôt impliqué dans les modifications post-traductionnelles des histones et que EKLF s'associe avec le complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant SWI/SNF, alors il semble que NF-E2 est important dans l'initiation de la transcription mais il n'est pas impliqué dans le processus de la transcription une fois démarrée au promoteur du gène  $\beta$  majeur.

Les niveaux d'enrichissement de GATA-1 et NF-E2 au promoteur du gène  $\beta$  en présence et en absence d'EKLF sont montrés dans la figure 17.

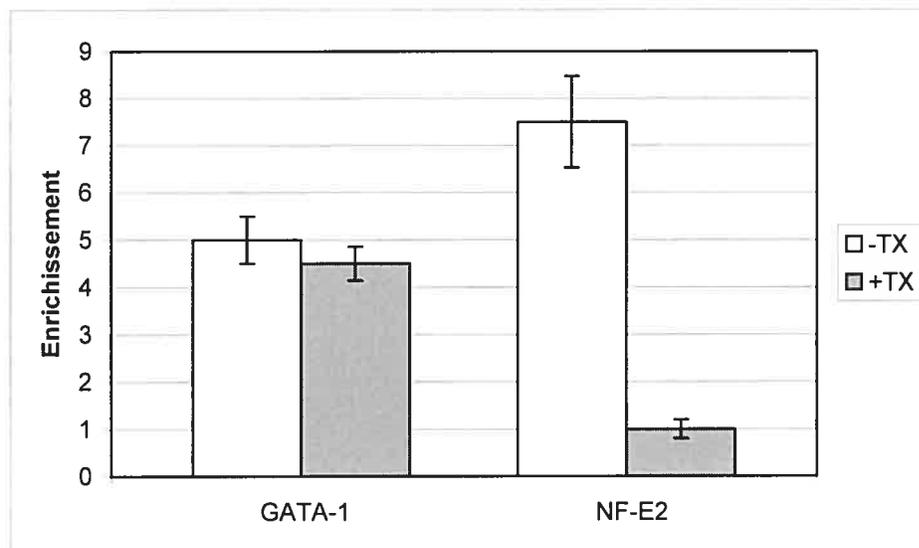


Figure 17 : Le niveau d'enrichissement pour GATA-1 et NF-E2 au promoteur  $\beta$  majeur. Les barres pointillées : Sans Tamoxifen (-TX, en absence d'EKLF). Les barres raillées obliquement : Avec Tamoxifen (+TX, en présence d'EKLF).

### 3-Les histones :

Pour qu'un gène soit exprimé, l'état de sa chromatine doit être dans un contexte permettant aux facteurs de transcription de se lier à leurs séquences au niveau des régions régulatrices de ce gène. Dans un autre sens, la chromatine doit être ouverte et sensible à la DNase (euchromatine). Les modifications post-traductionnelles des histones sont parmi les facteurs qui contrôlent l'état de la chromatine. Ces modifications comportent l'acétylation des histones H3 et H4, la méthylation des résidus Lysine (4 et 9) de l'histone H3 et la phosphorylation.

Après TF-IID, GATA-1 et NF-E2, nous avons examiné le rôle d'EKLF dans les modifications post-traductionnelles des histones. Des ChIPs ont été réalisés sur les C29 sans et avec Tamoxifen en ciblant l'acétylation des histones H3 et H4 et la diméthylation du résidu Lysine 4 de l'histone H3 (car sa méthylation est associée avec l'activation des gènes : voir introduction).



Au début, nous avons regardé l'acétylation de l'histone H3. En absence d'EKLF, c'est-à-dire sans Tamoxifen, l'H3 au promoteur du gène  $\beta$  majeur est acétylée 3 fois plus que celle du gène ZFP37; lorsque EKLF est transporté au noyau après l'ajout du Tamoxifen, l'acétylation d'H3 au promoteur  $\beta$  devient 7.5 fois plus élevée que celle de ZFP37. Dans un autre sens, en présence d'EKLF, l'acétylation de H3 augmente de 4.5 fois ( $\alpha \leq 0.1\%$ ) qu'en son absence au niveau du promoteur du  $\beta$  majeur (figure 18).

Concernant l'histone H4, il semble que EKLF n'a pas d'effet sur son état d'acétylation. En absence et en présence d'EKLF (sans et avec Tamoxifen), H4 est acétylée environ 4 fois plus au promoteur du gène  $\beta$  majeur que celle au niveau du ZFP37 (figure 18).

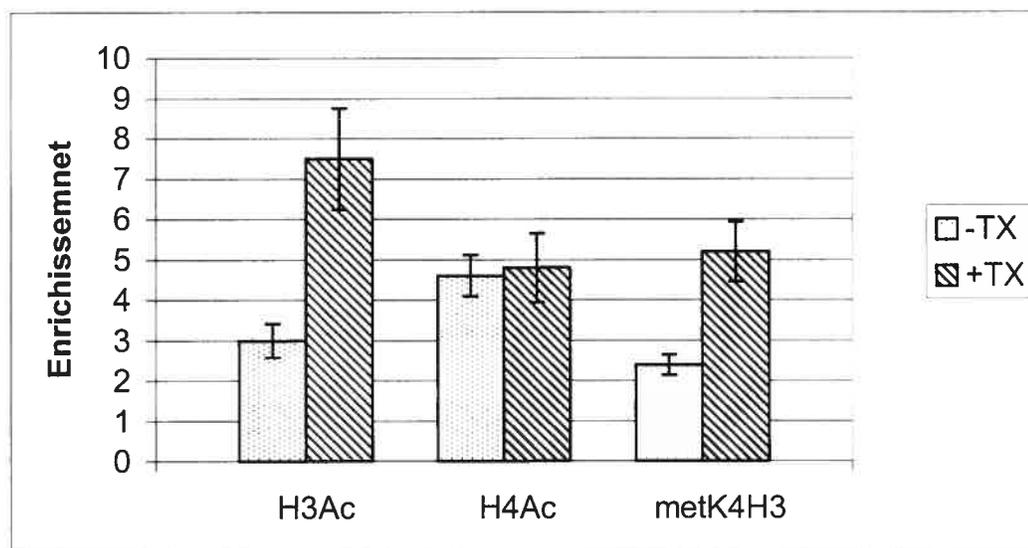


Figure 18 : Les ChIPs pour les histones H3 et H4 montrant le niveau d'enrichissement au promoteur du gène  $\beta$  majeur. Les barres pointillées : Sans Tamoxifen (-TX, en absence d'EKLF). Les barres raillées obliquement : Avec Tamoxifen (+TX, en présence d'EKLF). H3Ac : Histone H3 acétylée, H4Ac : histone H4 acétylée, meK4H3: lysine 4 diméthylée de l'H3.

Donc concernant les histones H3 et H4, EKLF influence seulement l'acétylation de H3 au niveau du promoteur de  $\beta$  majeur. Ce résultat ne signifie pas que EKLF n'a pas de rôle dans l'acétylation de H4, peut être qu'il l'influence au niveau d'un(des) site(s) autre

que le promoteur du gène  $\beta$ , comme HS2 ou HS3 du LCR (car les boîtes CACC où EKLF se fixe à l'ADN sont présentes dans HS2 et HS3).

En seconde étape, nous avons testé la di-méthylation du résidu Lysine 4 de l'histone H3 (metK4H3). Quand EKLF est restreint au cytoplasme (sans Tamoxifen), la K4H3 est méthylée 2.5 fois plus au promoteur du gène  $\beta$  majeur que celui de ZFP37. Alors qu'en présence d'EKLF (avec Tamoxifen), la di-méthylation devient 5 fois supérieur à ZFP37 (figure 18). À partir de ce résultat, il paraît que EKLF influence la di-méthylation de la Lysine 4 de H3 en l'augmentant de 2.5 fois environ ( $\alpha \leq 0.1\%$ ).

Les résultats des ChIP montrent que la lignée EKLF<sup>-/-</sup> (18-SCF) peut servir comme un outil efficace pour l'étude de la régulation épigénétique du locus de la  $\beta$  globine et elle peut dévoiler la cinétique d'activation du gène  $\beta$ .

Pour toutes les expériences de ChIP, l'immunoprécipitation de la chromatine pour chaque facteur ou histone (acétylée ou méthylée) a été faite entre 2-3 fois. Pour chaque expérience de ChIP, trois réactions de PCR en phase linéaire ont été prises en considération.

**D- Future directions : les clones avec les transgènes humains :**

La deuxième partie de l'étude consiste à élucider le rôle d'EKLF dans l'activation du gène de la  $\beta$  globine humaine. Le rôle d'EKLF peut être divisé en deux parties : la première est son influence sur le recrutement des facteurs de transcriptions spécifiques et ubiquitaires au promoteur du gène  $\beta$  et aux sites hypersensibles du LCR HS1 et HS2 et sur les variations de l'état de la chromatine ; la deuxième partie est de vérifier le(s) site(s) important(s) pour son activité (promoteur  $\beta$ , HS2 et HS3).

La première étape a été d'établir des clones individuels transfectés avec la construction formée du gène  $\beta$  humain (avec son promoteur) ou avec la construction du LCR-gène  $\beta$  (voir matériels et méthodes). Ces clones ont été établis à partir de la lignée EKLF<sup>-/-</sup>, plus précisément à partir des C29 en co-transfectant  $1 \times 10^7$  cellules avec l'une ou l'autre des constructions de la globine humaine (gène  $\beta$  ou  $\mu$ LCR-gène  $\beta$ , figure 19) et le vecteur pIRESpuro qui exprime le gène de résistance à la puromycine. La façon de transfection est la suivante : Nous avons pris  $1 \times 10^7$  cellules et nous les avons co-transfectées par électroporation avec  $5 \mu\text{g}$  d'ADN de l'une des constructions de globine et  $1 \mu\text{g}$  d'ADN du vecteur pIRESpuro que nous l'avons laissé circulaire. Le pIRESpuro entre dans la cellule et reste sous forme d'un épisode, puis après 2-3 jours, l'épisode s'intègre dans le génome ou il sort de la cellule.

Le premier but de cette façon de transfection était d'éviter que notre transgène (gène  $\beta$ ) s'intègre à la même place du gène de sélection, c'est-à-dire d'éviter que nous sélectionnions les sites d'intégration favorable à la transcription et que les sites où le gène de la résistance à la puromycine ne peut pas être exprimé à cause de l'effet de positionnement induit par l'environnement ne seront pas sélectionnés. Donc en faisant un essai avec un vecteur circulaire, nous ne basons pas et nous ne sélectionnons pas pour les sites d'intégration favorable à la transcription.

Le deuxième but était d'éviter qu'une séquence procaryote (puromycine) riche en site de méthylation d'ADN (les îlots CPG) qui est associée au silence des gènes, éviter qu'elle s'intègre à côté de notre transgène.

Alors, après 24 heures de la co-transfection des cellules, nous avons ajouté la puromycine avec une concentration finale de 1 µg/ml. Après 48 heures, nous avons enlevé la puromycine et nous commençons à isoler les clones individuels en utilisant une micro pipette pasteur sous le microscope. La manière de transfection est résumée dans la figure 19.

