

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

**Caractérisation du rôle de la protéine homéotique BP1,  
dans la régulation des gènes adultes de  $\beta$  globine**

par

Marthe Sandrine Eiyimo Mwa Mpollo

Programme de Biologie Moléculaire  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (Msc.)  
en Biologie Moléculaire

Août, 2007

© Eiyimo Mwa Mpollo, 2007



Université de Montréal

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation du rôle de la protéine homéotique BP1 dans la régulation des gènes adultes  
de  $\beta$  globine

présenté par :

Marthe-Sandrine Eiymo Mwa Mpollo

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Eric Rassart, président-rapporteur

Marie Trudel, directrice de recherche

Denis Cournoyer, membre du jury

## Résumé

La protéine homéotique BP1 (Beta protein1), un facteur transcriptionnel humain, est abondamment exprimée dans l'érythropoïèse fœtale, puis régulée à la baisse au stade adulte. En utilisant deux modèles d'expression exogène de BP1 au stade adulte, soit les cellules ES murines et les souris transgéniques, nous avons caractérisé son rôle dans la régulation des gènes de  $\beta$  globine adulte et lors de l'érythropoïèse murine. L'analyse de l'érythropoïèse à partir de clones distincts révèle que BP1 antagonise l'érythropoïèse définitive et diminue spécifiquement l'expression du gène murin de  $\beta$  globine adulte. *In vivo*, la surexpression de BP1 entraîne la mort embryonnaire des fœtus à E16.5, au cours de l'érythropoïèse adulte définitive. L'anémie évidente de ces fœtus et le phénotype de type thalassémique présent chez l'unique souris adulte obtenue suggère une diminution de  $\beta$  globine en présence de BP1. L'expression modérée de BP1 dans les cellules érythroïdes permet la survie des souris adultes. Des cinq lignées de souris transgéniques  $\beta$ BP1 $\beta$  analysées, seules deux présentaient une diminution significative du gène la  $\beta$  globine adulte. Chez les souris doubles transgéniques, exprimant simultanément BP1 et le locus entier des gènes de  $\beta$  globine humaine, la  $\beta$  globine adulte est également réprimée dans ces lignées  $\beta$ BP1 $\beta$ . Au niveau cellulaire la baisse de la  $\beta$  globine adulte, se traduit par une augmentation de précipités des chaînes  $\alpha$  dans les globules rouges des doubles et simples transgéniques, et ainsi qu'une perte des précurseurs érythroïdes tardifs lors de la maturation érythroïde. Cet effet antagoniste de BP1 sur la maturation est aussi visible dans le sang périphérique où on observe davantage de cellules érythroïdes immatures. Ces observations sont consistantes avec une baisse transcriptionnelle et protéique de la  $\beta$  globine adulte. Parallèlement à cette étude nous avons identifié dans des tissus érythroïdes sauvages un homologue murin (~32kDa) de la protéine humaine BP1. Par ailleurs, l'identification de cette protéine murine BP1 nous a mené à caractériser un BAC (Chromosome artificiel de bactérie) contenant le gène murin BP1. Notre étude a montré que BP1 régule négativement la  $\beta$  globine adulte *in vivo*.

**Mots-clés :** BP1, érythropoïèse,  $\beta$ -globine,  $\beta$ -thalassémie, gène homéotique

## Abstract

The human homeotic protein, BP1 (Beta protein 1), is highly expressed during fetal erythropoiesis, and then down regulated in adult stage. Using two experimental models expressing BP1, in both murine ES cells and adult transgenic mice, we characterized the role of BP1 protein on adult  $\beta$  globin regulation and in murine erythropoiesis. Erythropoietic analyses from different ES clones showed that BP1 expression impairs definitive erythropoiesis and represses specifically  $\beta$  globin transcription in definitive and murine erythropoiesis. *In vivo* BP1 overexpression is lethal at E16.5 embryonic day, during adult definitive erythropoiesis. The apparent anemia in fetuses and the  $\beta$ -thalassemia like phenotype observed from the only adult transgenic BP1 mouse we obtained, suggest a down regulation of  $\beta$  globin when BP1 is expressed. Mild expression of BP1 allowed targeting BP1 mice survival at adult stage. From 5  $\beta$ BP1 $\beta$  transgenic lines analyzed, only two have shown significant reduction of murine adult  $\beta$  globin gene transcription. Reciprocally, double transgenic mice carrying BP1 and the whole locus of human  $\beta$  globin genes, showed also adult human  $\beta$  globin gene repression. At cellular level, reduction of adult  $\beta$  globin induced an increase in  $\alpha$  globin chains precipitates in simple and double transgenic mice red blood cells, in addition to a loss of erythroid late precursors during erythroid maturation. This altered maturation is also observed in peripheral blood by an increase of erythroid immature cells. These observations are consistent with a reduction of adult  $\beta$  globin gene expression. Parallel to this study, we have identified in erythroid tissues of wild type mice, a murine homolog (~32kDa) of human BP1 protein. Identification of this murine protein led us to characterize a BP1 BAC (Bacterial artificial chromosome), containing murine BP1 gene. Our study showed that BP1 can negatively regulate adult  $\beta$  globin gene *in vivo*.

**Keywords :** BP1 (beta protein 1),  $\beta$ -globin,  $\beta$ -thalassemia, homeotic gene.

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Liste des abréviations.....	x
Chapitre I .....	14
Le système hématopoïétique.....	14
1.1. Ontogénie.....	14
1.1.1. Hématopoïèse primitive.....	14
1.1.2. Hématopoïèse définitive .....	15
1.1.3. Hémangioblaste : progéniteur de la cellule souche hématopoïétique.....	19
1. 2. Le système de différenciation hématopoïétique <i>in vitro</i> .....	21
1.3. Les cellules hématopoïétiques .....	22
1.3.1 Les progéniteurs.....	23
1.3.2. Les cellules matures.....	25
Le locus de la $\beta$ globine .....	27
2.1 Le Locus de la $\beta$ globine.....	27
2.1.1 Arrangement et expression des gènes du locus humain .....	27
2.1.2 Arrangement et expression du locus murin de la $\beta$ globine.....	30
2.1.3 Étude en transgène du locus de la $\beta$ globine humaine.....	32
2.2. La commutation de l'hémoglobine .....	33
2.3. Les hémoglobinopathies du locus de la $\beta$ -globine.....	34
2.3.1. La $\beta$ thalassémie .....	34
2.3.2. L'anémie falciforme .....	37
2.4 Régulation du locus de la $\beta$ globine.....	38
2.4.1 Le LCR .....	38
2.4.2 Éléments régulateurs des gènes du locus de la $\beta$ globine .....	42
2.5 BP1.....	57
2.5.1 Organisation et structure .....	57

2.5.2 Expression et fonction .....	59
2.5.3 BP1 et les protéines HMG .....	62
2.5.4 Régulation des gènes <i>Dlx</i> .....	63
Objectif .....	64
Chapitre II .....	66
Article .....	66
BP1 IS A NEGATIVE MODULATOR OF DEFINITIVE ERYTHROPOIESIS .....	66
Abstract.....	67
Introduction.....	68
Materials and Methods.....	69
Results and Discussion .....	72
References:.....	82
Chapitre III.....	85
Discussion.....	85
5.1 Rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse définitive <i>in vitro</i> .....	85
5.2. Rôle de BP1 dans l'érythropoïèse murine <i>in vivo</i> .....	89
5.2.1. Surexpression de BP1 humain chez la souris LCR $\beta$ BP1 $\beta$ .....	89
5.2.2. Expression de BP1 au stade adulte et régulation des gènes de $\beta$ globine chez les souris $\beta$ BP1 $\beta$ .....	91
5.2.3 BP1 et la commutation de l'expression des $\beta$ globines fœtales – adultes .....	95
5.2.4 Potentiels cibles érythroïdes de BP1.....	98
5.3 Modèle intégré de répression de la $\beta$ globine adulte par BP1 .....	99
5.4 Expression de BP1 et homéostasie de l'érythropoïèse définitive .....	102
5.5 Importance clinique de BP1 .....	103
5.6 Profil d'expression de BP1 et autres rôles dans l'hématopoïèse .....	105
5.7 Évidence de l'existence d'une protéine murine BP1 .....	105
5.8 Le BAC du gène BP1 murin.....	107
Conclusions et perspectives .....	107

Bibliographie .....	110
Annexes .....	I
Annexe 1 .....	II
Annexe 2 .....	III
Annexe 3 .....	IV
Annexe 4 .....	V
Annexe 5 .....	VI
Annexe 6 .....	VII
Annexe 7 .....	VIII
Annexe 8 .....	IX
Annexe 9 .....	X
Annexe 10 .....	XI
Annexe 11 .....	XII
Annexe 12 .....	XIII
Annexe 13 .....	XIV
Annexe 14 .....	XV



## Liste des tableaux

Tableau I: Nomenclature des gènes Dlx et gènes Hox associés.....	58
--	----

## Liste des figures

Figure 1: Résumé des expériences de transplantations qui ont permis de déterminer le premier site d'initiation de l'hématopoïèse définitive chez l'embryon. ....	17
Figure 2: Sites de l'hématopoïèse au cours du développement. ....	19
Figure 3: Différenciation hématopoïétique des cellules ES murines <i>in vitro</i> . ....	22
Figure 4: Représentation simplifiée des cellules du système hématopoïétique. ....	26
Figure 5: Structure des gènes des loci humains d' $\alpha$ et $\beta$ globine et expression des gènes de $\beta$ globine au cours du développement. ....	29
Figure 6: Organisation et expression développementale des gènes du locus de $\beta$ globine de souris. ....	31
Figure 7: Représentation schématique des facteurs transcriptionnels du promoteur du gène adulte de $\beta$ globine. ....	57
Figure 8: Organisation des loci des gènes DLX 3/4 et Hoxb humains et représentation des transcrits du gène humain DLX4. ....	60
Figure 9: Modèle intégré de régulation du gène de $\beta$ globine par BP1. ....	100

## Liste des abréviations

- ADNc : ADN complémentaire
- AGM : Aorte-gonado-mésonephros
- ARNm : ARN messenger
- BAC : Chromosome artificiel bactérien
- BFU-e : Unité formant de grosses colonies érythroïdes
- BL-CFC : Cellule formant une colonie blastique
- BP1 : Bêta-protéine 1
- BSA : Sérum
- CD 71 : Récepteur de la transferrine
- CFU-e : Unité formant une colonie érythroïde
- CFU-S : Unité formant une colonie dans la rate
- CO<sub>2</sub>: Dioxyde de carbone
- EBs: corps embryonnaires
- E<sup>d</sup>: colonie érythroïde définitive
- E<sup>p</sup>: colonie érythroïde primitive
- ES : Cellules souches embryonnaires
- FACS: cytométrie de flux
- HbA: Hémoglobine adulte
- HbF: Hémoglobine foetale
- HSC: cellules souche hématopoïétique
- H<sub>2</sub>O: eau
- Kb : kilobase
- kDa : kilodalton
- LCR: Region de contrôle du locus
- LT-HSC: Cellule souche hématopoïétique de longue durée
- MeC: Methyl cellulose

O<sub>2</sub> : oxygène

<sup>32</sup> P : phosphate radioactif

Pb : paire de bases

PE; phycoérythrine

SDS: Sodium dodecyl sulfate

ST-HSC: Cellules souche hématopoïétique de courte durée

VEGF-R2 : Récepteur vasculo endothélial au facteur de croissance de type 2

UT : Urée triton

YAC : chromosome artificiel de levure

*À mes parents et à mon copain qui m'ont  
toujours soutenu tout au long de cette  
aventure*

## **Remerciements**

Je remercie mon directeur de recherche, Dr Trudel de m'avoir donné l'opportunité de mener à terme ce travail dans son laboratoire. Je la remercie également pour l'encadrement durant le projet, qui a grandement contribué à l'édification de ma pensée scientifique.

Je me dois aussi de remercier notre collaboratrice, le Dr Patricia Berg, pour tout le matériel fourni et les conseils précieux.

Je remercie le programme de Biologie Moléculaire de m'avoir fait confiance en m'octroyant un support financier tout au long de mon cheminement. Je tiens à remercier particulièrement les membres du laboratoire pour leur aide et leur amitié.

# **Introduction**

## **Chapitre I**

### **Le système hématopoïétique**

#### **1.1. Ontogénie**

L'hématopoïèse est un processus tissu spécifique qui mène à la formation de cellules sanguines. Au cours du développement, l'hématopoïèse se déroule à différents sites anatomiques. Chez les vertébrés durant l'embryogenèse, l'hématopoïèse apparaît très tôt après la gastrulation au jour embryonnaire E7.5 au niveau des îlots sanguins de la région extra embryonnaire du mésoderme appelée sac vitellin (Haar and Ackerman, 1971) (Metcalf et al., 1967). Vers E12.5 l'hématopoïèse migre du sac vitellin au foie fœtal, site prédominant de l'hématopoïèse lors de la vie fœtale, pour finalement s'établir peu avant la naissance dans la moelle osseuse chez l'adulte.

##### **1.1.1. Hématopoïèse primitive**

L'initiation séquentielle de l'hématopoïèse à différents sites anatomiques chez les mammifères a été longtemps d'intérêt. En 1967, Moore et Owen ont émis l'hypothèse que l'émergence séquentielle des organes hématopoïétiques au cours du développement nécessitait un apport du sac vitellin, via la circulation sanguine, de cellules mères ayant la capacité de générer toutes les lignées hématopoïétiques. Cette cellule souche a été appelée HSC pour cellule souche hématopoïétique. En 1970, Moore et Metcalf ont démontré la présence des premières cellules hématopoïétiques dans le sac vitellin à E7, E8, E8.5 et E11. Ces cellules constitueront le système hématopoïétique primitif. Plus tard l'échec des tentatives de régénération du système hématopoïétique à partir de foie fœtal d'E9.5 confirmera davantage l'origine vitelline des premières cellules hématopoïétiques. Ainsi, le

sac vitellin est important pour le développement de l'hématopoïèse hépatique (Johnson and Moore, 1975). De plus, chez la souris, lorsque transplantées chez le nouveau-né, les cellules hématopoïétiques du sac vitellin des jours embryonnaires E9 et E10 sont capables de repopulation à long terme du système hématopoïétique de l'animal (Yoder and Hiatt, 1997; Yoder et al., 1997). Dès lors, il était acquis que les HSC du sac vitellin étaient à l'origine du système hématopoïétique. Les cellules du système hématopoïétique primitif, principalement myéloïdes, possèdent des caractéristiques qui leurs sont propres (Moore and Owen, 1967; Sasaki et al., 1986). Contrairement aux cellules hématopoïétiques adultes, les érythrocytes primitifs sont nucléés, les macrophages ont une différenciation écourtée et synthétisent des enzymes différents, tandis que les mégakaryocytes eux présentent une production accélérée de plaquettes. Ces différences permettent à l'embryon d'assurer rapidement ses besoins, notamment l'approvisionnement en oxygène, la clairance des cellules mortes et la protection contre d'éventuelles infections.

Toutefois l'incapacité des cellules du sac vitellin d'E10 et E11 à repopuler, suite à une transplantation, le système hématopoïétique d'une souris adulte dont l'hématopoïèse endogène est déficiente (Medvinsky and Dzierzak, 1996), a remis en question l'origine vitelline des cellules souches hématopoïétiques du foie fœtal. Ces cellules qui plus tard prennent part à l'établissement du système hématopoïétique définitif dans la moelle osseuse chez l'adulte.

### **1.1.2. Hématopoïèse définitive**

L'hématopoïèse primitive est suivie de la définitive, qui par opposition à la primitive restreinte au sac vitellin, représente toutes les étapes de différenciation hématopoïétique qui prennent place à l'extérieur du sac vitellin.



Jusqu'à récemment, le modèle classique de l'hématopoïèse se décrivait comme suit : la cellule HSC initiée dans le sac vitellin, coloniserait vers E12.5 le foie fœtal, et subséquentement après la naissance migrerait dans la moelle osseuse. Parallèlement à ce modèle, plusieurs évidences supportent l'existence d'un site *de novo* de l'hématopoïèse dans l'embryon précédent la colonisation du foie fœtal, soit la région de l'aorte-gonadomésonephros (AGM) (Medvinsky and Dzierzak, 1996; Medvinsky et al., 1993; Sanchez et al., 1996). Des expériences de transplantation démontrent qu'à E10.5 les cellules de l'AGM sont capables de reconstituer à long terme le système hématopoïétique de souris adulte receveurs hématologiquement déficientes. Contrairement aux cellules de l'AGM, à E10.5 ni les cellules vitellines, ni les cellules du foie fœtal ne présentent un tel potentiel de repopulation hématopoïétique du système adulte définitif. Ce potentiel de repopulation n'est détectable chez les souris adultes hématologiquement déficientes qu'après transplantation de cellules du sac vitellin d'E11 (figure 1). Ce qui suggère que les cellules HSC adultes à l'origine de l'hématopoïèse adulte définitive dérivent en premier de l'AGM plutôt que du sac vitellin.

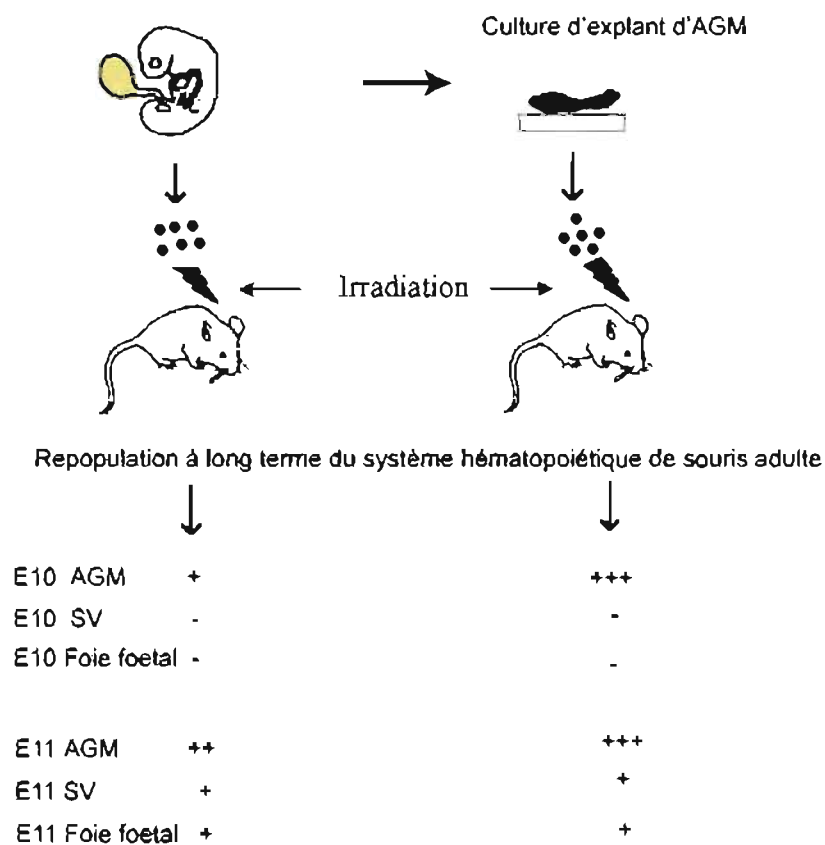


Figure 1: Résumé des expériences de transplantations qui ont permis de déterminer le premier site d'initiation de l'hématopoïèse définitive chez l'embryon.

Légende : Les cellules hématopoïétiques sont soit isolées et cultivées avant transplantation, soit prélevées directement de tissus hématopoïétiques embryonnaires et transplantées chez une souris adulte préalablement irradiée. Les souris receveurs sont examinées 4 mois après la transplantation pour la présence de cellules hématopoïétiques provenant du donneur. Les signes + et - indiquent respectivement la capacité des différents tissus hématopoïétiques de l'embryon, à repopuler le système hématopoïétique d'une souris adulte receveur hématopoïétique déficiente. AGM : aorte-gonade-mésonephros; SV : sac vitellin.

Par ailleurs plusieurs autres observations ont davantage renforcé la contribution du site intra embryonnaire à la génération des cellules hématopoïétiques définitives qui contribueront à l'hématopoïèse définitive chez le fœtus et l'adulte (Durand and Dzierzak, 2005). Entre autre, on relève l'abondance à E9 de précurseurs myéloïdes tardifs (CFU) dans l'AGM comparativement au sac vitellin (Godin et al., 1995; Medvinsky and Dzierzak, 1996; Medvinsky et al., 1993). De plus, chez la souris des expériences de différenciation hématopoïétiques *in vitro* ont révélé qu'il y a 100 à 500 fois plus de précurseurs lymphoïdes à E8.5 dans la région paraaortic splanchnopleura (PAS), de laquelle dérive l'AGM, que dans le sac vitellin (Godin et al., 1995; Medvinsky and Dzierzak, 1996). Pendant longtemps on a supposé que les cellules hématopoïétiques étaient amenées du sac vitellin à l'AGM via la circulation sanguine. Ces cellules d'origine vitelline, éduquées par l'AGM seraient réacheminés dans le sac vitellin avant d'être redistribuées au foie fœtal (Matsuoka et al., 2001). La culture d'organes hématopoïétiques *in vitro* a grandement contribué à faire la lumière sur cette séquence d'évènements. En effet, le fait que toutes les expériences précédentes aient été effectuées à des stades où la circulation sanguine était établie entre le sac vitellin et l'embryon, ne permettait pas de discriminer de laquelle des structures provenaient les premières HSC définitives. La culture d'explants de foie fœtal, de sac vitellin et d'AGM avant l'établissement de la circulation sanguine chez l'embryon et leur transplantation a donc permis de déterminer que seul l'AGM à E8.0 possède la capacité de reconstituer le système hématopoïétique définitif chez l'adulte. Ces organes prélevés avant l'établissement de la circulation sanguine entre le sac vitellin et l'embryon ont permis de discriminer de laquelle des deux structures, du sac vitellin ou de l'AGM proviennent les premières HSC définitives (Medvinsky and Dzierzak, 1996) (Muller et al., 1994). En outre la présence à E11 dans l'AGM de cellules hématopoïétiques présentant plus de marqueurs cellulaires de cellules hématopoïétiques du foie fœtal et de la moelle osseuse que ceux des cellules primitives de l'hématopoïèse embryonnaire, supporte davantage le rôle de l'AGM dans l'établissement de l'hématopoïèse définitive. Toutes ces études illustrent fortement le fait que l'initiation et l'expansion des premières cellules

adultes hématopoïétiques prennent place en premier dans la région de l'AGM (Durand and Dzierzak, 2005). Toutefois les données actuelles n'excluent pas une contribution du sac vitellin à l'hématopoïèse définitive, il semble que le sac vitellin puisse initier l'établissement de cellules HSC définitives de manière indépendante (Tavian et al., 2001)(figure 2).

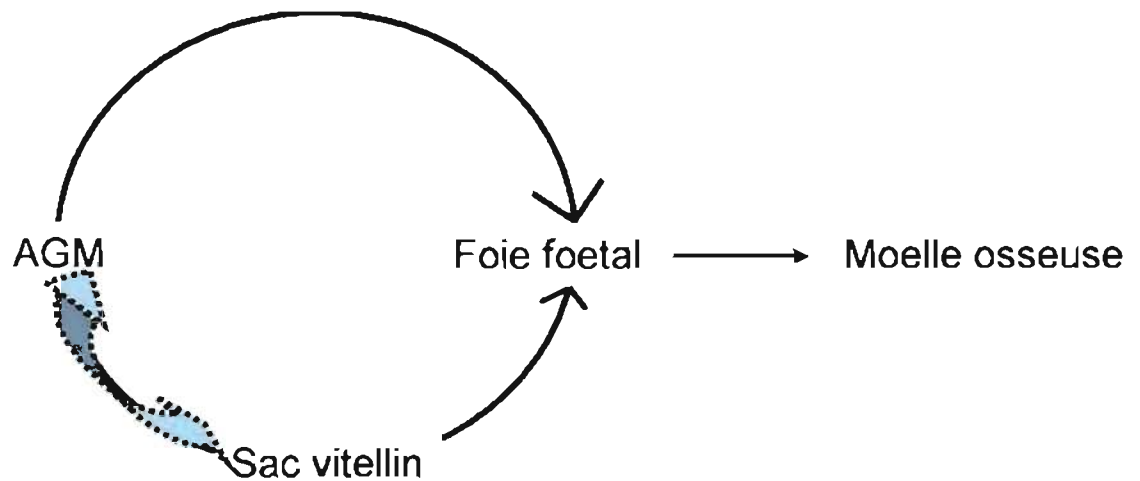


Figure 2: Sites de l'hématopoïèse au cours du développement.

Légende : Les traits pleins correspondent au modèle établi, tandis que la flèche en pointillée représente une situation hypothétique.

### 1.1.3. Hémangioblaste : progéniteur de la cellule souche hématopoïétique

La cellule souche hématopoïétique (HSC) est à la base du système hématopoïétique, elle génère toutes les lignées myéloïdes et lymphoïdes du système. Toutefois un mystère demeure sur l'origine de celle-ci, soit le précurseur direct de la cellule souche hématopoïétique. La proximité spatiale et la morphologie quasi-similaire des précurseurs des lignées endothéliales et hématopoïétiques au cours du développement a permis de postuler que ces deux lignées ont un progéniteur commun : l'hémangioblaste (Sabin, 1920;

Murray, 1932; Wagner, 1980). Un grand nombre de données supportant une origine vasculo-endothéliale de la HSC, suggèrent que l'hémangioblaste peut se différencier et donner naissance à ces deux lignées cellulaires : endothéliale et hématopoïétique. Au chapitre de celles-ci on compte la présence de marqueurs de surface communs entre les deux types cellulaires (Yoder et al., 1997). C'est ainsi que les cellules HSC  $c\text{-kit}^+$   $\text{CD34}^+$  du sac vitellin, connues pour leur capacité à reconstituer le système hématopoïétique des nouveau-nés hématodéficients, possèdent également des marqueurs de l'endothélium tels que VE-cadherin et  $\text{CD31}^+$ . Des essais *in vitro* de différenciation de cellules endothéliales ont révélé qu'elles pouvaient générer aussi bien des vaisseaux que des cellules hématopoïétiques. Des essais de transplantations des vaisseaux ombilicaux ont démontré la présence de LT-HSC (cellules hématopoïétiques capables de reconstituer le système à long terme *in vitro*). En outre, des cellules de l'endothélium, lorsque prélevées avant l'établissement de la circulation sanguine, génèrent des colonies de cellules hématopoïétiques après différenciation *in vitro*. Bien que l'existence de l'hémangioblaste soit surtout associée à l'hématopoïèse embryonnaire-fœtale, de nombreuses évidences soutiennent la présence d'hémangioblaste dans le tissu hématopoïétique adulte (Bailey and Fleming, 2003; Choi et al., 1998). Chez l'humain, les cellules purifiées de moelle osseuse possédant les marqueurs respectifs des cellules HSC et de l'endothélium,  $\text{CD34}^+$  et  $\text{VEGF-R2}^+$ , génèrent des cellules hématopoïétiques et endothéliales *in vitro* (Pelosi et al., 2002). Chez la souris, les cellules multipotentes de la moelle osseuse ( $\text{Sca}^+$ ,  $c\text{-Kit}^+$ ,  $\text{Lin}^-$ ) se différencient *in vivo* en cellules endothéliales (Bailey et al., 2004). L'identification par Choi de cellules représentant l'hémangioblaste a apporté une preuve concrète de l'existence d'un progéniteur commun aux cellules hématopoïétiques et endothéliales (Choi et al., 1998). En effet, en utilisant le système de différenciation hématopoïétique *in vitro* de cellules souches embryonnaires de souris (ES), Choi a montré que les cellules différenciées contiennent une population unique de cellules blastiques (BL-CFC), capable de générer autant des cellules hématopoïétiques qu'endothéliales dans des conditions appropriées (Choi, 1998; Choi et al., 1998; Kennedy et al., 1997). Les BL-CFC, d'origine clonale, expriment des marqueurs

communs aux cellules endothéliales et hématopoïétiques. Plus important encore, lorsque mis en culture dans un milieu contenant des facteurs de croissance hématopoïétiques et endothéliaux, les BL-CFC génèrent autant de cellules primitives hématopoïétiques et définitives qu'endothéliales.