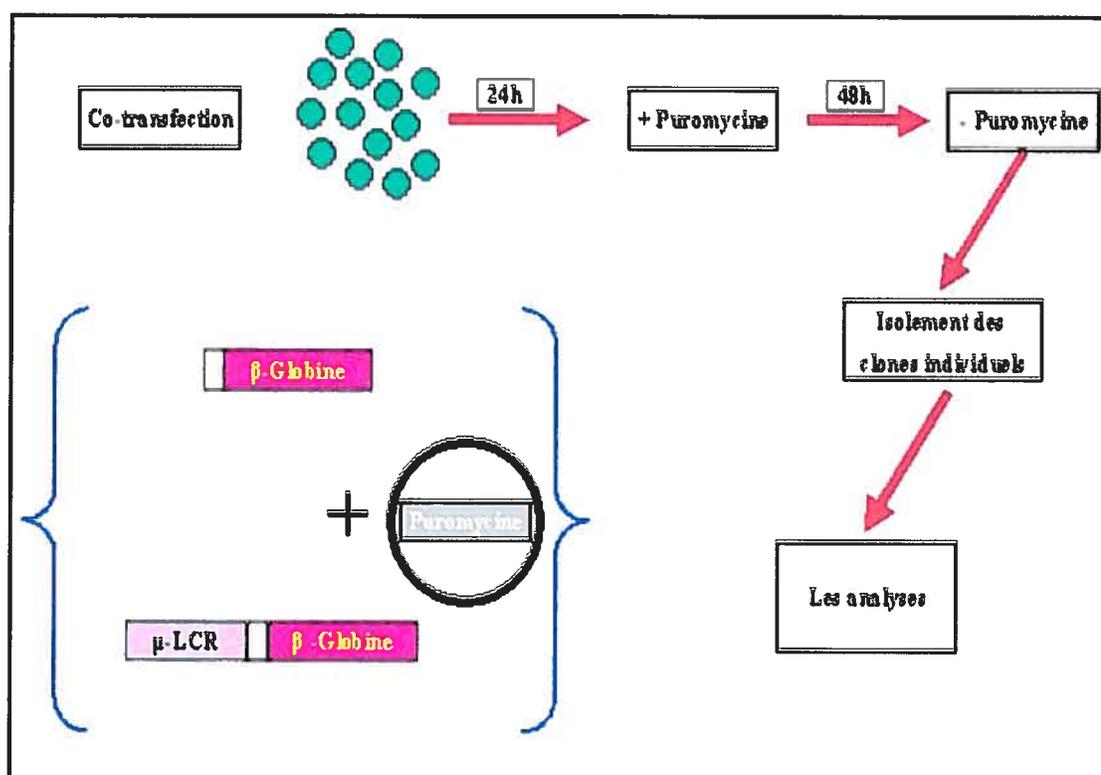


Figure 19 : Schéma montrant les étapes de la co-transfection des C29 avec les constructions de globine humaine : Le gène  $\beta$  et le  $\mu$ LCR-gène  $\beta$ .

### 1- Les clones gène- $\beta$ :

Premièrement on a établi les clones individuels ayant le gène  $\beta$  globine humain comme transgène en utilisant la manière de transfection qu'on vient de la décrire. Les clones ont

été isolés à partir des transfections faites à différents temps. La présence du transgène a été vérifiée par PCR en utilisant le jeu d'amorce « humain  $\beta$ -1 » (voir matériels et méthodes) qui amplifie une région du promoteur du gène  $\beta$ . Parmi 40 clones isolés, 31 sont positifs, c'est-à-dire ils ont le transgène intégré dans leurs génomes. 20 clones de ces 31 sont sensibles à la puromycine, ce qui veut dire qu'ils ont perdu le gène de résistance à la puromycine.

Ce résultat montre que la façon de transfection utilisée est efficace et on a réussi à établir des clones qui ont le transgène (77% des clones isolés) mais ils n'ont pas le gène de sélection (75% des clones positifs). La figure 20 nous montre un exemple des PCRs faites sur les clones gène- $\beta$  humain isolés.

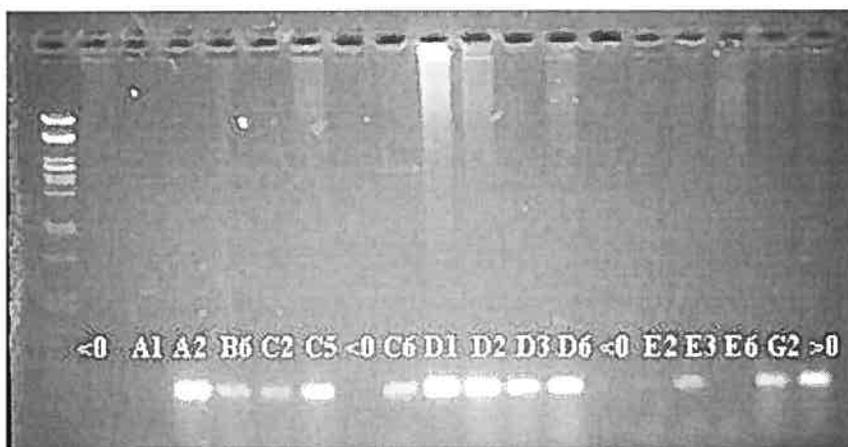


Figure 20 : Une photo d'un gel d'agarose 2% montrant les clones positifs transfectés avec le gène  $\beta$  humain. <0 :Contrôle négatif, >0 : Contrôle positifs. A1, A2, B6, C2, C5, C6, D1, D2, D3, D6, E2, E3, E6 et G2 : les noms de 14 clones parmi les 40 isolés.

## 2- Les clones $\mu$ LCR :

De la même façon, nous avons établi à partir des C29 des clones individuels ayant comme transgène la construction  $\mu$ LCR-gène  $\beta$  humain (Fig.19).

À partir de deux transfections indépendantes, on a isolé 30 clones. Par PCR, on a trouvé que 20 clones parmi les 30 sont positifs. 12 clones de ces 20 sont sensibles à la

puromycine (probablement ils ont perdu le gène de puromycine). Les PCRs établies sur les clones  $\mu$ LCR ont été faites en utilisant deux jeux d'amorces différents : un qui amplifie une région du promoteur du gène  $\beta$  humain et l'autre amplifie une région dans le HS2 humain (voir matériels et méthodes). Les résultats sont montrés dans la figure 21.

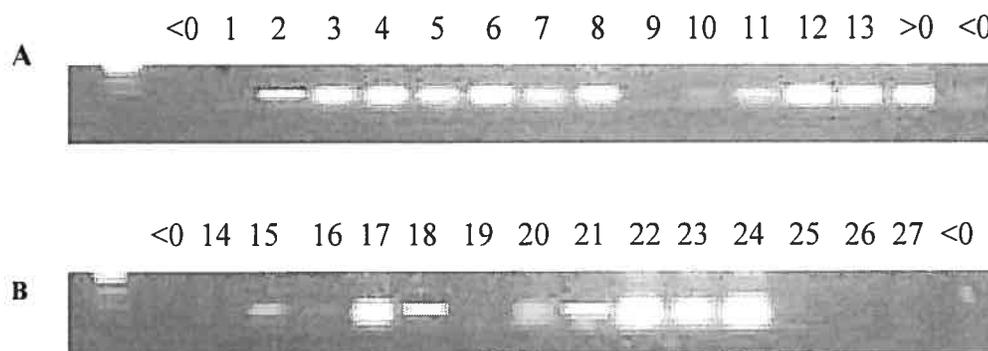


Figure 21 : PCRs sur les clones  $\mu$ LCR-gène  $\beta$ . A) PCR en amplifiant une région du promoteur du gène  $\beta$ . B) PCR en amplifiant une région dans HS2.

Les clones gène- $\beta$  et les clones  $\mu$ -LCR seront caractérisés en plusieurs étapes. Au début, le nombre de copie du transgène (gène- $\beta$  et  $\mu$ -LCR –gène- $\beta$ ) dans chaque clone sera déterminé par buvardage du type « southern ». Une fois le nombre de copie est déterminé, nous allons sélectionner les clones à faible nombre de copie (entre 1 et 3 copies) et vérifier l'expression de la globine humaine (gène  $\beta$  humain) en absence (sans TX) et en présence (avec TX) d'EKLF par la technique de protection à la RNase (S1). Les clones intéressants (qui montrent une différence de niveau d'expression avec et sans EKLF) seront le sujet de l'investigation de l'influence de EKLF sur le recrutement des facteurs de transcription spécifiques (GATA-1 et NF-E2) au niveau du promoteur du gène  $\beta$ , du HS2 et de HS3. De même pour l'état de l'acétylation et de méthylation au niveau de ces même sites du locus humain.

L'étude de ces clones va nous permettre de valider un modèle de l'activation du gène de la  $\beta$  globine en comparant les résultats des clones avec les transgènes humains et ceux avec le locus endogène (de souris).

Les résultats peuvent nous dévoiler un modèle de la régulation épigénétique et la cinétique d'activation du locus de la  $\beta$  globine.

## **4. Discussion**

Dans cette section nous allons montrer l'importance de cette nouvelle lignée; pourquoi une telle lignée a été faite? Quels sont ses avantages et désavantages par rapport aux lignées déjà existantes? Quelles sont ses utilités?

D'autre part, en répétant des expériences déjà faites sur le locus de la  $\beta$  globine de souris (mais pas dans un contexte *EKLF*<sup>-/-</sup>) pour valider notre lignée cellulaire pour des études de régulations épigénétiques, nous avons trouvé et montré des résultats différents de ceux obtenus par d'autres études avec les lignées existantes (MEL). Ces résultats nous ont permis de proposer un modèle préliminaire de la cinétique d'activation du gène  $\beta$  majeur au niveau de son promoteur.

### **A-La lignée *EKLF*<sup>-/-</sup> : plusieurs questions et réponses :**

La première question à laquelle nous allons répondre est : quelles sont les raisons pour établir une nouvelle lignée érythroïde malgré l'existence de plusieurs autres utilisées pour des études pareilles?

En regardant dans la littérature, on trouve que la plupart des études ont été faites avec des lignées transformées qui viennent des tissus leucémiques et cancéreux qui ont plusieurs gènes dérégulés et plusieurs fonctions anormales.

Prenant un exemple d'une lignée cellulaire assez connue et très utilisée, les MEL (*Murine erythroleukemias*). Dans cette lignée, le facteur de transcription PU.1, un membre de la famille ETS, est surexprimé. Il est déjà montré que le virus de *Friend* cause une érythroleucémie chez la souris à cause de l'insertion du provirus dans le locus de PU.1, ce qui aboutit à une surexpression de PU.1 (Cantor et Orkin 2002).

PU.1 joue des rôles essentiels dans le développement lymphoïde, des granulocytes et des monocytes. Il participe à la régulation transcriptionnelle de certains gènes en reconnaissant une séquence ADN contenant un motif central minimum 5'-GGAA-3' dans la région promotrice de ces gènes. Ainsi, la surexpression de PU.1 dans le proérythroblaste dans lequel il n'est pas normalement exprimé, entraîne probablement un déséquilibre du programme transcriptionnel dans cette cellule.



PU.1 est un facteur de transcription hématopoïétique et il est impliqué dans le destin des progéniteurs hématopoïétiques. Il est exprimé dans les lignées myéloïdes et lymphoïdes mais pas dans les érythroïdes (Zhang et al. 1999). Dans les cellules MEL (où il est surexprimé) il bloque la différenciation érythroïde, mais quand elles entrent en différenciation (suite à un traitement avec le DMSO) son expression diminue fortement. De plus, il interagit avec le facteur de transcription érythroïde spécifique GATA-1; il semble que cette interaction bloque la différenciation érythroïde en réprimant GATA-1. Cette inhibition de l'activité de GATA-1 nécessite son interaction avec PU.1 et elle cible son domaine à doigts de Zinc qui est important pour l'interaction de GATA-1 avec plusieurs autres protéines incluant FOG, CBP, EKLF et SP1 (figure 22)(Rekhtman et al., 1999). D'autre part, la même étude montre que PU.1 inhibe l'activité transcriptionnelle basale médiée par GATA-1 et FOG-1 au niveau du promoteur de la sous unité érythroïde-spécifique de NF-E2, la p45 (Rekhtman et al., 1999). En utilisant la technique de l'immunoprécipitation de la chromatine des cellules MEL, Suzuki et al. (2003) montrent que PU.1 lie le corépresseur mSin3A et forment un complexe avec l'histone déacétylase HDAC1 au niveau du IVS2 (*InterVening Sequence 2*) du gène de la  $\beta$  globine. Une étude récente (Théoleyre et al., 2004) montre que PU.1 inhibe l'épissage des pre-ARNm érythroïde-spécifique dans un contexte érythroleucémiques (comme dans les cellules MEL).

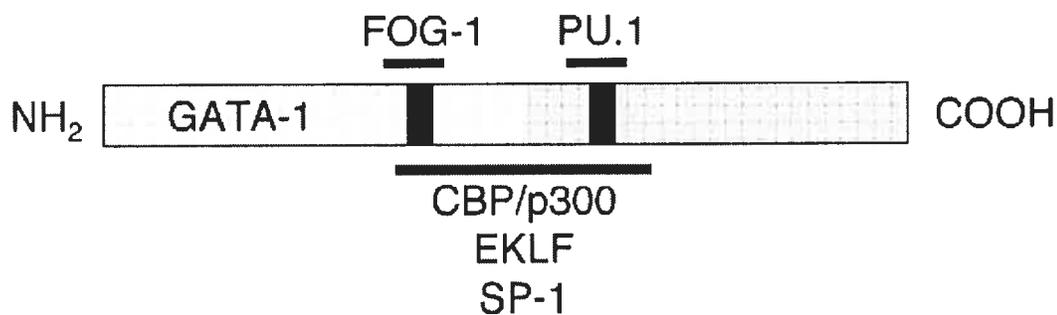


Figure 22 (Cantor et Orkin, 2002) : les facteurs qui interagissent avec GATA-1

On sait que l'acétylation des facteurs de transcription érythroïdes spécifiques GATA-1, NF-E2 et EKLF par les cofacteurs CBP/P300 est nécessaire pour leurs activités, et que l'acétylation des histones est accompagnée par l'activation des gènes (voir introduction).

Cependant, une étude détaillée du mécanisme par lequel PU.1 inhibe la différenciation érythroïde dans les cellules MEL montre que GATA-1 n'est pas le seul facteur affecté par la sur-expression de PU.1 (Hong et al., 2002). Les auteurs montrent que PU.1 inhibe l'acétylation de GATA-1 (*in vitro* et *in vivo*), NF-E2 et EKLF (*in vitro*) médiée par le cofacteur CBP. Cette inhibition est assumée par le domaine d'activation et le domaine ETS de PU.1. En plus, PU.1 inhibe l'acétylation des histones induite lors de la différenciation au niveau des gènes du locus de la  $\beta$  globine (Hong et al., 2002). De même pour les cellules K562, la surexpression de PU.1 inhibe la différenciation érythroïde alors que la différenciation monocytiques (des monocytes) des cellules (Delgado et al., 1998).

Toutes ces études montrent que la régulation des gènes de globine n'est pas dans un contexte normal dans les MEL, les K562 et, bien sûr, toutes les lignées qui viennent des tissus leucémiques et cancéreux. Alors on peut dire que les résultats de la régulation des gènes la  $\beta$  globine obtenus dans telles lignées peuvent être différents de ceux qui peuvent être obtenus à partir d'une lignée normale.

Puisque ces lignées cellulaires ne peuvent pas servir comme un meilleur outil pour l'étude de la cinétique et de la régulation épigénétique du gène de la  $\beta$  globine, et puisque ces études n'étaient pas dans un contexte EKLF<sup>-/-</sup>, nous avons décidé d'immortaliser une nouvelle lignée cellulaire érythroïde EKLF<sup>-/-</sup> qui va être dans un contexte normal.

Concernant les avantages de notre lignée cellulaire (la lignée 18-SCF), elle est immortalisée à partir d'un foie fœtal EKLF<sup>-/-</sup> et P53<sup>-/-</sup>. Il est déjà montré que la déficience en P53 n'affecte pas la différenciation érythroïde (Metz T. et al., 1995). Notre lignée cellulaire montre aussi une différenciation érythroïde normale. Par rapport à l'infection de la lignée 18-SCF par le rétrovirus exprimant les proto-oncogènes *myc* et *raf*, ces deux oncogènes (avec le P53) sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire où ils inhibent l'apoptose et aident les cellules à proliférer et ne pas entrer dans une voie de différenciation (voir introduction : Section immortalisation cellulaire). Par contre, le facteur PU.1 est hématopoïétique spécifique et son expression (comme dans

les MEL) dérégule la différenciation érythroïde et affecte l'activité de plusieurs facteurs de transcription érythroïdes spécifiques et l'état de la chromatine.

Concernant le système d'induction introduit dans la lignée 18-SCF (le récepteur d'œstrogène « ER » modifié fusionné avec EKLF), plusieurs études ont utilisé ce système d'induction dans des lignées érythroïdes où le « ER » est fusionné avec EKLF (Coghill et al., 2001) ou GATA-1 (Letting et al., 2003). Ces études montrent que le « ER » n'affecte pas l'activité de la protéine avec laquelle il est fusionné. Il est donc probable que le ER affecte ou modifie les fonctions de EKLF.

D'un autre côté, la lignée 18-SCF est un très bon outil pour l'étude de la régulation du gène de la  $\beta$  globine mais nous pensons qu'elle ne peut pas servir pour l'étude du gène de la  $\gamma$  globine. La raison est que la lignée est immortalisée à partir d'un foie fœtal au jour 12,5 de la gestation où la commutation vers la globine adulte est déjà faite et l'environnement chromatinien du gène fœtal, peut être, n'est pas accessible (voir Introduction). Par contre, à ce stade de la gestation, il y a une expression faible de la globine fœtale ; ce n'est pas, en tout cas, une mauvaise idée d'essayer de regarder l'expression de la  $\gamma$  globine et son état de chromatine en absence et en présence d'EKLF. C'est déjà montré dans des souris transgéniques pour le locus de la  $\beta$  globine humaine que la déficience en EKLF aboutit à plus de transcrite des gènes  $\gamma$  dans le foie fœtal. De plus, la chromatine au niveau du promoteur  $\gamma$  est altérée (Wijgerde et al., 1996)

### **B-Les résultats des ChIPs au promoteur du gène $\beta$ majeur :**

Notre hypothèse était que les facteurs de transcription ne sont pas recrutés au promoteur du gène  $\beta$  majeur en même temps, c'est à dire qu'il y a un facteur recruté premièrement pour changer l'état de la chromatine au promoteur à un certain niveau, ce qui facilite la liaison et le recrutement d'un autre facteur aboutissant à un état de chromatine plus ouverte et ainsi de suite; puis finalement le recrutement de la machinerie

transcriptionnelle générale au promoteur accessible sera établi et il aura une formation du complexe de préinitiation (PIC) et l'activation de la transcription; partant de cette hypothèse et, en même temps, pour valider notre lignée cellulaire pour une étude de régulation épigénétique, nous avons vérifié l'influence d'EKLF sur le recrutement de GATA-1, NF-E2 et TF-IID au promoteur du gène  $\beta$  majeur et sur l'état de la chromatine (acétylation et méthylation). Nous avons trouvé que nos résultats sont différents de ceux obtenus par plusieurs autres études qui sont faites sur les cellules MEL. Cela nous a permis de proposer un modèle, à ce stade, préliminaire pour la régulation et la cinétique de l'activation au promoteur du gène  $\beta$  majeur.

Au début nous allons présenter le modèle qui existe dans la littérature en se basant sur les études faites au niveau du promoteur du gène  $\beta$  majeur. La plupart de ces études proposent que le premier facteur de transcription recruté au promoteur est GATA-1. Letting et al. (2003) suggèrent que GATA-1 est le premier facteur recruté au promoteur du  $\beta$  majeur et il induit l'acétylation des histones H3 et H4 à ce site du locus. Cette même étude montre que le recrutement de GATA-1 et l'acétylation des histones se corrèlent avec la liaison du cofacteur CBP au promoteur.

D'autre part, il semble que GATA-1 influence juste l'acétylation des histones H3 et H4 au promoteur et pas la méthylation de la lysine 4 de l'H3. Par contre, NF-E2 induit cette méthylation à ce site (Kiekhaefer et al., 2002). Le même groupe (Johnson et al., 2002) suggère que GATA-1 et NF-E2 s'associent au promoteur et au LCR et ils amènent l'ARN polymérase II (Pol II) au promoteur. En plus, les auteurs pensent que GATA-1 et NF-E2 travaillent en synergie et l'un facilite le fonctionnement de l'autre.

Cependant, Sawado et al. (2001) montrent que, dans les MEL, l'activation de la transcription du gène  $\beta$  majeur est associée avec le recrutement de NF-E2 à son promoteur. Dans une autre étude, le même groupe Sawado et al. (2003) proposent un modèle de trois étapes pour l'activation du gène  $\beta$  majeur au niveau de son promoteur : la première étape est l'ouverture de la chromatine indépendamment du LCR (peut-être médiée par GATA-1) ce qui permet le recrutement du NF-E2 et du PIC en 2<sup>ème</sup> étape. La troisième étape est l'élongation de la Pol II au promoteur d'une manière LCR dépendante.

Toutes ces études et plusieurs autres nous ont permis de schématiser l'activation de la transcription du gène  $\beta$  majeur et la cinétique du recrutement des facteurs de transcription spécifiques et généraux au niveau de son promoteur. Ce modèle est montré dans la figure 23.