## **1. 2. Le système de différenciation hématopoïétique *in vitro***

L'étude des événements qui contrôlent l'établissement du système hématopoïétique lors de l'embryogenèse précoce à partir de cellules dérivées de l'embryon, est très difficile. Ceci est notamment dû à l'accessibilité restreinte du tissu, au petit nombre de cellules obtenues et surtout à la rapidité de la séquence des événements hématopoïétiques rendant impossible de suivre efficacement les précurseurs hématopoïétiques. Dans ce contexte, le recours au système de différenciation hématopoïétique des cellules ES (cellules souches embryonnaires de souris) *in vitro* permet non seulement de contourner les problèmes évoqués ci-dessus, mais aussi l'étude de l'érythropoïèse primitive et définitive.

En 1981, Martin et Evans ont démontré que la différenciation spontanée de cellules provenant de la masse interne du blastocyste au jour embryonnaire E3.5 (cellules ES murines) en absence de LIF, génère des corps embryonnaires (EBs). Les EBs étant des masses de cellules de structure tridimensionnelle dans lesquelles se développent plusieurs lignées, incluant les cellules endothéliales et hématopoïétiques (Doetschman et al., 1985; Keller et al., 1993; Nishikawa et al., 1998). Ce système de différenciation mime les événements qui prennent place *in vivo* d'E6.5 à E7.5 lors de l'embryogenèse. Ainsi des études d'expression de marqueurs spécifiques aux différents feuilletts embryonnaires et à l'érythropoïèse primitive ont démontré la présence de cellules du mésoderme et de cellules hématopoïétiques dans les corps EBs (figure 3) (Keller et al., 1993). Plusieurs études indiquent que la cinétique de développement des précurseurs de lignées hématopoïétiques dans les EBs est similaire à la séquence des événements conduisant à l'hématopoïèse lors de l'embryogenèse normale. Dans les EBs comme dans l'embryon, l'érythropoïèse

primitive se développe avant l'érythropoïèse définitive. Cette approche de différenciation *in vitro* de cellules ES constitue un outil efficace pour l'étude des gènes impliqués dans l'hématopoïèse primitive et définitive.

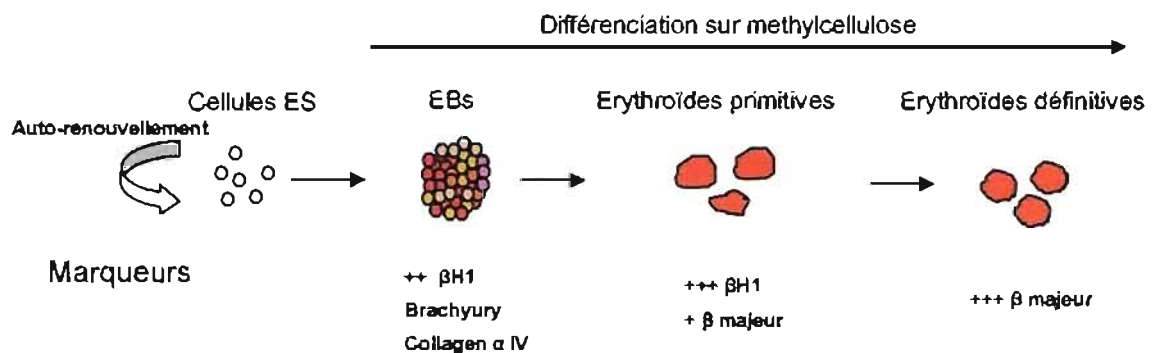


Figure 3: Différenciation hématoïétique des cellules ES murines *in vitro*.

Légende : Les corps embryonnaires (EBs) sont générés sur méthylcellulose à partir de cellules ES. Cette première étape de différenciation est suivie par une seconde étape au cours de laquelle sont produites les colonies érythroïdes primitives et définitives.

### 1.3. Les cellules hématoïétiques

Il a été établi que la cellule souche hématoïétique (HSC) est à la base du système hématoïétique, ce précurseur unique possède plusieurs caractéristiques : la totipotence, soit la capacité de générer toutes les lignées hématoïétiques, la capacité de reconstituer à long terme le système hématoïétique d'un animal hémato déficient après une irradiation létale, un potentiel de prolifération et d'auto renouvellement (Till and McCulloch, 1964). Chez l'humain, près de  $2 \times 10^{11}$  érythrocytes et de  $10^{10}$  globules blancs sont éliminés chaque jour (Bellantuono, 2004). Au cours de l'hématopoïèse, cette rare population de cellules clonogéniques (HSC) maintient donc l'hématopoïèse normale en fournissant à l'organisme des cellules pour remplacer cette perte quotidienne. Les précurseurs issus de la différenciation de cellules souches génèrent des progéniteurs qui au fil de différenciations

successives perdront graduellement leur potentiel de prolifération. Ultiment ces progéniteurs aboutissent à des cellules matures qui constituent les cellules du sang.

### 1.3.1 Les progéniteurs

La caractérisation phénotypique et fonctionnelle de la population de cellules du système hématopoïétique incluant l'HSC, a permis de séparer des populations distinctes de progéniteurs de la cellule hématopoïétique mature. Au sommet de la hiérarchie on retrouve les LT-HSC ou LTR-HSC, des cellules capables de repopulation du système hématopoïétique à long terme. Ces cellules ont une capacité élevée de prolifération et possèdent un potentiel élevé de différenciation comme l'ont démontré des expériences de transplantation et de ciblage de marqueurs cellulaires (Dzierzak and Medvinsky, 1995; Morrison et al., 1997; Morrison and Weissman, 1994; Spangrude et al., 1988; Weissman et al., 2001). Après les LT-HSC viennent les cellules ST-HSC ou S-TRC, qui sont semblables aux LT-HSC de part leur capacité à reconstituer toutes les lignées hématopoïétiques, mais sur de courtes périodes de temps 8-10 semaines (Morrison et al., 1997; Morrison and Weissman, 1994). Les ST-HSC sont suivis de progéniteurs oligopotents, ayant des capacités de différenciation très restreinte ne pouvant générer tout au plus que deux ou trois sous populations (Akashi et al., 2000; Kondo et al., 1997). Les progéniteurs communs de cellules lymphoïdes (CLP), les progéniteurs communs de cellules myéloïdes (CMP) constituent les progéniteurs oligopotents du système hématopoïétique. Parmi les précurseurs oligopotents les plus étudiés figurent les CFU-S. Pris au départ pour la cellule souche hématopoïétique, son incapacité à générer toutes les lignées lymphoïdes du système hématopoïétique l'a délesté de ce statut. Till et McCulloch ont été les premiers à en démontrer l'existence (Till and McCulloch, 1961; Wu et al., 1967, 1968). En effet ils ont montré qu'après une irradiation à dose létale, les cellules de la rate ou celles de la moelle osseuse du donneur étaient capables de coloniser la rate du receveur et générer des nodules dans celle-ci, après 8-12 jours de transfert. Une caractérisation approfondie des nodules a révélé que ceux-ci contenaient des cellules hématopoïétiques: en l'occurrence des



érythrocytes primitifs et définitifs, des granulocytes et des mégakaryocytes. Les cellules à l'origine de ces colonies ont été considérées comme étant les progéniteurs communs des mégakaryocytes et érythrocytes, et ont été appelées CFUs, pour unité formant une colonie dans la rate. Par la suite, Siminovitch et al. ont démontré en 1963 qu'en plus de leur potentiel prolifératif et de différenciation (génération de nodules contenant plusieurs lignées hématopoïétiques), ces cellules étaient capables d'auto-renouvellement (Siminovitch et al., 1963). Ainsi en effectuant une transplantation secondaire de ces nodules de rate à un second receveur irradié, on observait à nouveau la formation de colonies dans la rate de ce second animal. Par ailleurs, la différenciation des progéniteurs oligopotents de la lignée myéloïde donne lieu à des progéniteurs alternatifs tels que: les progéniteurs communs des granulocytes et monocytes (GMP), et les progéniteurs communs de mégakaryocytes et érythrocytes (MEP). Ultimement ces progéniteurs vont finir par se différencier en précurseurs hématopoïétiques, lesquels à la suite d'un processus de maturation produiront des cellules matures, composantes du sang (figure 4). À cet effet, Iscove et al. ont mis au point une technique de différenciation des progéniteurs hématopoïétiques sur méthylcellulose, permettant l'obtention rapide de progéniteurs (Iscove and Sieber, 1975). Cette technique couramment utilisée pour évaluer le potentiel prolifératif des progéniteurs hématopoïétiques de la lignée érythroïde, permet la génération de CFU-e après seulement 2 jours de culture en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol et d'érythropoïétine, une cytokine importante pour la maturation des érythrocytes. Ces colonies générées *in vitro*, principalement constituées de cellules érythroïdes, ont été appelées CFU-e pour unité formant une colonie érythroïde. Cette méthode de différenciation *in vitro* de progéniteurs hématopoïétiques a permis de mettre à jour un progéniteur hématopoïétique plus précoce que le CFU-e, soit le BFU-e, pour unité formant des colonies érythroïdes de grande proportion (burst). Ce deuxième type de colonie érythroïde généré après 7 jours de culture, est obtenu en plus faible proportion que le CFU-e et est de plus grande taille que le CFU-e. Le BFU-e serait donc un précurseur érythroïde précoce tandis que le CFU-e serait plus tardif et donnerait naissance aux précurseurs érythroïdes : les pro-érythroblastes.

### **1.3.2. Les cellules matures**

Les progéniteurs oligopotents donneront naissance aux cellules différenciées du système hématopoïétique, parmi celles-ci on distingue deux grandes familles: les cellules de la lignée lymphoïde et les cellules de la lignée myéloïde. Les lymphocytes B et T font partie de la lignée lymphoïde, tandis que les érythrocytes, les plaquettes, les neutrophiles, les macrophages, les éosinophiles et les basophiles/mastocytes constituent la lignée myéloïde. Toutes ces cellules en phase terminale de différenciation ne peuvent plus reconstituer le système hématopoïétique d'un individu hématodéficient, leur régénération dépend donc très étroitement de la HSC et du maintien de ses propriétés. Néanmoins, ces progéniteurs oligopotents ont à passer par différentes étapes de maturation au site de l'hématopoïèse avant de rejoindre la circulation sanguine, qui n'est composée que de cellules matures. La lignée érythroïde présente des caractéristiques très évidentes de ce processus de différenciation : notamment l'énucléation, l'augmentation de la concentration en l'hémoglobine, principale protéine des hématies.

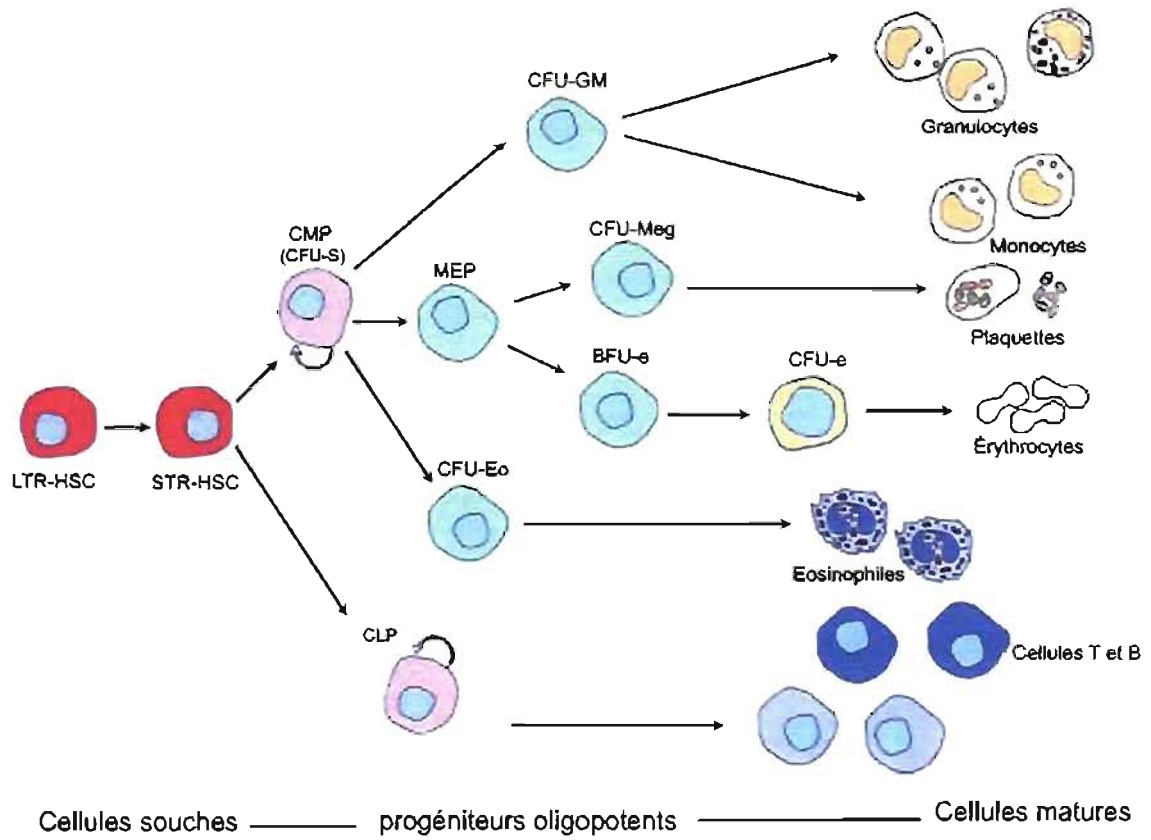


Figure 4: Représentation simplifiée des cellules du système hématopoïétique.