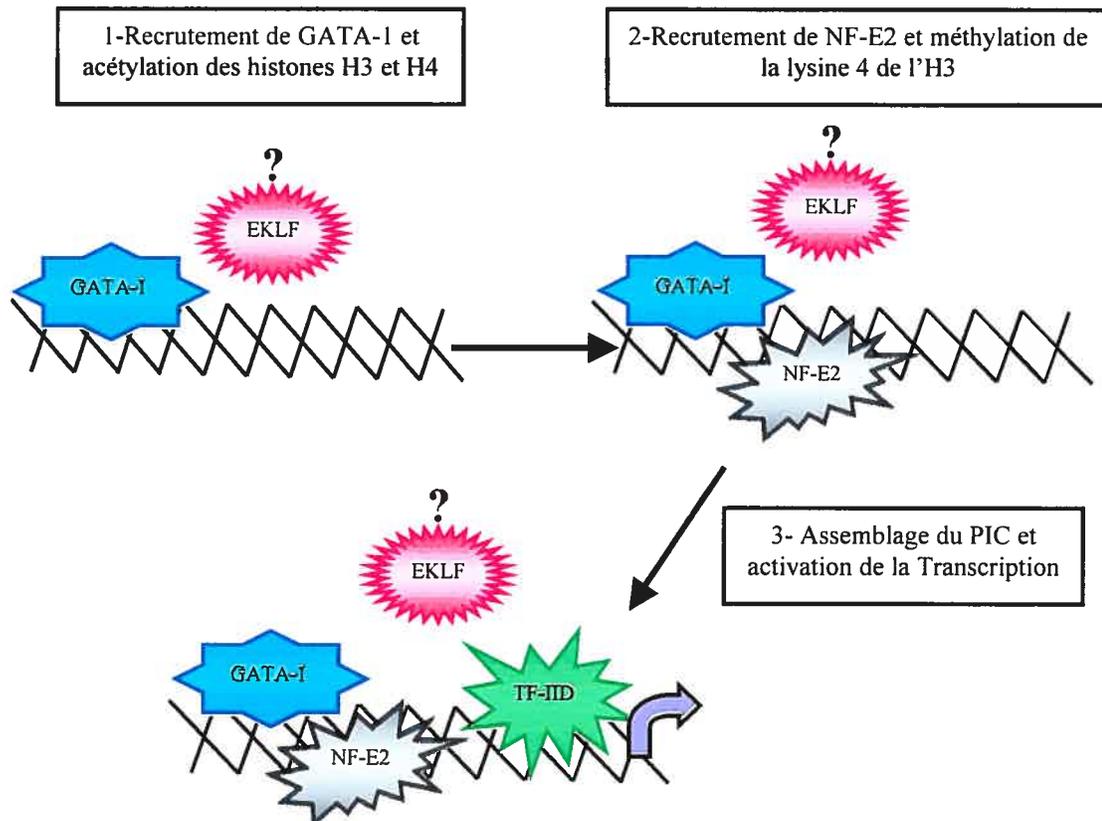


Figure 23 : Modèle proposé dans la littérature de l'activation du gène  $\beta$  majeur. Il est formé de 3 étapes. Cependant, les études ne parlent pas souvent de EKLf. Quelques études proposent qu'il s'associe au promoteur pendant la dernière étape.

Nos résultats suggèrent que : La première étape semble être l'association de GATA-1 et/ou NF-E2 au promoteur du gène  $\beta$  majeur ce qui aboutit à un certain niveau d'acétylation des histones H3 et H4 de méthylation de la lysine 4 de H3. Au moins, on peut dire que l'association de GATA-1 et NF-E2 au promoteur se fait avant celle de EKLf et de TF-IID.

La 2<sup>ème</sup> étape consiste à l'association de EKLf au promoteur du gène  $\beta$  majeur en recrutant avec lui le complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant

SWI/SNF (puisque EKLF s'associe *in vivo* avec SWI/SNF : Voir Introduction). Cette étape facilite l'association de TF-IID et la formation du PIC (complexe de préinitiation) aboutissant à l'augmentation de niveau d'acétylation de l'histone H3 et de celui de la méthylation de la lysine 4 de H3. Ces modifications des histones à cette étape peuvent être le résultat de l'association d'autres co-facteurs ayant une activité de modification des histones. Aussi il est reporté qu'une activité acétyl-transférase d'histone se retrouve au complexe de pré-inhitation de la transcription et cela aboutit à la stabilisation du complexe SWI/SNF au promoteur (Hassan et al. 2001). Dans notre cas, nous ne pouvons pas préciser quel phénomène se passe avant l'autre, les modifications des histones ou le remodelage de la chromatine et formation du PIC. Cependant, il semble que l'ordre de ces phénomènes et la cinétique d'activation dépendent du promoteur (Soutoglou et Talianidis, 2002) .

En fin, la troisième étape consiste en l'activation de la transcription du gène  $\beta$  majeur et le débarquement de NF-E2. Ces résultats nous amènent à proposer le modèle illustré dans la figure 24 et qui est formé de 3 étapes.

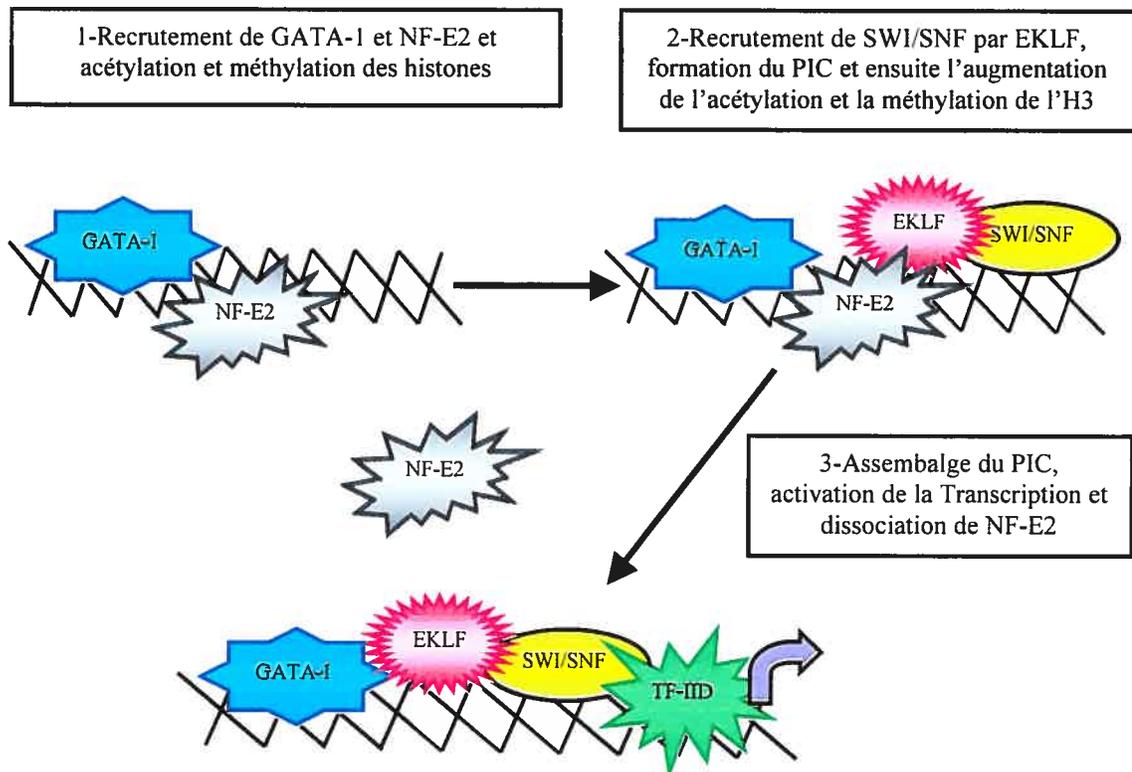


Figure 24 : Modèle que nous proposons de l'activation du gène  $\beta$  majeur. Il est formé de 3 étapes.

Nous avons trouvé aussi que le NF-E2 se dissocie (ou il est absent) du promoteur du  $\beta$  majeur après la rentrée d'EKLF au noyau et l'activation de la transcription du gène  $\beta$ . Ce résultat intéressant nous montre que NF-E2 n'est pas essentiel une fois que la transcription est démarrée. Rappelons que la séquence de liaison de NF-E2 dans le promoteur du gène  $\beta$  est incomplète (voir Introduction).

### **Conclusions :**

Cette étude nous a amené une nouvelle lignée cellulaire érythroïde EKLF<sup>-/-</sup> qui montre une régulation de l'activation du gène  $\beta$  majeur au niveau de son promoteur différente que celle obtenue dans des lignées transformées et leucémiques. Cette lignée représente un outil efficace qui peut expliquer le mode de la régulation des gènes chez les mammifères dans un contexte plutôt normal. En plus cette lignée cellulaire nous a permis de vérifier la cinétique d'activation de la transcription au niveau du gène  $\beta$  majeur et de proposer un modèle différent de celui connu dans la littérature, ce qui aurait été beaucoup plus difficile à faire en cellules primaires; cependant, puisque les cellules MEL ne sont pas idéales pour vérifier une telle cinétique à cause de l'effet de PU.1 sur GATA-1, cette lignée semble optimale pour ce genre d'étude.

## Références

1. Aagaard, L., Laible, G., Selenko, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P.B., Reuter, G. et Jenuwein, T. Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *Embo J.* 1999, 18, 1923-1938.
2. Adami C., Brunda M.J., et Palleroni AV. In vivo immortalization of murine peritoneal macrophages : a new rapid and efficient method for obtaining macrophage cell lines. *J Leukoc Biol.* 1993, 53, 4, 475-478.
3. Agaloti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T. et Thanos, D. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell*, 2000, 103, 667-678.
4. Albrechtsen N., Dornreiter I., Grosse F., Kim E., Wiesmuller L. et Deppert W. Maintenance of genomic Integrity by p53: Complementary Roles for Activated and non-activated p53. *Oncogene*, 1999, 18, 7706-7717.
5. Andrews, N. C., Erdjument-Bromage, H., Davidson, M. B., Tempst, P. et Orkin, S. H. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature*, 1993.1, 362, 6422, 722-728.
6. Andrews, N. C., Kotkow, K. J., Ney, P. A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. et Orkin, S. H. The ubiquitous subunit of erythroid transcription factor NF-E2 is a small basic-leucine zipper protein related to the v-maf oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993.2, 90, 24, 11488-11492.
7. Antonarakis, S. E., Irkin, S. H., Cheng, T. C., Scott, A. F., Sexton, J. P., Trusko, S. P., Charache, S. et Kazazian, H. H.  $\beta$  thalassemia in American Blacks: novel mutations in the TATA box and an acceptor splice site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81, 4, 1154-1158.