Tiré de *Developmental Biology*, 5eme Edition, Scott F. Gilbert

## Le locus de la $\beta$ globine

Dans le système circulatoire, les cellules matures érythroïdes, les érythrocytes transportent l'O<sub>2</sub> des poumons vers les tissus et le CO<sub>2</sub> des tissus vers les poumons pour l'exhalation. À l'intérieur des érythrocytes ce processus est médié par une protéine appelée l'hémoglobine. L'hémoglobine (Hb) est une molécule tétramérique constituée de deux chaînes de type  $\alpha$  globine, deux de type  $\beta$  globine, et de quatre molécules d'hème. Ces deux types de chaînes sont produites de façon équimolaire dans la cellule. Chez l'humain, les gènes qui codent pour ces chaînes sont organisés en locus, localisés respectivement sur le chromosome 11 pour l' $\alpha$  globine et sur le 16 pour la  $\beta$  globine. Le locus de l' $\alpha$  globine contient 3 gènes fonctionnels: le gène embryonnaire  $\zeta$  et les deux gènes adultes  $\alpha$ . Tandis que le locus de la  $\beta$  globine comprend cinq gènes fonctionnels :  $\epsilon$ ,  $^G\gamma$ ,  $^A\gamma$ ,  $\delta$ , et  $\beta$ . Au cours du développement, les différents gènes associés aux loci de l'  $\alpha$  et de la  $\beta$  globine s'expriment de façon stade et tissu spécifique. Cette expression séquentielle permet la production d'une hémoglobine stade spécifique qui répond aux différents besoins en oxygène du fœtus en développement. Nous nous intéresserons principalement à la régulation des gènes du locus de  $\beta$  globine.

### 2.1 Le Locus de la $\beta$ globine

#### 2.1.1 Arrangement et expression des gènes du locus humain

Le locus humain de la  $\beta$  globine contient cinq gènes fonctionnels 5' $\epsilon$ - $^G\gamma$ - $^A\gamma$ - $\delta$ - $\beta$ -3' et un pseudogène  $\psi\beta$  non exprimé au cours du développement. En amont du locus, se trouve le LCR (Locus control region) un puissant activateur de l'expression des gènes du locus (figure 5 A). Au cours du développement, les gènes sont exprimés de façon tissu et stade spécifique en accord avec leur arrangement spatial dans le locus 5' $\epsilon$ - $^G\gamma$ - $^A\gamma$ - $\delta$ - $\beta$ -3'.

Cette expression séquentielle des gènes est appelée commutation de l'hémoglobine. Chez l'humain, deux commutations de l'hémoglobine ont lieu et elles sont accompagnées de changements dans le site de l'hématopoïèse (figure 5 B). Durant l'érythropoïèse embryonnaire/primitive, lors des 6 premières semaines de gestation, le gène embryonnaire  $\epsilon$  est exclusivement exprimé dans les érythrocytes primitifs nucléés du sac vitellin, pendant que les gènes  $G\gamma$ ,  $A\gamma$  et  $\beta$  sont silencieux. Deux des chaînes embryonnaires de type  $\beta$  globine ( $\epsilon$ ) s'associent à deux chaînes embryonnaires de type  $\alpha$  globine ( $\zeta$ ) pour former l'hémoglobine embryonnaire  $\zeta_2\epsilon_2$ . L'érythropoïèse embryonnaire est suivie par la définitive fœtale qui se déroule dans le foie fœtal. Cette transition est marquée par l'expression des gènes fœtaux et l'abolition de celle du gène embryonnaire  $\epsilon$  : ceci constitue le premier événement de commutation. Au cours de l'érythropoïèse définitive fœtale, l'hémoglobine fœtale (HbF) produite est constituée de chaînes de type  $\alpha$  et de chaînes fœtales de type  $\beta$  :  $\alpha_2\gamma_2$ . Lors de la période périnatale, autour des 28-30<sup>eme</sup> semaines de gestation les gènes fœtaux sont progressivement remplacés par les gènes adultes  $\delta$  et  $\beta$ . Peu après la naissance, les gènes adultes sont majoritairement exprimés dans la moelle osseuse, tandis que l'expression des gènes fœtaux se limitant à  $\sim 2\%$  du ratio de l'expression des  $\beta$  globines totales. Il s'agit du deuxième événement de commutation, caractérisé par le passage de l'érythropoïèse définitive du foie fœtal à la moelle osseuse. Les érythrocytes définitifs expriment deux types de tétramères d'hémoglobine adulte : HbA qui représente  $\sim 98\%$  de l'hémoglobine totale, constituée de  $\alpha_2\beta_2$  et HbA<sub>2</sub> constitué de  $\alpha_2\delta_2$

**Cette page est inexistante**

À l'extrémité 5' du locus, situé 6-20 kb en amont du gène  $\epsilon$  globine se trouve le LCR (Locus Control Region). Composé de 5 sites d'hypersensibilité à la DNase (5'HSs), dont quatre (5'HS1-HS4) sont érythroïdes spécifiques, le LCR est requis pour un haut niveau d'expression des gènes du locus de façon stade et tissu spécifique au cours du développement (Forrester et al., 1986; Tuan et al., 1985). Chacun des quatre sites érythroïdes contient un cœur de 200-300 bp nécessaire à l'activation transcriptionnelle des gènes du locus par le LCR (Li et al., 2002a). En 3' du locus 20 kb en aval du gène de  $\beta$  globine adulte on retrouve aussi un autre site d'hypersensibilité à la DNase, le 3' HS1.

### **2.1.2 Arrangement et expression du locus murin de la $\beta$ globine**

La restriction tissu spécifique de l'expression des  $\beta$  globines au cours du développement, et la présence d'éléments de régulation du locus murin conservé entre l'humain et la souris sont autant de facteurs qui font de la souris un modèle animal approprié pour l'étude de la régulation du locus de la  $\beta$  globine. Chez la souris, le locus de la  $\beta$  globine localisé sur le chromosome 7, possède une forte homologie structurale et fonctionnelle avec son homologue humain. Les gènes du locus sont arrangés selon leur ordre développemental d'expression (figure 6). Le Locus murin de la  $\beta$  globine comporte quatre gènes fonctionnels [ $\epsilon\gamma$ ,  $\beta\text{H1}$ ,  $\beta$ -majeur ( $\beta^{\text{maj}}$ ),  $\beta$ -mineur ( $\beta^{\text{min}}$ )], exprimés sous le contrôle du LCR situé en amont du locus. Quoique de près de deux fois la taille du LCR humain, le LCR du locus de  $\beta$  globine murin est constitué d'autant de sites d'hypersensibilité à la DNase érythroïdes spécifiques (HSs) (Fiering et al., 1995; Moon and Ley, 1990). Vers E7.5, lors de l'érythropoïèse primitive, les gènes embryonnaires  $\epsilon\gamma$  et  $\beta\text{H1}$  sont exprimés dans le sac vitellin. L'expression du gène  $\epsilon\gamma$  diminue à 8.5 jour embryonnaire, tandis que celle de  $\beta\text{H1}$  persiste dans le foie fœtal (Leder et al., 1992). À E11.5 jour embryonnaire, l'érythropoïèse migre du sac vitellin au foie fœtal. Ce changement de site hématopoïétique marque le début de l'érythropoïèse définitive et

exprimées de façon prépondérante à E12.5 (Trimborn et al., 1999; Wawrzyniak and Popp, 1987). Peu après la naissance, les  $\beta$  globines adultes s'expriment principalement dans la moelle osseuse, le site de l'hématopoïèse définitive au stade adulte, et à des niveaux moindre dans la rate. Les gènes fœtaux *per se*, ceux dont l'expression est strictement restreinte au stade fœtal, sont absents chez la souris. Il n'y a donc qu'une commutation chez la souris : celle des gènes embryonnaires ( $\epsilon^y$  et  $\beta H1$ ) aux gènes adultes ( $\beta^{maj}$  et  $\beta^{min}$ ).

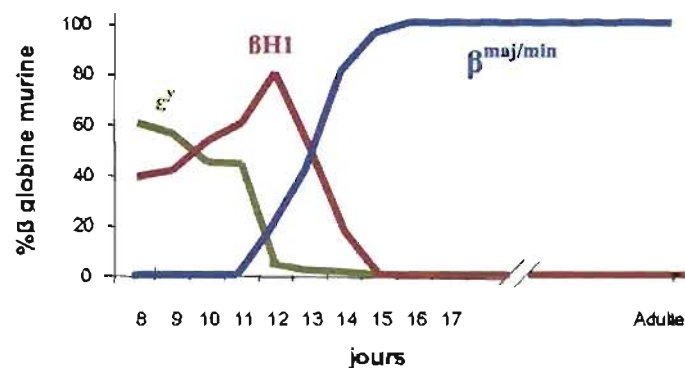
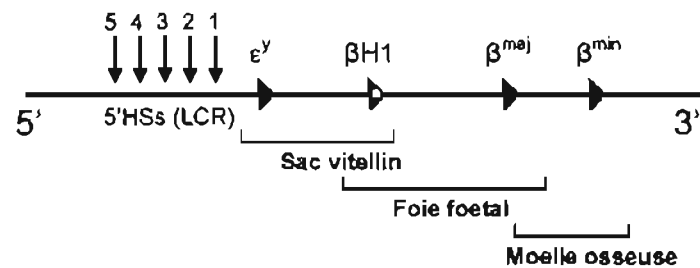


Figure 6: Organisation et expression développementale des gènes du locus de  $\beta$  globine de souris.



### 2.1.3 Étude en transgénèse du locus de la $\beta$ globine humaine

L'absence de la commutation fœtale à adulte, dû à celle de gènes fœtaux proprement définis chez la souris suggère une disparité entre le locus humain et murin de  $\beta$  globine. D'où la nécessité de développer des modèles murins qui expriment les gènes humains de  $\beta$  globine. Toutefois, compte tenu de la limitation des moyens techniques disponibles, les premiers essais d'expression de gènes humains de  $\beta$  globine chez la souris ont été effectués à partir de constructions partielles du locus (Costantini et al., 1985; Townes et al., 1985). Bien que ces études en transgénèse du locus aient contribué à la compréhension du mécanisme de la commutation des gènes de  $\beta$  globine, il reste tout de même que toutes ces constructions partielles du locus ne respectent pas l'organisation normale du locus, et donc ne traduisent pas nécessairement aussi fidèlement le profil d'expression des gènes de globines qui prend place chez l'humain. En effet des études ont révélé que l'ordre des gènes dans le locus est important pour une expression stade spécifique des gènes au cours du développement (Peterson and Stamatoyannopoulos, 1993). Ces résultats soulignent davantage l'importance d'étudier la commutation des gènes de  $\beta$  globine dans le contexte du locus entier. En 1993, Peterson a généré une souris transgéniques,  $\beta$ -YAC globine, contenant le locus entier de la  $\beta$  globine humaine présent dans un chromosome artificiel de levure (Peterson et al., 1993). La souris  $\beta$  YAC globine présente une régulation développementale normale des gènes du locus, l'expression des gènes de  $\beta$  globine est restreinte aux tissus érythroïdes. Les gènes embryonnaires et fœtaux apparaissent au stade précoce du développement et les gènes adultes sont exclusivement confinés au stade adulte (Peterson et al., 1993). C'est ainsi qu'au jour embryonnaire E9, E9.5 et E11, lorsque les  $\beta$  globines embryonnaire ( $\epsilon$ ) et fœtales ( $^G\gamma$ ,  $^A\gamma$ ) sont exprimées dans le sac vitellin, la  $\beta$  globine adulte est non exprimée. À E11.5 la  $\beta$  globine fœtale ( $\gamma$ ) est exprimée dans le foie fœtal, puis à E12.5 son expression décroît pour être remplacée par les globines adultes. Au jour embryonnaire E14.5, les globines adultes  $\delta$  et  $\beta$  sont

principalement exprimées dans le foie fœtal, tandis que l'expression des gènes  $\gamma$  globine diminue substantiellement. Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que le profil d'expression des gènes humains de  $\beta$  globine du transgène suit celui des  $\beta$  globines endogènes de souris, et de façon générale la régulation stade et tissu spécifique des gènes est conservée au cours du développement.

## 2.2. La commutation de l'hémoglobine

La régulation de la commutation des gènes humains de  $\beta$  globine a été investiguée en utilisant diverses approches expérimentales. L'utilisation des souris transgéniques a joué un rôle déterminant dans notre compréhension de ce phénomène. Les études de transgénèse ont permis de démontrer l'importance du mécanisme de compétition entre les gènes de  $\beta$  globine pour le LCR dans l'activation des gènes du locus à un stade spécifique.