8. Antoniou, M., de Boer, E., Spanopoulou, E., Imam, A. et Grosveld, F. TBP binding and the rate of transcription initiation from the human  $\beta$  globin gene. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23, 17, 3473-3480.
9. Antoniou, M., deBoer, E., Habets, G. et Grosveld, F. The human  $\beta$  globin gene contains multiple regulatory regions: identification of one promoter and two downstream enhancers. *Embo J*, 1988, 7, 2, 377-384.
10. Antoniou, M., Geraghty, F., Hurst, J. et Grosveld, F. Efficient 3'-end formation of human  $\beta$  globin mRNA in vivo requires sequences within the last intron but occurs independently of the splicing reaction. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26, 3, 721-729.
11. Anzai H., Ikawa Y. et Atsumi T. Stem cell factor and interleukin-3 induce stepwise generation of erythroid precursor cells from a basic fibroblast growth factor-dependent hematopoietic stem cell line, A-6. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001, 282, 4, 940-946.
12. Armstrong et al. A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcription regulation by EKLF in vitro. *Cell* 1999, 95, 93-104.
13. Asano, H. et Stamatoyannopoulos, G. Activation of  $\beta$  globin promoter by erythroid Kruppel-like factor. *Mol Cell Biol*, 1998, 18, 1, 102-109.
14. Asano, H., Li, X. S. et Stamatoyannopoulos, G. FKLf, a novel Kruppel-like factor that activates human embryonic and fetal  $\beta$ -like globin genes. *Mol Cell Biol*, 1999, 19, 5, 3571-3579.
15. Asano, H., Li, X. S. et Stamatoyannopoulos, G. FKLf-2: a novel Kruppel-like transcriptional factor that activates globin and other erythroid lineage genes. *Blood*, 2000, 95, 11, 3578-3584.
16. 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*. 2001, 410, 120-124.
17. Bao H., Jacobs-Helber S.M., Lawson A.E., Penta K., Wickrema A. et Sawyer S.T. Protein kinase B (c-Akt), phosphatidylinositol 3-kinase, and STAT5 are activated by erythropoietin (EPO) in HCD57 erythroid cells but are constitutively active in an

- EPO-independent, apoptosis-resistant subclone (HCD57-SREI cells). *Blood*, 1999, 93, 11, 3757-73.
18. Bauchwitz, R. et Costantini, F. Developmentally distinct effects on human  $\epsilon$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  globin levels caused by the absence or altered position of the human  $\beta$ -globin gene in YAC transgenic mice. *Hum Mol Genet*, 2000, 9, 4, 561-574.
  19. Baysal, E., Ribeiro, M. L. et Huisman, T. H. Binding of nuclear factors to the proximal and distal CACCC motifs of the  $\beta$ -globin gene promoter: implications for the -101 (C $\rightarrow$ T) "silent"  $\beta$ -thalassemia mutation. *Acta Haematol*, 1994, 91, 1, 16-20.
  20. Bean, T. L. and Ney, P. A. Multiple regions of p45 NF-E2 are required for  $\beta$ globin gene expression in erythroid cells. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25, 12, 2509-2515.
  21. Begley, C. G. et Green, A. R. The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator. *Blood*, 1999, 93, 9, 2760-2770.
  22. Behringer, R. R., Hammer, R. E., Brinster, R. L., Palmiter, R. D. et Townes, T. M. Two 3' sequences direct adult erythroid-specific expression of human  $\beta$ -globin genes in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987, 84, 20, 7056-7060.
  23. Berger, S.L. An embarrassment of niches: the many covalent modifications of histones in transcriptional regulation. *Oncogene*. 2001, 20, 3007-3013.
  24. 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 U S A*. 2002, 99, 8695-8700.
  25. Bieker, J. J. and Southwood, C. M. The erythroid Kruppel-like factor transactivation domain is a critical component for cell-specific inducibility of a  $\beta$ -globin promoter. *Mol Cell Biol*, 1995, 15, 2, 852-860.
  26. Bieker, J. J. Erythroid-specific transcription. *Curr Opin Hematol*, 1998, 5, 2, 145-150.
  27. Blobel, G.A., T. Nakajima, R. Eckner, M. Montminy et S.H. Orkin. CREB-binding protein (CBP) cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroide differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95, 2061-2066.

28. Bond J.A., Wyllie F.S. et Wynford-Thomas D. Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant P53. *Oncogene*, 1994, 9, 1885-1889.
29. Bosari S., Marchetti A., Buttitta F., Graziani D., Borsani G., Loda M. Detection of p53 Mutations by Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Gel Electrophoresis. *Diagn. Mol. Pathol.*, 1995, 4, 249-255.
30. 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*. 2003, 102, 12, 3989-97.
31. Braunstein, M., Sobel, R.E., Allis, C.D., Turner, B.M. et Broach, J.R. Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol Cell Biol*. 1996, 16, 4349-4356.
32. Brown R.C., Pattison S., Ree J.V., Coghill E., Perkins A., Jane S.M. et Cunningham J.M. Distinct domains of erythroïde kruppel like factor modulate chromatin remodelling and transactivation at the endogenous  $\beta$  globin gene promoter. *Mol.Cell.Biol*. 2002, 22, 1, 161-170.
33. Bulger, M. et Groudine, M. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev*, 1999, 13, 19, 2465-2477.
34. Bungert, J., Dave, U., Lim, K. C., Lieu, 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*, 1995, 9, 24, 3083-3096.
35. Cai, S. P., Zhang, J. Z., Doherty, M. et Kan, Y. W. A new TATA box mutation detected at prenatal diagnosis for  $\beta$ -thalassemia. *Am J Hum Genet*, 1989, 45, 1, 112-114.
36. Cantor A.B. et Orkin S.H. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*. 2002, 21, 21, 3368-3376.
37. Chang, J. C., Liu, D. et Kan, Y. W. A 36-base-pair core sequence of locus control region enhances retrovirally transferred human  $\beta$ -globin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89, 7, 3107-3110.

38. Chen X. et Bieker J. Unanticipated repression function linked to erythroid krupel like factor. *Mol. Cell.Biol.* 2001, 21, 9, 3118-3125.
39. Cleveland JL, Troppmair J, Packham G, Askew DS, Lloyd P, Gonzalez-Garcia M, Nunez G, Ihle JN, Rapp UR. V-raf suppresses apoptosis and promotes growth of interleukin-3-dependent myeloid cells. *Oncogene*, 1994, 9, 8, 2217-26.
40. Coghill, E., Eccleston, S., Fox, V., Cerruti, L., Brown, C., Cunningham, J., Jane, S. et Perkins, A. Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) coordinates erythroid cell proliferation and hemoglobinization in cell lines derived from EKLF null mice. *Blood*, 2001, 97, 6, 1861-1868.
41. Collis, P., Antoniou, M. et Grosveld, F. Definition of the minimal requirements within the human  $\beta$ -globin gene and the dominant control region for high level expression. *Embo J*, 1990, 9, 1, 233-240.
42. Côté, J., Quinn, J., Workman, J.L. et Peterson, C.L. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science*. 1994, 265, 53-60.
43. Darnbrough C., Slater S., Vass M. et MacDonald C. Immortalization of murin primary spleen cells by v-myc, v-ras and v-raf. *Exp Cell Res.* 1992, 201, 2, 273-283.
44. De la Barre, A.E., Angelov, D., Molla, A. et Dimitrov, S. The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *Embo J.* 2001, 20, 6383-6393.
45. DeBoer, E., Antoniou, M., Mignotte, V., Wall, L. et Grosveld, F. The human  $\beta$ -globin promoter; nuclear protein factors and erythroid specific induction of transcription. *Embo J*, 1988, 7, 13, 4203-4212.
46. Delgado M.D., Gutierrez P., Richard C., Cuadrado M.A., Moreau-Gachelin F., Leon J. Spi-1/PU.1 proto-oncogene induces opposite effects on monocytic and erythroid differentiation of K562 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 252, 2, 383-391.
47. Delvoye, N. L., Destroismaisons, N. M. et Wall, L. A. Activation of the  $\beta$ -globin promoter by the locus control region correlates with binding of a novel factor to the

- CAAT box in murine erythroleukemia cells but not in K562 cells. *Mol Cell Biol*, 1993, 13, 11, 6969-6983.
48. Dillon N., Trimborn T., Strouboulis J., Fraser P. et Grosveld F. The effect of distance on long-range chromatin interactions. *Mol Cell*. 1997, 1, 131-9.
  49. Donze, D., Jeancake, P. H. et Townes, T. M. Activation of  $\delta$ -globin gene expression by erythroid Kruppel-like factor: a potential approach for gene therapy of sickle cell disease. *Blood*, 1996, 88, 10, 4051-4057.
  50. Donze, D., Townes, T. M. et Bieker, J. J. Role of erythroid Kruppel-like factor in human  $\gamma$  to  $\beta$  globin gene switching. *J Biol Chem*, 1995, 270, 4, 1955-1959.
  51. Dover, J., Schneider, J., Boateng, M.A., Wood, A., Dean, K., Johnston, M. et Shilatifard, A. Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by RAD6. *J Biol Chem*. 2002, 277, 32, 28368-28371.
  52. Dranoff G., Crawford A. D., Sadelain M., Ream B., Rashid A., Bronson R. T., Dickersin G. R., Bachurski C. J., Mark E. L. et Whitsett J. A. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science*, 1994, 264, 713-716.
  53. Driscoll, M. C., Dobkin, C. S. et Alter, B. P.  $\gamma\delta\beta$  thalassemia due to a de novo mutation deleting the 5'  $\beta$ -globin gene activation-region hypersensitive sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86, 19, 7470-7474.
  54. Ellis J., Talbot D., Dillon N. et Grosveld F. Synthetic human beta-globin 5'HS2 constructs function as locus control regions only in multicopy transgene concatamers. *EMBO J*. 1993, 1, 127-134.
  55. Ellis J., Tan-Un K.C., Harper A., Michalovich D., Yannoutsos N., Philipsen S. et Grosveld F. A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human beta-globin locus control region. *EMBO J*. 1996, 15, 3, 562-568.
  56. Elnitski, L., Li, J., Noguchi, C. T., Miller, W. et Hardison, R. A negative cis-element regulates the level of enhancement by hypersensitive site 2 of the  $\beta$ -globin locus control region. *J Biol Chem*, 2001, 276, 9, 6289-6298.

57. Engel, J. D. Developmental regulation of human  $\beta$ -globin gene transcription: a switch of loyalties? *Trends Genet*, 1993, 9, 9, 304-309.
58. Evans, T. et Felsenfeld, G. The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell*, 1989, 58, 5, 877-885.
59. Faustino, P., Lavinha, J., Marini, M. G. et Moi, P.  $\beta$ -Thalassemia mutation at  $-90$  C $\rightarrow$ T impairs the interaction of the proximal CACCC box with both erythroid and nonerythroid factors. *Blood*, 1996, 88, 8, 3248-3249.
60. Fazio, T.G., Kooperberg, C., Goldmark, J.P., Neal, C., Basom, R., Delrow, J. and Tsukiyama, T. Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, 2001, 21, 6450-6460.
61. Feng, W. C., Southwood, C. M. et Bieker, J. J. Analyses of  $\beta$  thalassemia mutant DNA interactions with erythroid Kruppel-like factor (EKLF), an erythroid cell-specific transcription factor. *J Biol Chem*, 1994, 269, 2, 1493-1500.
62. Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., Hu, M., Martin, D. I., Enver, T., Ley, T. J. et Groudine, M. Targeted deletion of 5'HS2 of the murine  $\beta$ -globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the  $\beta$ -globin locus. *Genes Dev*, 1995, 9, 18, 2203-2213.
63. Flanagan, J.F. et Peterson, C.L. A role for the yeast SWI/SNF complex in DNA replication. *Nucleic Acids Res.* 1999, 27, 2022-2028.
64. Forrester, W. C., Novak, U., Gelinas, R. et Groudine, M. Molecular analysis of the human  $\beta$ -globin locus activation region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86, 14, 5439-5443.
65. Forrester, W. C., Takegawa, S., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G. et Groudine, M. Evidence for a locus activation region: the formation of developmentally stable hypersensitive sites in globin-expressing hybrids. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15, 24, 10159-10177.
66. Forsberg E.C. et Bresnick E.H. Histone acetylation beyond promoters: long-rang acetylation patterns in the chromatin world. *BioEssay*. 2001, 23, 820-830.