Des données de transgénèse révèlent que le LCR interagit avec un promoteur de gène du locus  $\beta$  globine à la fois, et en présence de deux gènes de globine rapprochés il effectue des va et vient entre les deux promoteurs (Behringer et al., 1990; Enver et al., 1990; Fraser et al., 1998). À cet effet, Behringer a démontré qu'au stade embryonnaire et fœtal, l'absence d'expression du gène  $\beta$  est due à une activation préférentielle respectivement d' $\epsilon$  et  $\gamma$  globine par le LCR (Behringer et al., 1990). Tandis qu'au stade adulte, l'interaction préférentielle du LCR avec les promoteurs des gènes adultes de  $\beta$  globine et non avec les fœtaux ( $\gamma$ ) contribue à l'activation des gènes adultes  $\delta$  et  $\beta$  (Behringer et al., 1990; Enver et al., 1990). Ainsi, lorsque le LCR est lié uniquement soit au gène  $\gamma$  ou au gène  $\beta$ , ces deux gènes présentent une régulation anormale de leur expression au cours du développement (Enver et al., 1990; Peterson and Stamatoyannopoulos, 1993). Le gène  $\gamma$  est exprimé très fortement au stade embryonnaire et fœtal, et très faiblement au stade adulte (Behringer et al., 1990; Enver et al., 1989; Enver et al., 1990). Contrairement au gène fœtal, le gène de  $\beta$

globine lié au LCR est exprimé à tous les stades de développement de façon comparable aux niveaux à l'âge adulte (Behringer et al., 1990; Enver et al., 1990). Toutefois lorsqu'on exprime les gènes  $\gamma$  et  $\beta$  globine sous le contrôle du LCR au sein du même transgène, et en respectant leur ordre dans le locus, la régulation normale des gènes est rétablie (Enver et al., 1990)(Lloyd et al.,1992). L'expression du gène  $\gamma$  est restreinte au stade fœtal, tandis que le gène adulte remplace graduellement le gène  $\gamma$  dans le foie fœtal puis finit par être majoritairement exprimé au stade adulte. La compétition pour le LCR a donc un rôle privilégié dans la commutation de l'expression des gènes du locus de  $\beta$  globine. L'activation stade spécifique des gènes de  $\beta$  globine est un mécanisme important dont la régulation se doit d'être finement encadrée au risque d'entraîner des maladies.

### **2.3. Les hémoglobinopathies du locus de la $\beta$ -globine**

L'équilibre dans la production des gènes d' $\alpha$  et  $\beta$  globine est important pour la production d'une hémoglobine normale. L'apparition de mutations aux loci de globine cause la production d'hémoglobine anormale ou une insuffisance quantitative de celle-ci. Ces pathologies du système hématopoïétique, sont généralement regroupées sous le terme hémoglobinopathie. La  $\beta$  thalassémie et l'anémie falciforme constituent les deux principales hémoglobinopathies qui affectent la production ou la fonction des gènes de type  $\beta$  globine (Stamatayannopoulos and Grosveld, 2001).

#### **2.3.1. La $\beta$ thalassémie**

La  $\beta$  thalassémie est une anomalie quantitative du gène adulte de la  $\beta$  globine. Durant la vie fœtale normale la proportion des chaînes foetales de type  $\beta$  globine ( $\gamma$ ) est équivalente à celle de leur partenaire de type  $\alpha$  globine, ce qui résulte en la production de quantité suffisante d'hémoglobine fœtale normale (HbF,  $\alpha_2\gamma_2$ ). Dans des cas de  $\beta$

thalassémies, la délétion des gènes adultes de  $\beta$  globine,  $\delta$  et  $\beta$ , ou les différentes mutations ponctuelles dans le gène de  $\beta$  globine causent une diminution et dans certains cas une absence de la production des chaînes de  $\beta$  globine adulte (Stamatayannopoulos and Grosveld, 2001). Ceci résulte en une production de quantité insuffisante d'hémoglobine adulte normale (HbA,  $\alpha_2\beta_2$ ). Le débalancement du ratio des chaînes d' $\alpha$  et  $\beta$  globine crée un déséquilibre des chaînes de globine en faveur des chaînes  $\alpha$  (Loukopoulos, 1991; Wong et al., 1989). Ces chaînes  $\alpha$  non appariées s'associent avec l'hème pour former l' $\alpha$  hémoglobine, qui s'accumule dans la cellule. N'étant pas de configuration stable, ces agrégats d' $\alpha$  hémoglobine finissent par précipiter dans la cellule érythroïde. Chez la souris  $\text{hemi}^{\beta\text{thal}}$ , un modèle murin de la  $\beta$  thalassémie possédant une délétion hémizygote des gènes adultes de  $\beta$  globine, la précipitation de ces agrégats dans les précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse conduit à l'apoptose (Beauchemin et al., 2004). Au niveau du sang périphérique, l'excédant de chaînes  $\alpha$  globine forment des inclusions, appelées corps de Heinz, à la surface de la membrane du globule rouge, autant chez l'humain que chez la souris (Coleman et al., 1995). Ces corps de Heinz causent des dommages membranaires, ce qui entraîne en bout de ligne une hémolyse du globule rouge, générant ainsi une anémie. Chez la souris  $\text{hemi}^{\beta\text{thal}}$ , la mort prématurée des précurseurs immatures et celle des cellules matures contribuent à rendre l'érythropoïèse inefficace, laquelle est incapable de combler les besoins de l'organisme (Beauchemin et al., 2004). Afin de pallier à l'incapacité de la moelle osseuse à soutenir une érythropoïèse normale, une érythropoïèse extra médullaire est initiée dans la rate par des progéniteurs hématopoïétiques en provenance de la moelle osseuse. Cette stimulation de l'érythropoïèse splénique conduit à l'augmentation du volume de la rate, communément appelée splénomégalie. De plus en réponse à l'érythropoïèse inefficace, on note chez les  $\beta$  thalassémiques la mise en place d'un mécanisme de compensation par l'organisme (Beauchemin et al., 2004). Ainsi au stade précoce de la différenciation hématopoïétique, on observe une production élevée de la quantité de progéniteurs multipotents et de colonies oligopotentes (BFU-e, CFU-e) tant dans la moelle que dans la rate.

### 2.3.1.1. Les mutations PHHF

Les délétions et mutations dans la région 3' du locus de la  $\beta$  globine donnent lieu à une variété de phénotypes différents, caractérisés par des changements d'expression des gènes de  $\gamma$  et  $\beta$  globine. D'une part on retrouve des délétions associées aux  $\beta$  thalassémies, lesquelles n'ont pas d'effet sur l'expression de la  $\gamma$  globine, mais affectent plutôt celle de la  $\beta$  globine adulte. D'autre part on retrouve des délétions en 3' non thalassémiques, qui conduisent à une expression abondante de la globine fœtale ( $\gamma$ ) au stade adulte. Ce phénotype est connu sous le nom de la persistance héréditaire de l'hémoglobine foetale (PHHF) (Bollekens and Forget, 1991; Feingold et al., 1985a, b; Forget, 1998; Forget et al., 1983). Un certain nombre des événements menant à ce phénotype ont été caractérisés en profondeur et peuvent être classés en deux groupes : les PHHF à délétion et les PHHF à mutations. Dans le cas de PHHF à délétion, il apparaît que le rapprochement de séquences distales de régulation positive (enhancer) à proximité du promoteur de  $\gamma$  soit à l'origine du phénotype (Anagnou et al., 1995; Arcasoy et al., 1997; Feingold et al., 1985a). Par ailleurs il a aussi été rapporté que dans le cas de délétions des gènes adultes  $\delta$  et  $\beta$  de globine, le phénotype pourrait être simplement dû à une absence de compétition de gènes fœtaux et adultes pour le puissant activateur des gènes locus de la  $\beta$  globine, le LCR. Dans le cas de PHHF sans délétion de gènes, des mutations dans le promoteur des gènes de globine  $^G\gamma$  et  $^A\gamma$ , sont responsables du phénotype. En effet, ces mutations ponctuelles non thalassémiques, suggèrent que les séquences touchées sont des régions de régulation négative dont les mutations abolissent la fonction de répression (Feingold et al., 1985; Katsantoni et al., 2003).

L'importance clinique du phénotype PHHF dans la sévérité des hémoglobinopathies est apparue lors de l'observation d'individus asymptomatiques, porteurs de mutations de type  $\beta$  thalassémiques et présentant une synthèse abondante de la chaîne fœtale ( $\gamma$ ) des gènes de  $\beta$  globines au stade adulte. Des mutations compensatoires de type PHHF

responsables de cette expression des gènes fœtaux ( $^G\gamma, ^A\gamma$ ) de type  $\beta$  globine au stade adulte, ont été identifiées dans le locus de la  $\beta$  globine (Stamatayannopoulos and Grosveld, 2001). Il a alors été proposé que la réactivation de la  $\gamma$ , et/ou l'expression de la  $\beta$  globine au stade adulte puisse être une voie de traitement de la  $\beta$  thalassémie. Actuellement des traitements basés sur ces hypothèses sont à l'étape expérimentale (Malik and Arumugam, 2005; Malik et al., 2005; May et al., 2000).

### **2.3.2. L'anémie falciforme**

L'anémie falciforme est une anomalie qualitative du gène adulte de  $\beta$  globine. Cette maladie génétique récessive est due à la mutation d'un nucléotide dans le gène de la  $\beta$  globine adulte qui cause une substitution d'acides aminés dans le sixième codon (acide glutamique pour valine) (Pauling et al., 1949). La chaîne de  $\beta$  globine mutante conduit à la production d'une hémoglobine adulte anormale (Hb S) aux propriétés physiques altérées. Chez les individus normaux, la molécule d'Hb possède une conformation telle que les acides aminés externes sont polaires. Ceci confère de la solubilité à la protéine tout en prévenant des interactions intermoléculaires. À l'inverse les acides aminés internes hydrophobes, créent une poche propice à la liaison de l'oxygène (Rammey and Sharma, 2001). Dans l'anémie falciforme, l'hémoglobine S (Hb S), relativement insoluble, lorsque déoxygénée expose des résidus hydrophobes (valine) au milieu extérieur, favorisant ainsi la formation de polymères allongés d'Hb à l'intérieur de l'érythrocyte. L'agrégation de plusieurs molécules d'Hb S, appelée polymérisation, mène à la formation d'un long polymère d'Hb S qui déformera le globule rouge. Le globule rouge passera d'une forme biconcave à celle de faucille (Wang, 2004). Les polymères d'Hb S entraînent une rigidité de la membrane; le globule rouge qui perd de sa plasticité a donc des difficultés à traverser les petits vaisseaux, ce qui va causer de la vasoocclusion. Laquelle sera aggravée par la propension élevée des érythrocytes anormaux à adhérer à l'endothélium (Hebbel et al., 1980a; Hebbel et al., 1980b). Les globules rouges coincés sont lysés, tandis que érythrocytes anormaux sont retirés de la circulation sanguine par la rate, et détruits par les

macrophages. L'anémie hémolytique évidente dans l'anémie falciforme induit une stimulation de l'érythropoïèse splénique accompagnée d'un mécanisme compensatoire dans les deux organes hématopoïétiques (moelle et rate). L'activité élevée de clairance de la rate doublée de son rôle dans l'érythropoïèse conduit à une splénomégalie.

Chaque facette de la pathophysiologie de l'anémie falciforme, représente une cible de traitement. Toutefois, la variation des phénotypes cliniques de la maladie et l'absence de pénétrance de la maladie chez les individus hétérozygotes pour la mutation suggèrent fortement que l'expression des gènes de  $\beta$  globine normaux chez les individus atteints pourrait corriger la maladie. Des études ont d'ailleurs démontré que la chaîne de  $\beta$  globine fœtale ( $\gamma$ ) empêche la polymérisation des molécules d' Hb dans un modèle murin de l'anémie falciforme (Blouin et al., 2000). L'une des avenues prometteuses de traitement de l'anémie falciforme est donc la réactivation de gènes fœtaux par thérapie génique ou leur induction via des agents chimiques tels l'hydroxyurée ou les butyrates. Dans ce contexte, il devient donc urgent de déterminer et d'étudier les principaux éléments responsables de l'activation et de la répression des gènes du locus de la  $\beta$  globine.

## **2.4 Régulation du locus de la $\beta$ globine**

Deux mécanismes de régulation sont généralement proposés pour la régulation des gènes du locus de  $\beta$  globine. Le premier étant l'interaction des gènes du locus avec le LCR, et le deuxième étant l'interaction des facteurs cis et trans associés à chacun des gènes du locus.

### **2.4.1 Le LCR**

L'élément de régulation distale, le plus important du locus de  $\beta$  globine est le LCR. Présent dans plusieurs loci de  $\beta$  globine dans différentes espèces animales, son organisation

est largement conservée parmi les vertébrés (Hardison et al., 1997). La conservation de nombreux sites de liaison de facteurs de transcription à l'intérieur des sites HSs du LCR a permis de postuler que ceux-ci sont importants pour son fonctionnement. L'investigation des propriétés des sites HSs du LCR a permis de mettre à jour deux fonctions du LCR. Soit, l'activation de l'expression des gènes de  $\beta$  globine et l'autre fortement controversée, soit son rôle dans le remodelage de la chromatine.

Les sites HSs participent de façon différente aux fonctions du LCR. Le site HS1 est très important pour protéger le locus contre les effets liés au site d'intégration (Fraser et al., 1990). En effet Milot et al ont démontré que dans le contexte du locus entier, la délétion du HS1 rendait l'expression des gènes du locus plus sensible à la chromatine environnante du site d'intégration (Milot et al., 1996). Le site HS1 n'a cependant aucune activité transcriptionnelle en lieu même. Sa délétion chez un patient humain n'affecte pas la transcription des gènes de  $\beta$  globine (Kulozik et al., 1991). De plus *in vitro* lors de transfections transitoires, le site HS1 est incapable de transactiver des gènes rapporteurs (Collis, 1990; Fraser, 1993). Contrairement au HS1 qui ne possède pas d'activité transcriptionnelle le HS2 se comporte comme un puissant enhancer (Caterina et al., 1994; Fraser et al., 1990; Ryan et al., 1989; Tuan, 1992; Kong, 1997). Il remplace qualitativement la fonction d'enhancer du LCR entier. L'utilisation du LCR entier ou du site HS2 comme élément régulateur tant en transgénèse que lors d'expériences de transfection confère une expression élevée au transgène, indépendante de la position du transgène (Liu et al., 1992; Talbot et al., 1989). Le 5' HS2 qui fonctionne à tous les stades de développement, contient des sites de liaison à plusieurs facteurs transcriptionnels : Sp1, NF-E2, GATA-1 (Harju et al., 2002). Dans le locus humain, la délétion de HS2 cause une réduction de l'expression des gènes de  $\beta$  globine (Peterson et al., 1996). *In vitro*, la liaison de NF-E2 a été démontrée comme requise pour la fonction d'enhancer du HS2 dans le contexte du locus  $\beta$  YAC globine (Armstrong and Emerson, 1996). La délétion du cœur (100-200 pb) de HS2 rend le locus résistant à l'action de la DNase I, laissant supposer que HS2 aurait un rôle dans l'ouverture de la chromatine du locus par le LCR. L'activité d'ouverture de la chromatine



est restaurée par le site 5'HS3 chez un mutant HS2 (Bungert et al., 1999). Le 5'HS3 ne peut cependant compenser pour l'absence d'activation des gènes, dont l'expression demeure toujours sous les valeurs normales en absence de HS2 (Bungert et al., 1999). Le 5'HS3 participe toutefois au maintien de l'expression des gènes de  $\beta$  globine. Car, la délétion de l'unité centrale (225-234 bp au cœur du HS3) de HS3 cause non seulement une diminution de l'expression de tous les gènes de  $\beta$  globine mais en plus, celle-ci devient dépendante du site d'intégration chez les transgènes  $\beta$  globine (Fang et al., 2005). Cette dérégulation de l'expression des gènes de  $\beta$  globine à tous les stades développementaux est aussi observée lors de délétion de 280 bp au cœur du site HS4 (Bungert et al., 1995; Milot et al., 1996). Le site 5'HS5 n'a aucun effet stimulateur sur l'activité des gènes de  $\beta$  globine, mais fonctionne comme un isolateur des transgènes de  $\beta$  globine qui lui sont associés (Bell et al., 2001; Bender et al., 1998; Farrell et al., 2000; Li et al., 2002b). De façon générale, il ressort que la délétion des unités centrales des 3 sites HSs érythroïdes (200-300bp) altère la fonction du LCR et sa sensibilité à la DNase, le rendant de fait inaccessible aux potentiels facteurs transcriptionnels. L'ensemble de ces données a donné naissance au concept du ``LCR comme un holocomplexe`` (Bungert et al., 1995; Bungert et al., 1999; Wijgerde et al., 1995). Ce concept suggère que les sites HSs du LCR coopéreraient pour former un holocomplexe capable de remplir toutes les fonctions attrituées du LCR (Li et al., 1998). Il demeure toutefois une question: sur la façon dont le LCR ou cet holocomplexe fonctionne pour activer les gènes de  $\beta$  globine. Plusieurs modèles d'activation des gènes ont été proposés: le looping, le tracking, le tracking facilité et le linking (Bulger and Groudine, 1999; Engel and Tanimoto, 2000, Tuan et al., 1985). L'ensemble de données actuelles converge vers un modèle commun, le looping. Le modèle de looping stipule que l'holocomplexe formé par les HSs du LCR, possède un site actif via lequel le LCR interagirait avec les facteurs de transcription pour promouvoir la transcription des gènes du locus. Cette structure viendrait physiquement interagir avec les promoteurs des gènes appropriés, formant ainsi une boucle d'activation. De ce fait, la proximité du LCR près de séquences de régulation proximale, permettrait l'interaction entre les facteurs

transcriptionnels liés au LCR et ceux liés aux promoteurs des gènes de  $\beta$  globine (Bulger and Groudine, 1999). Les unités centrales de HSs (100-200 bp) sont nécessaires pour la formation du site actif de l'holocomplexe. Ainsi en absence de l'une des unités centrales de HSs, bien que l'holocomplexe soit encore capable de se former, le site actif est détruit. D'où l'abolition partielle de l'expression des gènes  $\epsilon$ ,  $\gamma$  et  $\beta$  globine lorsqu'on délète le 200-300 bp au cœur de HS2 ou HS3 (Bungert et al., 1999; Peterson et al., 1996). Toutefois, lorsqu'on supprime l'un ou l'autre des sites HSs dans leur intégralité incluant les régions flaquantes, il semble que le site actif soit capable d'être reformé avec les sites HSs restants mais l'efficacité du complexe s'en trouve réduite. De sorte que, les gènes bien qu'exprimés présentent des niveaux d'activation inférieurs à la normale (Peterson et al., 1996). Bien que la plupart des données s'accordent sur la nécessité du LCR pour une expression élevée des gènes du locus de la  $\beta$  globine (Bender et al., 2000; Navas et al., 2002), son rôle dans l'ouverture de la chromatine du locus de  $\beta$  globine continue d'être largement discuté. En effet, chez la souris la délétion complète du LCR n'apporte aucun changement à la sensibilité du locus à la DNase, quoique le niveau d'expression des gènes soit affecté (Bender et al., 2000; Epner et al., 1998). Par ailleurs la délétion partielle des HSs du LCR dans le locus humain en culture cellulaire, n'influence pas la formation des autres sites d'hypersensibilité à la DNase I du locus mutant (Reik et al., 1998). Ceci suggère que le LCR n'est pas indispensable au remodelage de la structure de la chromatine du locus. Néanmoins, des études de transgénèse du locus humain chez la souris ont donné des résultats contradictoires. La délétion du LCR humain chez les souris  $\beta$ -YAC globine conduit à une résistance du locus humain à la digestion par la DNase I (Forrester et al., 1990). En outre les transgènes de type  $\beta$  globine se révèlent très sensibles à l'effet de position en absence de LCR (Milot et al., 1996). Ainsi, le rôle du LCR dans l'ouverture de la chromatine n'est donc pas établi de manière définitive.

## 2.4.2 Éléments régulateurs des gènes du locus de la $\beta$ globine

Outre le LCR, l'étude des éléments régulateurs qui contrôlent le locus de la  $\beta$  globine humaine a mis en évidence une variété de motifs responsables soit de l'activation ou de la répression des gènes du locus au stade développemental approprié. Ces éléments sont généralement classés en deux différentes catégories: les facteurs trans et les facteurs cis.

### 2.4.2.1 Les facteurs cis

#### *2.4.2.1.1 Les promoteurs des gènes de $\beta$ globine*

Plusieurs études ont démontré que l'activation tissu spécifique des gènes de  $\beta$  globine n'est pas seulement le fait du LCR, mais que les gènes eux-mêmes contiennent des séquences capables de conférer une expression tissu spécifique aux transgènes qui leur sont liés. Des expériences de régulation des gènes de  $\beta$  globine en absence de LCR chez des transgéniques, supportent aussi le fait que les promoteurs de certains gènes de  $\beta$  globine soient capables de déterminer la spécificité développementale des gènes (Costantini et al., 1985; Townes et al., 1985). Ainsi, en absence de LCR les gènes  $\gamma$  et  $\beta$  globine, localisés au sein de la même construction, présentent une régulation développementale stade spécifique. Les  $\gamma$  globines sont exprimées à E11.5- 13.5 au début de l'hématopoïèse fœtale et leur expression décroît significativement à E16.5. Par contre, l'expression du gène adulte apparaît à E16.5 lors de l'érythropoïèse définitive, période qui correspond à la transition de l'érythropoïèse du foie fœtal à la moelle osseuse, et atteint son maximum d'expression à E18.5 (Starck et al., 1994). Parallèlement, des nombreuses données suggèrent que les promoteurs des gènes foetaux  $\gamma$  contiennent des éléments nécessaires pour déterminer l'activation stade spécifique des gènes foetaux de la  $\beta$  globine dans le locus  $\beta$  YAC globine (Perez-Stable, 1989; Perez-Stable and Costantini, 1990; Trudel et al., 1987b). Ainsi des expériences de transgénèse ont démontré que la région en 5'(-201-136bp) du gène de  $\gamma$

globine, est essentielle pour une activation stade spécifique de la globine fœtale. De plus cette région du promoteur de  $\gamma^G$  globine est capable de conférer une expression embryonnaire similaire à celle de la globine fœtale au gène adulte de la  $\beta$  globine adulte (Perez-Stable and Costantini, 1990; Trudel et al., 1987b). Les promoteurs de gènes de  $\beta$  globine sont néanmoins incapables de médier des niveaux d'expression élevée en absence du LCR. Contrairement au promoteur de gènes fœtaux, le promoteur du gène adulte de  $\beta$  globine est incapable de médier l'activation de gènes de globine en absence de régions flanquantes du gène de  $\beta$  globine adulte du locus en transgénèse (Trudel et al., 1987a). En outre, des expériences de transfection démontrent clairement qu'il est incapable d'activer significativement l'expression de gènes rapporteurs comparativement à une séquence contrôle (Kollias et al., 1986; Trudel et al., 1987b).

#### 2.4.2.1.2 *Les enhancers*

Trudel a démontré en 1987 qu'un enhancer localisé en 3' du gène adulte de  $\beta$  globine humain (600-900 bp en amont de la queue poly A) est nécessaire pour l'expression stade spécifique de ce gène dans le foie fœtal de souris transgéniques (Trudel and Costantini, 1987). L'aptitude de cet élément à promouvoir l'expression du gène fœtal humain  $\gamma$  au stade fœtal chez des souris transgéniques et ce indépendamment de son orientation, a confirmé son rôle d'enhancer. L'expression de  $\gamma^G$  sous le contrôle de cet enhancer est majoritairement restreinte dans les tissus érythroïdes (Trudel and Costantini, 1987; Trudel et al., 1987). Par ailleurs, on observe aussi que la délétion de cet enhancer 3', réduit près de 25 fois l'expression de  $\beta$  globine dans les cellules embryonnaires de souris, stade auquel les gènes de  $\beta$  globine adultes ne sont pas exprimés. Ceci suggère que l'enhancer 3' de  $\beta$  globine est potentiellement actif au stade embryonnaire et donc ne peut être le seul responsable de l'activation de  $\beta$  globine au stade fœtal/adulte dans les transgéniques  $\gamma/\beta$  globine dépourvus de LCR (Anagnou et al., 1995; Perez-Stable and Costantini, 1990; Perez-Stable et al., 1989). D'autres enhancer ont été identifiés dans le locus. Notamment l'enhancer en 3' du gène foetal  $\gamma^A$ , lequel a été mis en évidence par des

expériences de transfection transitoire dans des cellules érythroïdes (Bodine, et al., 1987). Toutefois, sa fonctionnalité n'a pu être confirmée *in vivo* (Liu et al., 1998, Gaensler et al., 2003). En effet, la déletion de cet élément (situé 750 bp en aval du gène  $\gamma$ ) dans le locus humain chez des souris  $\beta$ -YAC globine, n'a aucun effet sur l'expression du gènes de  $\beta$  globine du locus mutant (Liu et al., 1998, Gaensler et al., 2003).

#### 2.4.2.1.3 Les silencers

Outre les séquences d'activation des gènes on retrouve aussi des séquences associées à la répression à l'intérieur des gènes du locus de  $\beta$  globine. Ces séquences de régulation négative encore appelées silencers, présentes en 5' ou 3' des gènes ont donné naissance au concept de répression autonome (Autonomous silencing) des gènes du locus. Ce concept stipule que tous les éléments requis pour la répression du gène se trouvent dans les séquences adjacentes ou dans le gène lui-même (Raich et al., 1990). Des séquences participantes à la répression du gène embryonnaire  $\epsilon$  ont été identifiées dans son promoteur. En transgénèse, lorsqu'il est exprimé sous le contrôle du LCR en absence des autres gènes du locus, le gène  $\epsilon$  conserve sa régulation développementale normale (Raich et al., 1990; Raich et al., 1992). Son expression est strictement restreinte au sac vitellin lors de l'érythropoïèse embryonnaire. Des expériences de délétion de séquences en amont du gène ont permis l'identification de ses silencers.  $\epsilon$  n'est pas le seul gène de  $\beta$  globine régulé par le mécanisme de répression autonome. Les gènes fœtaux, bien que assujettis à d'autres mécanismes de répression, sont aussi sujets à la répression autonome mais de façon moins importante que le gène embryonnaire (Dillon and Grosveld, 1991; Li et al., 2004). Ainsi, chez les transgéniques LCR $\gamma$ , l'expression du gène fœtal est confinée au sac vitellin et foie fœtal (Dillon and Grosveld, 1991; Enver et al., 1990). Aucun mécanisme de répression autonome n'a été décrit pour le gène de la  $\beta$  globine adulte et ce bien qu'il puisse y avoir des silencers.