67. Forsberg, E. C., Downs, K. M. et Bresnick, E. H. Direct interaction of NF-E2 with hypersensitive site 2 of the  $\beta$ -globin locus control region in living cells. *Blood*, 2000, 96, 1, 334-339.
68. Fournier C., Goto Y., Ballestar E., Delaval K., Hever A.M., Esteller M. et Feil R. Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *EMBO*. 2002, 21, 6560-6570.
69. Fox, A. H., Kowalski, K., King, G. F., Mackay, J. P. et Crossley, M. Key residues characteristic of GATA N-fingers are recognized by FOG. *J Biol Chem*, 1998, 273, 50, 33595-33603.
70. Fox, A. H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J. et Crossley, M. Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *Embo J*, 1999, 18, 10, 2812-2822.
71. Fraser, P., Hurst, J., Collis, P. et Grosveld, F. DNaseI hypersensitive sites 1, 2 and 3 of the human  $\beta$ -globin dominant control region direct position-independent expression. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18, 12, 3503-3508.
72. Fraser, P., Pruzina, S., Antoniou, M. et Grosveld, F. Each hypersensitive site of the human  $\beta$ -globin locus control region confers a different developmental pattern of expression on the globin genes. *Genes Dev*, 1993, 7, 1, 106-113.
73. Fu et al. Chromatin structure and transcriptional regulation of the  $\beta$ -Globin locus. *Experimental Cell research*. 2002, 278, 1-11.
74. 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 U S A*, 1996, 93, 22, 12355-12358.
75. 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  $\beta$ -globin locus control region in vivo. *Genes Dev*, 1998, 12, 18, 2863-2873.
76. Gonzalez-Redondo, J. M., Stoming, T. A., Kutlar, A., Kutlar, F., Lanclos, K. D., Howard, E. F., Fei, Y. J., Aksoy, M., Altay, C. et Gurgey, A. A C $\rightarrow$ T substitution

at nt -101 in a conserved DNA sequence of the promoter region of the  $\beta$ -globin gene is associated with a silent  $\beta$  thalassemia. *Blood*, 1989, 73, 6, 1705-1711.

77. 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*, 1996, 87, 5, 1793-1801.
78. Grosveld, F., van Assendelft, G. B., Greaves, D. R. et Kollias, G. Position-independent, high-level expression of the human  $\beta$ -globin gene in transgenic mice. *Cell*, 1987, 51, 6, 975-985.
79. Gumucio, D. L., Shelton, D. A., Zhu, W., Millinoff, D., Gray, T., Bock, J. H., Slightom, J. L. et Goodman, M. Evolutionary strategies for the elucidation of *cis* and *trans* factors that regulate the developmental switching programs of the  $\beta$ -like globin genes. *Mol Phylogenet Evol*, 1996, 5, 1, 18-32.
80. Guy, L. G., Delvoeye, N. et Wall, L. Expression of a human  $\beta$ -globin transgene in mice with the CACC motif and upstream sequences deleted from the promoter still depends on erythroid Kruppel-like factor. *J Biol Chem*, 2000, 275, 5, 3675-3680.
81. Guy, L. G., Mei, Q., Perkins, A. C., Orkin, S. H. et Wall, L. Erythroid Kruppel-like factor is essential for  $\beta$ -globin gene expression even in absence of gene competition, but is not sufficient to induce the switch from  $\gamma$  globin to  $\beta$  globin gene expression. *Blood*, 1998, 91, 7, 2259-2263.
82. Hardison, R., Slightom, J. L., Gumucio, D. L., Goodman, M., Stojanovic, N. et Miller, W. Locus control regions of mammalian  $\beta$ -globin gene clusters: combining phylogenetic analyses and experimental results to gain functional insights. *Gene*, 1997, 205, 1-2, 73-94.
83. Hartzog, G. A. and Myers, R. M. Discrimination among potential activators of the  $\beta$ -globin CACCC element by correlation of binding and transcriptional properties. *Mol Cell Biol*, 1993, 13, 1, 44-56.
84. Hassan A.H., Neely K.E. et Workman J.L. Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell*. 2001, 104, 6, 817-827.



85. Hermeking H. et Eick D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by P53. *Science*, 1994, 265(5151), 2091-2093.
86. Hermeking H., Funk J.O., Reichert M., Ellwart J.W. et Eick D. Abrogation of P53-induced cell cycle arrest by c-Myc: evidence for an inhibitor of P21WAF1/CIP1/SDI1. *Oncogene*, 1995, 11, 7, 1409-1415.
87. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., C.Harris C. p53 Mutations in Humans Cancers. *Sciences*, 1991, 253, 49-53.
88. Holstege, F.C., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S. et Young, R.A. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*. 1998, 95, 717-728.
89. Hong W., Kim A.Y., Ky S., Rakowski C., Seo S.B., Chakravarti D., Atchison M. et Blobel GA. Inhibition of CBP-mediated protein acetylation by the Ets family oncoprotein PU.1. *Mol Cell Biol*. 2002, 22, 11, 3729-43.
90. Hug, B. A., Moon, A. M. et Ley, T. J. Structure and function of the murine  $\beta$ -globin locus control region 5' HS-3. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20, 21, 5771-5778.
91. Hung H.L., A.Y. Kim, W. Hong, C. Rakowski et G.A. Blobel. Stimulation of NF-E2 DNA binding by CREB-binding protein (CBP)-mediated acetylation. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 10715-10721.
92. Hunter S. B., Bandea C., Swan D., Abbott K. et Varma V. A. Mutations in the p53 Gene in Astrocytomas: Detection by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis and Direct DNA Sequencing. *Mod.Pathol*. 1993, 6, 442-445.
93. Igarashi, K., Kataoka, K., Itoh, K., Hayashi, N., Nishizawa, M. et Yamamoto, M. Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature*, 1994, 367, 6463, 568-572.
94. Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M. et Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*. 2000, 403, 795-800.
95. Jaenisch R. et Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals .*nature genetics*. 2003, 33, 245-254.

96. Jenuwein, T. et Allis, C.D. Translating the histone code. *Science*. 2001, 293, 1074-1080.
97. Jimenez, G., Gale, K. B. et Enver, T. The mouse  $\beta$ -globin locus control region: hypersensitive sites 3 and 4. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20, 21, 5797-5803.
98. Johnson KD, Norton JE et Bresnick EH. Requirements for utilization of CREB binding protein by hypersensitive site two of the beta-globin locus control region. *Nucleic Acids Res*. 2002, 30, 7, 1522-30.
99. Johnson K.D., Grass J.A., Boyer M.E., Kiekhäfer C.M., Blobel G.A., Weiss M.J. et Bresnick EH. Cooperative activities of hematopoietic regulators recruit RNA polymerase II to a tissue-specific chromatin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, 99, 18, 11760-11765.
100. Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F.R. et Tjian, R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*, 1987, 51, 6, 1079-1090.
101. Kapur R. et Zhang L. A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. *J Biol Chem*. 2001, 276, 2, 1099-106.
102. Kaszas, E. et Cande, W.Z. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J Cell Sci*. 2000, 113, 3217-3226.
103. Khochbin, S., Verdel, A., Lemercier, C. et Seigneurin-Berny, D. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev*. 2001, 11, 162-166.
104. 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*, 2002, Early edition, 1-6.
105. Kina T., Ikuta K., Takayama E., Wada K., Majumdar A.S., Weissman I.L., Katsura Y. 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, 2, 280-287.

106. Kingston, R.E. et Narlikar, G.J. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 1999, 13, 2339-2352.
107. Ko, L. J. et Engel, J. D. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol*, 1993, 13, 7, 4011-4022.
108. Kornberg, R.D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*. 1974, 184, 868-871.
109. Kornberg, R.D. et Thomas, J.O. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science*. 1974, 184, 865-868.
110. Kosche, K. A., Dobkin, C. et Bank, A. DNA sequences regulating human  $\beta$  globin gene expression. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13, 21, 7781-7793.
111. Koury M.J. et Bondurant M.C. The molecular mechanism of erythropoietin action. *Eur J Biochem*, 1992, 210, 649, 3757-3773.
112. Labie, D. and Elion, J. Sequence polymorphisms of potential functional relevance in the  $\beta$ -globin gene locus. *Hemoglobin*, 1996, 20, 2, 85-101.
113. Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. et Jenuwein, T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. 2001, 410, 116-120.
114. Lakin N. D. et Jackson S. P. Regulation of p53 in Response to DNA Damage. *Oncogene*. 1999, 18, 7644-7655.
115. Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S.T., Heller, R.C., Stebbins, J., Pillus, L. et Sternglanz, R. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97, 5807-5811.
116. Langst, G. and Becker, P.B. ISWI induces nucleosome sliding on nicked DNA. *Mol Cell*, 2001, 8, 1085-1092.
117. Laurent, B.C., Treich, I. et Carlson, M. The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev.* 1993, 7, 583-591.

118. Laverriere, A. C., MacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R. E., Burch, J. B. et Evans, T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem*, 1994, 269, 37, 23177-23184.
119. Lee, J. S., Galvin, K. M. et Shi, Y. Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90, 13, 6145-6149.
120. 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*, 1999, 96, 18, 10051-10055.
121. Lee, J. S., Ngo, H., Kim, D. et Chung, J. H. Erythroid Kruppel-like factor is recruited to the CACCC box in the  $\beta$ -globin promoter but not to the CACCC box in the  $\gamma$ -globin promoter: the role of the neighboring promoter elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97, 6, 2468-2473.
122. Letovsky, J. and Dynan, W. S. Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single GC box recognition sequence. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17, 7, 2639-2653.
123. Letting D.L., Rakowski C., Weiss M. J. et Blobel G. A. Formation of a tissue-specific histone acetylation pattern by the hematopoietic transcription factor GATA-1. *Mol Cell Biol*, 2003, 23, 4, 1334-1340.
124. Liu, D., Chang, J. C., Moi, P., Liu, W., Kan, Y. W. et Curtin, P. T. Dissection of the enhancer activity of  $\beta$ -globin 5' DNase I-hypersensitive site 2 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89, 9, 3899-3903.
125. Ljungman M. Dial 9-1-1 for p53 : Mechanisms of p53 Activation by Cellular Stress. *Neoplasia*, 2000, 2, 208-225.
126. Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.Y., Allis, C.D., Marmorstein, R. et Berger, S.L. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell*. 2000, 5, 917-926.