## 2.4.2.2 Les facteurs trans

### 2.4.2.2.1 Le complexe SWI/SNF

L'utilisation des souris transgéniques a révélé que la transcription des gènes ne se déroule que dans des régions décondensées de la chromatine, soit des régions d'euchromatine. Ces régions identifiables par leur sensibilité à la digestion par la DNase I, sont accessibles à la machinerie basale de transcription et autres facteurs transcriptionnels pour l'activation des gènes. Néanmoins, bien que l'ouverture de la chromatine soit requise pour la transcription des gènes, toutes les régions sensibles à la DNase I ne sont pas nécessairement transcrites. Il existe une grande variété de complexes protéiques impliqués dans le remodelage de la chromatine. Parmi ceux-ci figure le complexe SWI/SNF, constitué de diverses sous unités. Les sous unités du complexe SWI/SNF propres aux eucaryotes supérieures sont des protéines à domaine de type HMG. Les protéines HMG sont connues pour leurs propriétés de liaison à l'ADN et d'induction de changement conformation de l'ADN. La diversité de la composition des complexes SWI/SNF est responsable de la spécificité d'action du complexe en fonction des différents loci. Quoique de façon générale l'action des complexes de remodelage de la chromatine est de modifier la structure de la chromatine, leurs sous unités sont responsables soit du maintien de la structure condensée de la chromatine, soit du déplacement des nucléosomes, ce qui a pour effet de rendre accessible la chromatine aux facteurs transcriptionnels (Harju et al., 2002). Au niveau du locus de la  $\beta$  globine, le complexe SWI/SNF se lie aux régions riches en pyrimidine dans le promoteur des gènes humains et murins de  $\beta$  globine adultes. Cette activité de liaison du complexe SWI/SNF est restreinte aux cellules érythroïdes définitives (O'Neill et al., 1999). Dans la régulation des gènes de  $\beta$  globine, l'interaction du complexe SWI/SNF avec des facteurs transcriptionnels érythroïdes spécifiques influence la conformation de la chromatine du locus et la transcription des gènes de  $\beta$  globine (Armstrong et al., 1998). Ainsi, le complexe SWI/SNF qui a une activité histone déacétylase, est capable de déplacer les nucléosomes du promoteur du gène adulte de la  $\beta$  globine en fonction de son interaction

avec les facteurs transcriptionnels érythroïdes spécifiques (Armstrong et al., 1998; Bell and Felsenfeld, 2000). Cet ensemble de données révèle que le complexe SWI/SNF ouvrirait la chromatine du locus dans la région du promoteur du gène adulte pour permettrait la liaison des activateurs transcriptionnels de  $\beta$  globine adulte ( $\delta$  et  $\beta$ ).

#### Le complexe PYR

Le complexe PYR, une des sous unités de SWI/SNF, joue un rôle important dans la commutation de l'expression des gènes fœtaux ( $\gamma$ ) à adulte ( $\delta$  et  $\beta$ ) (Bank et al., 2005; O'Neill et al., 2000). Le complexe PYR possède deux activités régulatrices : une de régulation positive dépendante de son interaction avec le complexe SWI/SNF, et celle de régulation négative lorsqu'il est lié au complexe NURD, un complexe de répression transcriptionnelle (O'Neill et al., 2000). Le complexe PYR se trouve de façon préférentielle dans les cellules adultes hématopoïétiques, il se lie à une séquence de 250 bp riche en pyrimidine localisée dans la séquence intergénique entre  $\gamma$  et  $\delta$ . La protéine Ikaros, majoritairement exprimée dans les tissus hématopoïétiques adultes a été identifiée comme étant responsable de la liaison du complexe PYR à l'ADN (O'Neill et al., 2000). Chez l'humain les patients qui possèdent une délétion incluant cette région présentent un phénotype de type PHHF (Bank et al., 2005). Chez la souris transgénique, la délétion de 511 bp contenant la région riche en pyrimidine et les séquences avoisinantes retarde la commutation fœtale à adulte dans un contexte de locus entier (Enver et al., 1990; O'Neill et al., 1999). Les souris Ikaros<sup>-/-</sup> présentent un profil d'expression des  $\beta$  globines humaines similaire à celui observé lors de la délétion de la séquence de liaison riche en pyrimidine (Lopez et al., 2002). La région intergénique entre les gènes fœtaux et adultes pourrait jouer un rôle important dans la commutation des  $\beta$  globines fœtale à adulte et principalement dans l'activation du gène adulte de  $\beta$  globine chez l'humain.

#### 2.4.2.2.3 Activateurs transcriptionnels

##### NF-E2

NF-E2 est un facteur de transcription érythroïde spécifique appartenant à la famille des protéines de type "basic leucine zipper" (bZIP). NF-E2 lie deux régions situées en tandem dans le sous domaine actif du site HS2 du LCR. Il lie également des régions semblables dans les promoteurs des gènes de  $\beta$  globine (Andrews et al., 1993; Ney et al., 1990). Protéine hétérodimérique de 45 kDa, NF-E2 est constituée de deux sous unités : NF-E2 p45 propre au système hématopoïétique, dont l'expression est restreinte aux érythrocytes et mégakaryocytes (Andrews et al., 1993a; Ney et al., 1993), et NF-E2 p18 dont l'expression est ubiquitaire (Andrews et al., 1993b). L'importance de NF-E2 dans l'érythropoïèse et la régulation des gènes de  $\beta$  globine a été révélée grâce aux expériences de mutagenèse (Ney et al., 1990b; Talbot and Grosveld, 1991; Talbot et al., 1990). L'expression d'un dominant négatif de la sous unité p18 de NF-E2 dans les cellules érythroleucémiques murines (MEL), réduit l'expression des gènes de  $\alpha$  et  $\beta$  globine. Il en est de même pour les cellules MEL déficientes en p45 (Kotkow and Orkin, 1995; Lu et al., 1994). Ce phénotype est corrigé soit par l'addition de dimères NF-E2 p45/18, soit de molécules de p45 selon le cas. Toutefois, *in vivo* l'absence de NF-E2 n'entraîne pas la réduction drastique escomptée des  $\beta$  globines chez la souris. On observe cependant une légère chute du contenu en hémoglobine des érythrocytes, et le phénotype le plus drastique reste l'absence de plaquettes (Lecine et al., 1998; Shivdasani and Orkin, 1995). Les auteurs attribuent cette disparité des effets de NF-E2 entre la lignée mégakaryocytaire et érythrocytaire, à la présence *in vivo* d'une autre protéine capable de compenser pour les fonctions érythroïdes de NF-E2. Un facteur qui à l'évidence semble absent dans les cellules MEL. Par ailleurs des expériences de transfection ont démontré que NF-E2 est important pour l'activité enhancer du site HS2 du LCR (Armstrong and Emerson, 1996). La mutation du site de liaison de NF-E2 dans le LCR abolit son interaction avec HS2, et réduit ainsi sa capacité à activer le gène embryonnaire humain  $\epsilon$ . Des études *in vitro* ont démontré que



NF-E2 altérerait la structure de la chromatine en délocalisant les nucléosomes (Armstrong and Emerson, 1996). Le remodelage de la chromatine induit par NF-E2, aussi observé *in vivo*, facilite l'accès de HS2 aux facteurs trans tel que GATA-1 et permet ainsi l'activation transcriptionnelle des gènes de globines par HS2 (Gong et al., 1996).

### Les protéines GATA

GATA-1 est un facteur transcriptionnel important dans l'hématopoïèse. Il appartient à la famille des protéines à doigt de zinc, laquelle comprend six membres dont les trois premiers, GATA-1, GATA-2, GATA-3, ont un rôle dans l'hématopoïèse. Les membres de la famille GATA partagent en commun un domaine à doigts de zinc qui leur confère la capacité de lier l'ADN au niveau des motifs d'acides nucléiques WGATAR (Merika and Orkin, 1993; Tsai et al., 1991). Bien que capable de lier la même séquence consensus, les membres de la famille GATA présentent tous un profil d'expression distinct.

Le gène GATA-1, aussi connu sous les appellations GF-1 et NF-E1, est principalement exprimé dans les cellules érythrocytaires, les mégakaryocytes et dans les mastocytes (Martin et al., 1990; Sposi et al., 1992; Tsai et al., 1989). Des données rapportent aussi une expression abondante de GATA-1 dans les tubules séminifères chez la souris (Ito et al., 1993; Yomogida et al., 1994). Au cours du développement, l'expression de GATA-1 est régulée de façon différentielle dans l'hématopoïèse. Chez l'embryon, GATA-1 est exprimé faiblement dès la formation des îlots sanguins dans le sac vitellin, puis aux jours embryonnaires E12-15, son expression devient abondante dans le foie fœtal (Whitelaw et al., 1990). Le changement de niveaux d'expression de GATA-1 coïncide avec la commutation de l'expression des gènes fœtaux aux gènes adultes, reflétant ainsi son rôle dans l'activation des gènes adultes de type  $\beta$  globine. Au niveau du locus de la  $\beta$  globine, la séquence consensus (A/T)GAT(A/T)(A/G) de GATA-1 est retrouvée dans tous les promoteurs des gènes du locus, et dans les sites érythroïdes spécifiques d'hypersensibilité à

la DNase du LCR. Toutefois la liaison de GATA-1 n'est pas nécessairement liée à l'activation transcriptionnelle. En effet, GATA-1 peut fonctionner soit comme un activateur, soit comme un répresseur tout dépendant de la localisation de son site consensus et de son interaction avec les autres protéines. Ainsi lorsque GATA-1 se lie à la position -165 en amont du promoteur du gène embryonnaire humain  $\epsilon$ , il agit comme un activateur transcriptionnel (Gong et al., 1991). De même la liaison de GATA-1 dans le promoteur du gène adulte de  $\beta$  globine promouvoit la transcription du gène adulte (Weiss and Orkin, 1995; Yamamoto et al., 1997). La délétion hémizygote du gène codant pour GATA-1 chez les souris mâles GATA-1<sup>-</sup> entraîne une létalité *in utero* au jour embryonnaire E10.5-E11.5. Ce phénotype est dû à une absence d'hématopoïèse dans le sac vitellin et des défauts dans la différenciation érythroïde: les progéniteurs demeurent bloqués au stade proérythroblastique (Fujiwara et al., 1996; Weiss et al., 1994). Chez l'humain, les mutations antisens de GATA-1 causent soit une anémie dysérythropoïétique, soit une  $\beta$  thalassémie (Nichols et al., 2000; Yu et al., 2002). Par ailleurs, outre son rôle dans l'activation de l'expression des gènes de  $\beta$  globine, GATA-1 est nécessaire à la maturation érythroïde et donc au développement des érythrocytes définitifs. À cet effet, Mc Devitt a montré que des niveaux d'expression élevés de GATA-1 sont requis pour une maturation myéloïde complète (McDevitt et al., 1997). Parallèlement aux défauts dans la lignée érythrocytaire en absence de GATA-1, on observe aussi des défauts dans la maturation de la lignée mégakaryocytaire. Lesquels aboutissent à une hyperprolifération des mégakaryocytes primaires, et une réduction de la production de cellules matures, les plaquettes (Vyas et al., 1999). Le remplacement de GATA-1 par GATA-2 compense le défaut de maturation causé par l'absence de GATA-1 dans la lignée des mégakaryocytes mais pas chez les érythrocytes. De plus, GATA-2 et GATA-3 compensent le phénotype de létalité embryonnaire de souris GATA-1<sup>-</sup>. Néanmoins les souris qui survivent jusqu'à 6 mois demeurent anémiques et présentent de nombreux défauts de maturation de leurs globules rouges. La persistance de défaut dans l'érythropoïèse chez ces souris montre que GATA-2 peut remplacer partiellement GATA-1 lors de l'hématopoïèse périnatale, mais est

incapable de compenser complètement le rôle de GATA-1 lors de l'hématopoïèse adulte (Takashi et al., 2000). Autant GATA-1 est important pour l'érythropoïèse définitive chez l'adulte, autant GATA-2 est essentielle pour l'érythropoïèse primitive chez l'embryon. GATA-2 est fortement exprimée chez les précurseurs érythroïdes primitifs multipotents, puis plus tard au cours du développement, diminue pour être remplacée par GATA-1 (Dorfman et al., 1992; Jimenez et al., 1992). La perte de GATA-2 induit une anémie embryonnaire, dû à une déficience en cellules hématopoïétiques primitives, laquelle mène à la mort du fœtus aux jours embryonnaires 10-11 (Tsai et al., 1994). Par ailleurs GATA-2 agit comme un bloqueur de la stimulation de la différenciation érythroïde. Le maintien d'une expression élevée de GATA-2 dans les cellules hématopoïétiques primitives empêche la progression du processus de différenciation érythroïde (Persons 1999). Contrairement aux autres protéines GATA du système hématopoïétique, GATA-3 n'est pas présent dans les cellules érythroïdes. Son expression est restreinte aux lymphocytes T dans le système hématopoïétique. Les souris déficientes en GATA-3 meurent *in utero* aux jours embryonnaires E11-12 de défauts dans l'hématopoïèse fœtale et dans le système nerveux (Pandolfi et al., 1995). Tout comme GATA-2, GATA-3 compense aussi partiellement l'absence de GATA-1 lors de l'hématopoïèse adulte, mais de façon moins significative que GATA-2 (Takashi et al., 2000). Ainsi, bien que les facteurs GATA aient quelques fonctions en commun, ils ne sont toutefois pas fonctionnellement équivalents *in vivo*.

Plusieurs protéines ont été rapportées comme étant capables d'interagir physiquement avec GATA-1, en l'occurrence la protéine FOG-1, décrite comme le partenaire de GATA-1 dans l'hématopoïèse. La protéine FOG-1 possède six doigts de zinc et se lie au doigt de zinc en N-terminal de GATA-1 via 6 d'entre eux. La protéine FOG-1 est incapable de lier l'ADN. Au cours du développement, FOG 1 est co-exprimée avec GATA-1 dans l'hématopoïèse. FOG-1 peut stimuler ou inhiber l'activité de GATA-1 selon le type cellulaire ou le promoteur (Wang et al., 2002). L'interaction physique de GATA et de son cofacteur FOG-1 est essentielle pour le développement d'une érythropoïèse et mégakaryopoïèse normale (Fujiwara et al., 1996; Tsang et al., 1997; Wang et al., 2002).