127. Lowrey, C. H., Bodine, D. M. et Nienhuis, A. W. Mechanism of DNase I hypersensitive site formation within the human globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89, 3, 1143-1147.
128. Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. et Richmond, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997, 389, 251-260.
129. Mantovani, R., Malgaretti, N., Nicolis, S., Giglioni, B., Comi, P., Cappellini, N., Bertero, M. T., Caligaris-Cappio, F. et Ottolenghi, S. An erythroid specific nuclear factor binding to the proximal CACCC box of the  $\beta$ -globin gene promoter. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16, 10, 4299-4313.
130. Marks, P., Rifkind, R.A., Richon, V.M., Breslow, R., Miller, T. et Kelly, W.K. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature Rev Cancer*. 2001, 1, 194-202.
131. Matlashewski G. p53: Twenty Years on, Meeting Review. *Oncogene*. 1999, 18, 7618-7620.
132. May P. et May E. Twenty Years of p53 Research: Structural and Functional Aspects of the p53 Protein. *Oncogene*. 1999, 18, 7621-7636.
133. McMorrow T., van den Wijngaard A., Wollenschlaeger A., van de Corput M., Monkhorst K., Trimborn T., Fraser P., van Lohuizen M., Jenuwein T., Djabali M., Philippsen S., Grosveld F. et Milot E. Activation of the beta globin locus by transcription factors and chromatin modifiers. *EMBO J*. 2000, 19, 18, 4986-4996.
134. McNiece I. K., Langley K. E. et Zsebo K. M. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Exp. Hematol.*, 1991, 19, 226-231.
135. Meek D.W. Mechanisms of Switching on p53: a Role for Covalent Modification? *Oncogene*, 1999, 18, 7666-7675.
136. Merika, M. and Orkin, S. H. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell Biol*, 1995, 15, 5, 2437-2447.

137. Metz T., Harris A.W., et Adams J.M. Absence of P53 allows direct immortalization of hematopoietic cells by the *myc* and *raf* oncogenes. *Cell*, 1995, 82, 29-36.
138. Mignotte, V., Wall, L., deBoer, E., Grosveld, F. et Romeo, P. H. Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17, 1, 37-54.
139. Miller, I. J. and Bieker, J. J. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol*, 1993, 13, 5, 2776-2786.
140. Milot, E., Strouboulis, J., Trimborn, T., Wijgerde, M., de Boer, E., Langeveld, A., Tan-Un, K., Vergeer, W., Yannoutsos, N., Grosveld, F. et Fraser, P. Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell*, 1996, 87, 1, 105-114.
141. Moi, P. et Kan, Y. W. Synergistic enhancement of globin gene expression by activator protein-1-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87, 22, 9000-9004.
142. Moon, A. M. and Ley, T. J. Conservation of the primary structure, organization, and function of the human and mouse  $\beta$ -globin locus-activating regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87, 19, 7693-7697.
143. Moon, A. M. and Ley, T. J. Functional properties of the  $\beta$ -globin locus control region in K562 erythroleukemia cells. *Blood*, 1991, 77, 10, 2272-2284.
144. Myers, R. M., Tilly, K. et Maniatis, T. Fine structure genetic analysis of a  $\beta$ -globin promoter. *Science*, 1986, 232, 4750, 613-618.
145. Myers F.A., Evans D.R., Clayton A.L., Thorne A.W. et Crane-Robinson C. Targeted and extended acetylation of histones H4 and H3 at active and inactive genes in chicken embryo erythrocytes. *J Biol Chem*. 2001, 276, 23, 20197-20205.
146. Myers F.A., Chong W., Evans D.R., Thorne A.W. et Crane-Robinson C. Acetylation of histone H2B mirrors that of H4 and H3 at the chicken beta-globin locus but not at housekeeping genes. *J Biol Chem*. 2003, 278, 38, 36315-36322.
147. Navas, P. A., Peterson, K. R., Li, Q., Skarpidi, E., Rohde, A., Shaw, S. E., Clegg, C. H., Asano, H. et Stamatoyannopoulos, G. Developmental specificity of the

- interaction between the locus control region and embryonic or fetal globin genes in transgenic mice with an HS3 core deletion. *Mol Cell Biol*, 1998, 18, 7, 4188-4196.
148. Nemeth M.J., Bodine D.M., Garrett L.J. et Lowrey C.H. An erythroid-specific chromatin opening element reorganizes beta-globin promoter chromatin structure and augments gene expression. *Blood Cells Mol Dis*. 2001, 27, 4, 767-780.
149. Ney, P. A., Andrews, N. C., Jane, S. M., Safer, B., Purucker, M. E., Weremowicz, S., Morton, C. C., Goff, S. C., Orkin, S. H. et Nienhuis, A. W. Purification of the human NF-E2 complex: cDNA cloning of the hematopoietic cell-specific subunit and evidence for an associated partner. *Mol Cell Biol*, 1993, 13, 9, 5604-5612.
150. 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*, 1990.1, 18, 20, 6011-6017.
151. Ney, P. A., Sorrentino, B. P., McDonagh, K. T. et Nienhuis, A. W. Tandem AP-1-binding sites within the human  $\beta$ -globin dominant control region function as an inducible enhancer in erythroid cells. *Genes Dev*, 1990.2, 4, 6, 993-1006.
152. Nichols, K. E., Crispino, J. D., Poncz, M., White, J. G., Orkin, S. H., Maris, J. M. et Weiss, M. J. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet*, 2000, 24, 3, 266-270.
153. Nishinakamura R., Nakayama N., Hirabayashi Y., Inoue T., Aud D., McNeil T., Azuma S., Yoshida S., Toyoda Y. et Arai K. Mice deficient for the IL-3/GM-CSF/IL-5  $\beta$ c receptor exhibit lung pathology and impaired immune response, while  $\beta$  IL3 receptor-deficient mice are normal. *Immunity*, 1995, 2, 211-222.
154. Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R. et Grosveld, F. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature*, 1995, 375, 6529, 316-318.
155. O'Neill, D., Yang, J., Erdjument-Bromage, H., Bornschlegel, K., Tempst, P. et Bank, A. Tissue-specific and developmental stage-specific DNA binding by a mammalian SWI/SNF complex associated with human fetal-to-adult globin gene switching. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96, 2, 349-354.

156. Orkin, S. H., Sexton, J. P., Cheng, T. C., Goff, S. C., Giardina, P. J., Lee, J. I. et Kazazian, H. H. ATA box transcription mutation in  $\beta$ -thalassemia. *Nucleic Acids Res*, 1983, 11, 14, 4727-4734.
157. Pandolfi, P. P., Roth, M. E., Karis, A., Leonard, M. W., Dzierzak, E., Grosveld, F. G., Engel, J. D. et Lindenbaum, M. H. Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet*, 1995, 11, 1, 40-44.
158. Papadakis, M. N. et Patrinos, G. P. Contribution of gene conversion in the evolution of the human  $\beta$ -like globin gene family. *Hum Genet*, 1999, 104, 2, 117-125.
159. Partington, G. A. et Patient, R. K. Factor binding to the human  $\gamma$ -globin gene distal CCAAT site: candidates for repression of the normal gene or activation of HPFH mutants. *Br J Haematol*, 1998, 102, 4, 940-951.
160. Pasceri, P., Pannell, D., Wu, X. et Ellis, J. Full activity from human  $\beta$ -globin locus control region transgenes requires 5'HS1, distal  $\beta$ -globin promoter, and 3'  $\beta$ -globin sequences. *Blood*, 1998, 92, 2, 653-663.
161. Pawar, A. R., Colah, R. B. et Mohanty, D. A novel  $\beta^+$ -thalassemia mutation (codon 10 GCC $\rightarrow$ GCA) and a rare transcriptional mutation (-28A  $\rightarrow$ G) in Indians. *Blood*, 1997, 89, 10, 3888-3889.
162. Perkins A. Erythroid kruppel like factor: from fishing expedition to gourmet meal. *Int. J. of Bioch. & Cell Biol.* 1999, 31, 1175-1192.
163. Perkins, A. C., Gaensler, K. M. et Orkin, S. H. Silencing of human fetal globin expression is impaired in the absence of the adult  $\beta$ -globin gene activator protein EKLF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93, 22, 12267-12271.
164. Perkins, A. C., Peterson, K. R., Stamatoyannopoulos, G., Witkowska, H. E. et Orkin, S. H. Fetal expression of a human  $A\gamma$  globin transgene rescues globin chain imbalance but not hemolysis in EKLF null mouse embryos. *Blood*, 2000, 95, 5, 1827-1833.
165. Perkins, A. C., Sharpe, A. H. et Orkin, S. H. Lethal  $\beta$ -thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature*, 1995, 375, 6529, 318-322.



166. Peterson, K. R., Clegg, C. H., Navas, P. A., Norton, E. J., Kimbrough, T. G. et Stamatoyannopoulos, G. Effect of deletion of 5'HS3 or 5'HS2 of the human  $\beta$ -globin locus control region on the developmental regulation of globin gene expression in  $\beta$ -globin locus yeast artificial chromosome transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93, 13, 6605-6609.
167. Peterson, K. R., Navas, P. A. et Stamatoyannopoulos, G.  $\beta$ -YAC transgenic mice for studying LCR function. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 850, 28-37.
168. Pevny, L., Simon, M. C., Robertson, E., Klein, W. H., Tsai, S. F., D'Agati, V., Orkin, S. H. et Costantini, F. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*, 1991, 349, 6306, 257-260.
169. Philipsen, S., Pruzina, S. et Grosveld, F. The minimal requirements for activity in transgenic mice of hypersensitive site 3 of the  $\beta$  globin locus control region. *Embo J*, 1993, 12, 3, 1077-1085.
170. Philipsen, S., Talbot, D., Fraser, P. et Grosveld, F. The  $\beta$ -globin dominant control region: hypersensitive site 2. *Embo J*, 1990, 9, 7, 2159-2167.
171. Pogo, B.G., Allfrey, V.G. et Mirsky, A.E. The effect of phytohemagglutinin on ribonucleic acid synthesis and histone acetylation in equine leukocytes. *J Cell Biol.* 1967, 35, 477-482.
172. Pomerantz, O., Goodwin, A. J., Joyce, T. et Lowrey, C. H. Conserved elements containing NF-E2 and tandem GATA binding sites are required for erythroid-specific chromatin structure reorganization within the human  $\beta$ -globin locus control region. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26, 24, 5684-5691.
173. Pruzina, S., Hanscombe, O., Whyatt, D., Grosveld, F. et Philipsen, S. Hypersensitive site 4 of the human  $\beta$  globin locus control region. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19, 7, 1413-1419.
174. Raich, N., Clegg, C. H., Grofti, J., Romeo, P. H. et Stamatoyannopoulos, G. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human  $\alpha$  globin gene. *Embo J*, 1995, 14, 4, 801-809.

175. Rapp U.R., Cleveland J.L., Fredrickson T.N., Holmes K.L., Morse III H.C., Jansen H.W., Patschinsky T. et Bister K. Rapid induction of hemopoietic neoplasms in newborn mice by a *raf(mil)/myc* recombinant murine retrovirus. *J. Virol.*, 1985, 23-33.
176. Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. et Jenuwein, T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. 2000, 406, 593-599.
177. Reddy, P. M. et Shen, C. K. Protein-DNA interactions in vivo of an erythroid-specific, human  $\beta$ -globin locus enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88, 19, 8676-8680.
178. Reeves, R. Transcriptionally active chromatin. *Biochim Biophys Acta*. 1984, 782, 343-393.
179. Rekhtman N., Radparvar F., Evans T. et Skoultchi A.I. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev*. 1999, 13, 11, 1398-1411.
180. Roth, S.Y., Denu, J.M. et Allis, C.D. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*. 2001, 70, 81-120.
181. Rubin E. et Fraber J.L. Neoplasia: in: E. Rubin, J.L. Farber, editors. *Pathology*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company. 1994, p.182-183.
182. Rubin, J. E., Pasceri, P., Wu, X., Leboulch, P. et Ellis, J. Locus control region activity by 5'HS3 requires a functional interaction with  $\beta$ -globin gene regulatory elements: expression of novel  $\beta/\gamma$  globin hybrid transgenes. *Blood*, 2000, 95, 10, 3242-3249.
183. Russell, J. E. et Liebhaber, S. A. The stability of human  $\beta$ -globin mRNA is dependent on structural determinants positioned within its 3' untranslated region. *Blood*, 1996, 87, 12, 5314-5323.
184. Sawado T., Igarashi K. et Groudine M. Activation of beta-major globin gene transcription is associated with recruitment of NF-E2 to the beta-globin LCR and gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98, 18, 10226-10231.

185. Sawado T., Halow J., Bender MA. et Groudine M. The beta -globin locus control region (LCR) functions primarily by enhancing the transition from transcription initiation to elongation. *Genes Dev.* 2003, 17, 8, 1009-1018.
186. Schubeler et al. Nuclear localisation and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human  $\beta$ -globin locus. *Genes & Dev.* 2000, 14, 940-950.
187. Schubeler, 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.* 2000, 14, 8, 940-950.
188. Seshasayee, D., Geiger, J. N., Gaines, P. et Wojchowski, D. M. Intron 1 elements promote erythroid-specific GATA-1 gene expression. *J Biol Chem.* 2000, 275, 30, 22969-22977.
189. Shelton, D. A., Stegman, L., Hardison, R., Miller, W., Bock, J. H., Slightom, J. L., Goodman, M. et Gumucio, D. L. Phylogenetic footprinting of hypersensitive site 3 of the  $\beta$ -globin locus control region. *Blood.* 1997, 89, 9, 3457-3469.
190. Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A. and Wu, C. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature.* 2000, 406, 541-544.
191. Shivdasani, R. A. et Orkin, S. H. Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995, 92, 19, 8690-8694.
192. Smith, J.S. et Boeke, J.D. An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev.* 1997, 11, 241-254.
193. Smith, J.S., Brachmann, C.B., Celic, I., Kenna, M.A., Muhammad, S., Starai, V.J., Avalos, J.L., Escalante-Semerena, J.C., Grubmeyer, C., Wolberger, C. et Boeke, J.D. A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 97, 6658-6663.
194. Sorrentino, B., Ney, P., Bodine, D. et Nienhuis, A. W. A 46 base pair enhancer sequence within the locus activating region is required for induced expression of the

- $\gamma$  globin gene during erythroid differentiation. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18, 9, 2721-2731.
195. Soutoglou E. et Talianidis I. Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science*. 2002, 295, 5561, 1901-1904.
196. Stamatoyannopoulos, J. A., Goodwin, A., Joyce, T. et Lowrey, C. H. NF-E2 and GATA binding motifs are required for the formation of DNase I hypersensitive site 4 of the human  $\beta$ -globin locus control region. *Embo J*, 1995, 14, 1, 106-116.
197. Sterner, D.E. et Berger, S.L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000, 64, 435-459.
198. Strahl, B.D. et Allis, C.D. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000, 403, 41-45.
199. 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*. 1999, 96, 14967-14972.
200. Sudarsanam, P., Iyer, V.R., Brown, P.O. et Winston, F. Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97, 3364-3369.
201. Surrey, S., Delgrosso, K., Malladi, P. et Schwartz, E. Functional analysis of a  $\beta$ -globin gene containing a TATA box mutation from a Kurdish Jew with  $\beta$  thalassemia. *J Biol Chem*, 1985, 260, 11, 6507-6510.
202. Suzuki M., Yamada T., Kihara-Negishi F., Sakurai T. et Oikawa T. Direct association between PU.1 and MeCP2 that recruits mSin3A-HDAC complex for PU.1-mediated transcriptional repression. *Oncogene*. 2003, 22, 54, 8688-8698.
203. Takihara, Y., Nakamura, T., Yamada, H., Takagi, Y. et Fukumaki, Y. A novel mutation in the TATA box in a Japanese patient with  $\beta^+$ -thalassemia. *Blood*, 1986, 67, 2, 547-550.

204. Talbot, D. and Grosveld, F. The 5'HS2 of the globin locus control region enhances transcription through the interaction of a multimeric complex binding at two functionally distinct NF-E2 binding sites. *Embo J*, 1991, 10, 6, 1391-1398.
205. Talbot, D., Collis, P., Antoniou, M., Vidal, M., Grosveld, F. et Greaves, D. R. A dominant control region from the human  $\beta$ -globin locus conferring integration site-independent gene expression. *Nature*, 1989, 338, 6213, 352-355.
206. Talbot, D., Philipsen, S., Fraser, P. et Grosveld, F. Detailed analysis of the site 3 region of the human  $\beta$ -globin dominant control region. *Embo J*, 1990, 9, 7, 2169-2177.
207. Tamir A., Petrocelli T., Stetler K., Chu W., Howard J., Croix B.S., Slingerland J. et Ben-David Y. Stem cell factor inhibits erythroid differentiation by modulating the activity of G1-cyclin-dependent kinase complexes: a role for p27 in erythroid differentiation coupled G1 arrest *Cell Growth Differ.*, 2000, 11, 5, 269-77.
208. Tanimoto, K., Liu, Q., Bungert, J. et Engel, J. D. The polyoma virus enhancer cannot substitute for DNase I core hypersensitive sites 2-4 in the human  $\beta$ -globin LCR. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27, 15, 3130-3137.
209. Taunton, J., Hassig, C.A. et Schreiber, S.L. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*. 1996, 272, 408-411.
210. Tewari, R., Gillemans, N., Wijgerde, M., Nuez, B., von Lindern, M., Grosveld, F. et 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*, 1998, 17, 8, 2334-2341.
211. Théoleyre O., Deguillien M., Moriniere M., Starck J., Moreau-Gachelin F., Morle F. et Baklouti F. Spi-1/PU.1 but not Fli-1 inhibits erythroid-specific alternative splicing of 4.1R pre-mRNA in murine erythroleukemia cells. *Oncogene*. 2004, 23, 4, 920-927.
212. Ting, C. N., Olson, M. C., Barton, K. P. et Leiden, J. M. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature*, 1996, 384, 6608, 474-478.

213. Tsai, F. Y. et Orkin, S. H. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*, 1997, 89, 10, 3636-3643.
214. Tsai, S. F., Martin, D. I., Zon, L. I., D'Andrea, A. D., Wong, G. G. et Orkin, S. H. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*, 1989, 339, 6224, 446-451.
215. Tsai, S. F., Strauss, E. et Orkin, S. H. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev*, 1991, 5, 6, 919-931.
216. Tsang, A. P., Fujiwara, Y., Hom, D. B. et Orkin, S. H. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev*, 1998, 12, 8, 1176-1188.
217. Tsang, A. P., Visvader, J. E., Turner, C. A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M. J., Crossley, M. et Orkin, S. H. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, 1997, 90, 1, 109-119.
218. Tuan, D. Y., Solomon, W. B., London, I. M. et Lee, D. P. An erythroid-specific, developmental-stage-independent enhancer far upstream of the human  $\beta$ -like globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86, 8, 2554-2558.
219. Tuan, D., Solomon, W., Li, Q. et London, I. M. The  $\beta$ -like-globin gene domain in human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82, 19, 6384-6388.
220. Van Hooser, A., Goodrich, D.W., Allis, C.D., Brinkley, B.R. et Mancini, M.A. Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci*. 1998, 111, 3497-3506.
221. Vidal, M. et Gaber, R.F. RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1991, 11, 6317-6327.
222. Vogelauer, M., Wu, J., Suka, N. and Grunstein, M. Global histone acetylation et deacetylation in yeast. *Nature*. 2000, 408, 495-498.

223. Wadman, I. A., Osada, H., Grutz, G. G., Agulnick, A. D., Westphal, H., Forster, A. et Rabbitts, T. H. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *Embo J*, 1997, 16, 11, 3145-3157.
224. Wai A.W., Gillemans N., Raguz-Bolognesi S., Pruzina S., Zafarana G., Meijer D., Philipsen S. et Grosveld F. HS5 of the human beta-globin locus control region: a developmental stage-specific border in erythroid cells. *EMBO J*. 2003, 22, 17, 4489-4500.
225. Wall, L., Destroismaisons, N., Delvoye, N. et Guy, L. G. CAAT/enhancer-binding proteins are involved in  $\beta$ -globin gene expression and are differentially expressed in murine erythroleukemia and K562 cells. *J Biol Chem*, 1996, 271, 28, 16477-16484.
226. Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A. et Allis, C.D. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*. 1999, 97, 99-109.
227. Weiss, M. J., Yu, C. et Orkin, S. H. Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol*, 1997, 17, 3, 1642-1651.
228. Wijgerde, M., Gribnau, J., Trimborn, T., Nuez, B., Philipsen, S., Grosveld, F. et Fraser, P. The role of EKLF in human  $\beta$  globin gene competition. *Genes Dev*, 1996, 10, 22, 2894-2902.
229. Wijgerde, M., Grosveld, F. et Fraser, P. Transcription complex stability and chromatin dynamics *in vivo*. *Nature*, 1995, 377, 209-213.
230. Winston, F. et Carlson, M. Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet*. 1992, 8, 387-391.
231. Xue L., Chen X., Chang Y. et Bieker J. Regulatory elements oh the EKLF gene that direct erythroid cell-specific expression during mammalian development. *Blood*, 2004-Feb-05.
232. Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Cote, J. and Wang, W. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell*, 1998, 2, 851-861.

233. Yamamoto, M., Ko, L. J., Leonard, M. W., Beug, H., Orkin, S. H. et Engel, J. D. Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev*, 1990, 4, 10, 1650-1662.
234. Yang, H. Y. and Evans, T. Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. *Mol Cell Biol*, 1992, 12, 10, 4562-4570.
235. Yu, C. Y., Motamed, K., Chen, J., Bailey, A. D. et Shen, C. K. The CACC box upstream of human embryonic  $\alpha$  globin gene binds Sp1 and is a functional promoter element in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 1991, 266, 14, 8907-8915.
236. Zafarana, G., Rottier, R., Grosveld, F. et Philipsen, S. Erythroid overexpression of C/EBP $\gamma$  in transgenic mice affects  $\gamma$  globin expression and fetal liver erythropoiesis. *Embo J*, 2000, 19, 21, 5856-5863.
237. Zhang P., Behre G., Pan J., Iwama A., Wara-Aswapati N., Radomska H.S., Auron P.E., Tenen D.G. et Sun Z. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96, 15, 8705-8710.
238. Zhang W., Kadam S., Emerson B., et Bieker J. Site-specific acetylation by p300 or CREB binding protein regulates erythroid kruppel like factor transcriptional activity via its interaction with SWI/SNF complex. *Mol.Cell.Biol*. 2001,21, 7, 2413-2422.
239. Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H.P., Lane, W.S. and Reinberg, D. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell*, 1998, 95, 279-289.
240. Zon, L. I., Tsai, S. F., Burgess, S., Matsudaira, P., Bruns, G. A. et Orkin, S. H. The major human erythroid DNA-binding protein (GF-1): primary sequence and localization of the gene to the X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87, 2, 668-672.