L'interaction du complexe GATA-1/FOG-1 avec le promoteur du gène adulte de la  $\beta$  globine de souris,  $\beta$  majeur, est nécessaire pour la formation d'une structure transcriptionnelle active (Vakoc et al., 2005). Ainsi GATA-1 stimule le rapprochement de séquences de régulation distales, soit le LCR et le promoteur de la  $\beta$  majeur. La liaison de FOG-1 à GATA-1 est nécessaire pour l'initiation de ce changement de structure de la chromatine. Des mutations naturelles des sites de GATA nécessaires à la liaison de FOG-1 diminuent la liaison de celui-ci à GATA-1 et par conséquent l'activation de la  $\beta$  globine adulte par GATA-1 (Crispino et al., 1999). Les souris déficientes en FOG-1 présentent le même phénotype létal que les souris GATA-1<sup>-</sup> (Tsang et al., 1998; Tsang et al., 1997). L'analyse des souris et cellules déficientes en FOG-1 démontrent des défauts aussi bien dans la maturation des érythrocytes que dans celle des mégakaryocytes (Tsang et al., 1998). Toutefois, le fait que les défauts dans la mégakaryopoïèse en absence de FOG-1 soient plus importants que ceux en absence de GATA-1, suggère que FOG-1 joue aussi un rôle indépendant de GATA-1 dans la mégakaryopoïèse (Cantor and Orkin, 2002).

#### Le facteur transcriptionnel EKLF

Les facteurs de transcription de type Krüppel KLFs (Krüppel like factor) sont une famille de protéines à trois doigts de zinc qui lient l'ADN aux niveaux des séquences CCACACCCT (Bieker, 2001; Philipsen and Suske, 1999). Plusieurs protéines de type KLF sont exprimées dans les cellules érythroïdes au cours du développement. Le facteur transcriptionnel érythroïde spécifique EKLF ou EKLF1 (Erythroid Krüppel like factor) a été le premier à être identifié. Faiblement exprimé dans les mastocytes, EKLF est principalement présent dans les cellules érythroïdes (Miller and Bieker, 1993). EKLF est actif de façon prédominante au stade adulte et active de façon spécifique le gène de  $\beta$  globine adulte. EKLF se lie huit fois plus fortement à la boîte CACCC du promoteur du gène adulte de la  $\beta$  globine, qu'à celle de la  $\gamma$  globine, pour activer préférentiellement

l'expression de ce dernier (Donze et al., 1995). La mutation de cet élément réduit l'expression du gène de  $\beta$  globine adulte (Feng et al., 1994). Les souris  $EKLF^{-/-}$  déficientes présentent une hématopoïèse embryonnaire normale tandis qu'elles développent une anémie quantitative de l'hémoglobine, semblable à la  $\beta$  thalassémie, au cours de l'hématopoïèse adulte (Perkins et al., 1995). La mort prématurée de ces souris au jour embryonnaire E14, lors de la commutation protéique des  $\beta$  globines fœtales à adultes, est dû en partie à l'absence de  $\beta$  globines adultes (Nuez et al., 1995). En effet, bien qu' $EKLF$  soit surtout connu pour son rôle dans la régulation des gènes adultes de  $\beta$  globine, des données récentes supportent une action à plus large spectre d' $EKLF$  dans l'érythropoïèse. Entre autre  $EKLF$  est requis pour la différenciation terminale des érythrocytes laquelle prend place autant lors de l'érythropoïèse primitive que définitive (Hodge et al., 2006). En effet, chez les souris  $EKLF^{-/-}$  les érythrocytes primitifs du sac vitellin présentent des défauts membranaires et du cytosquelette (Drissen et al., 2005). La persistance de ces défauts chez les souris  $EKLF^{-/-}$ , après correction du déséquilibre du ratio des  $\alpha$  et  $\beta$  globines (Perkins et al., 2000), soutient qu' $EKLF$  régule l'expression des gènes érythroïdes critiques pour l'érythropoïèse primitive et définitive. Ainsi donc l'effet d' $EKLF$  sur d'autres gènes érythroïdes, importants pour l'intégrité de la membrane du globule rouge, et de la synthèse de l'hème contribue à la sévérité du phénotype des souris d' $EKLF^{-/-}$  (Drissen, 2005).

Par ailleurs, des données récentes suggèrent que  $EKLF$  requiert la présence du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF pour réguler la transcription de manière tissu spécifique (Armstrong et al., 1998; Cantor and Orkin, 2002). Le recrutement par  $EKLF$  de la sous unité E-RC1 du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF promouvoit l'ouverture de la chromatine dans le promoteur de la  $\beta$  globine adulte lors de l'érythropoïèse définitive (Armstrong et al., 1998). En outre,  $EKLF$  semble aussi avoir un rôle dans le maintien de la structure de la chromatine du locus de  $\beta$  globine. À cet effet, la stimulation de la formation du site 5'HS3 du LCR a été décrite comme une action restreinte à  $EKLF$  (Gillemans et al., 1998; Tewari et al., 1998; Wijgerde et al., 1996). Car les autres facteurs de la famille KLF tel que SP1, qui lie aussi la boîte CAC du 5'HS3, sont

incapables de promouvoir cet effet au niveau de HS3 (Lee et al., 1999). En absence d'EKLF on observe la perte de la sensibilité à la DNase I au promoteur de la  $\beta$  globine, et chez les HSs du LCR (Goodwin et al., 2001). Ceci reflète un domaine chromatinien condensé ayant un potentiel minime de transcription. Ces données révèlent qu'EKLF est essentielle à l'activation du gène adulte de la  $\beta$  globine lors de l'érythropoïèse définitive.

#### KLF2/FKLF

En 2005, Basu a démontré que la protéine KLF2 est impliquée dans la régulation des gènes de  $\beta$  globines lors de l'érythropoïèse embryonnaire/fœtale. KLF2 régule positivement l'expression de la  $\beta$  globine embryonnaire  $\epsilon$  (Asano et al., 2000; Basu et al., 2005). La délétion de KLF2 cause uniquement une réduction de l'expression de la globine embryonnaire et n'affecte pas celle des gènes adultes de  $\beta$  la globine. Les souris présentent une anémie sévère et décèdent à E12.5 d'une hémorragie intraembryonnaire (Basu et al., 2005). FKLF est un autre facteur de transcription des gènes fœtaux apparenté à KLF2. Asano a démontré que dans les cellules K562, FKLF est impliquée dans l'activation de  $\epsilon$  et  $\gamma$  globine. FKLF activerait  $\gamma$  globine via la boîte CAC du promoteur de  $\gamma$  globine et non via le HS2 (Asano et al., 1999). Il n'est toutefois pas établi que la protéine FKLF est un activateur essentiel de  $\gamma$  globine *in vivo*.

#### 2.4.2.2.4 Les répresseurs transcriptionnels

La commutation des gènes de  $\beta$ globine au cours du développement suggère que le locus est contrôlé par des activateurs et possiblement par des répresseurs transcriptionnels. Ces répresseurs seraient en partie responsables de l'inactivation stade spécifique des gènes de  $\beta$  globine au cours du développement. Des expériences d'hybridation soustractive et d'analyse de délétion de séquences dans les promoteurs des gènes de  $\beta$  globine, ont permis de mettre en évidence plusieurs régions impliquées dans la répression des gènes du locus de  $\beta$  globine ainsi que l'identification des facteurs trans qui y sont associés.

## YY1, GATA-1

Des expériences de transfections de séquences en amont du promoteur du gène  $\epsilon$ , dans les cellules érythroleucémiques humaines K562, ont permis de mettre à jour une séquence de régulation négative (Cannio et al., 1991; Cao et al., 1989). Plus tard, Raich et ses collègues ont démontré que la délétion de cette région (-392 -177 bp) résulte en une persistance de l'activation du gène embryonnaire au stade adulte chez les souris transgéniques (Raich et al., 1992). L'implication de la protéine ubiquitaire YY1 dans la régulation d' $\epsilon$  via ce motif a été révélée par des expériences de mutagenèse. La délétion de ses motifs de liaison dans la région -269 bp en amont du promoteur  $\epsilon$  cause le maintien de l'expression du gène embryonnaire au stade adulte. Par ailleurs, des expériences de transfection et retard sur gel ont révélé que la liaison de GATA-1 au promoteur d' $\epsilon$ , près de cette région contribue à la répression du gène embryonnaire humain. En effet la délétion du site de GATA-1 à -201 bp du promoteur de  $\epsilon$  reproduit le même phénotype que celui de la mutation des sites de liaison de YY1 (Raich et al., 1995). En utilisant une construction de GATA-1 humain (hGATA-1) dont l'expression est restreinte aux cellules érythroïdes, Li a montré que GATA-1 participe à la répression du gène  $\epsilon$  en fonction de la localisation de son site de liaison (Li et al., 1997). Chez les souris transgéniques  $\beta$ -YAC globine, exprimant le locus entier humain de gènes de  $\beta$  globine, l'expression abondante de hGATA-1 à tous les stades de développement ne réduit significativement que l'expression du gène humain  $\epsilon$  au stade embryonnaire (Li et al., 1997). Il est intéressant de remarquer bien que GATA-1 humain réprime la  $\beta$  globine embryonnaire humaine, il est incapable de réprimer son homologue murin, soit le gène  $\epsilon^y$ ; lequel a par la suite été décrit comme exempt de site GATA-1 à la position -208 en amont de son promoteur, position à laquelle hGATA-1 médie son effet de répression sur le gène humain  $\epsilon$ .

## DRED, COUP-TF2

La protéine DRED (direct repeat erythroid definitive) qui est constituée de deux sous unités TR2 et TR4 de la famille des récepteurs nucléaires orphelins, lie les séquences DR1 dans le promoteur de  $\epsilon$  (Tanabe et al., 2002). La liaison de DRED au promoteur empêche la liaison d'EKLF au gène embryonnaire  $\epsilon$  de globine (Tanimoto et al., 2000). Cette absence d'activation du promoteur empêche l'expression du gène  $\epsilon$  lors de l'érythropoïèse définitive. Il a en effet été établi que les séquences DR1 liées par DRED sont situées à proximité de la boîte CAAT que lie le facteur EKLF dans les promoteurs des gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$  globine (Tanimoto et al., 2000). En outre, les mutations de la séquence de régulation négative à laquelle se lie le facteur DRED dans le promoteur du gène embryonnaire, abolissent la répression du gène chez la souris transgénique adulte. Un autre membre de la famille des récepteurs nucléaires orphelins, participe à la formation d'un complexe de répression dans les promoteurs des gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$  globine : le facteur COUP-TF2. La protéine COUP-TF2 encore appelée NF-E3 est exclusivement exprimée dans les cellules érythroïdes embryonnaires (Filipe et al., 1999). Son expression abondante lors de la commutation de l'expression des globines embryonnaires à adultes et les sites de liaison en commun avec la protéine DRED, ont permis de postuler que COUP-TF2 participe avec le facteur DRED au maintien de la répression de ces gènes au stade développemental approprié.

## Sox 6

Récemment il a été rapporté que la protéine Sox 6, une protéine de type HMG (high mobility group) participait à la répression développementale du gène embryonnaire  $\epsilon$  au stade adulte (Yi et al., 2006). La protéine Sox 6 est un membre de la famille des facteurs de transcription Sox qui ont en commun le domaine conservé de liaison à l'ADN *sry* (Sinclair et al., 1990). La famille de protéines de type HMG à laquelle appartient Sox 6 joue d'importants rôles dans le maintien de la structure de la chromatine. Ainsi la liaison de la



protéine Sox 6 au feuillet mineur de l'ADN induit une torsion de l'ADN d'un angle de 70-85°, entraînant un changement local de la conformation de la chromatine (Connor et al., 1994; Ferrari et al., 1992). Récemment il a été démontré que Sox 6 joue un rôle important dans l'érythropoïèse définitive (Cohen-Barak et al., 2007; Dumitriu et al., 2006; Yi et al., 2006). Les souris déficientes en Sox 6 développent une érythropoïèse inefficace et un défaut de maturation, révélant ainsi l'importance de Sox 6 pour la survie et la maturation terminale des cellules érythrocytaires (Dumitriu et al., 2006). Par ailleurs, il a été démontré que Sox 6 réprime le gène embryonnaire murin de  $\beta$  globine,  $\epsilon^y$ , lors de l'érythropoïèse définitive en se liant directement à deux sites consensus -68 et -23 bp dans le promoteur de la  $\beta$  globine embryonnaire  $\epsilon^y$  (Yi et al., 2006). L'inactivation érythroïde spécifique de Sox 6 cause la persistance de l'expression d' $\epsilon^y$  lors de l'érythropoïèse définitive au stade adulte (Cohen-Barak et al., 2007).

## 2.5 BP1

Plusieurs répresseurs et activateurs transcriptionnels ont été associés au locus de  $\beta$  globine au cours du développement, mais peu est connu à propos de facteurs associés à la répression du gène de  $\beta$  globine adulte durant l'érythropoïèse fœtale. Récemment des expériences en culture cellulaire ont mis en évidence pour la première fois un facteur qui régule négativement l'expression des gènes de  $\beta$  globines adultes chez l'humain, soit le facteur transcriptionnel humain BP1 (beta protein 1)(figure 7)(Berg et al., 1989; Ebb et al., 1998).

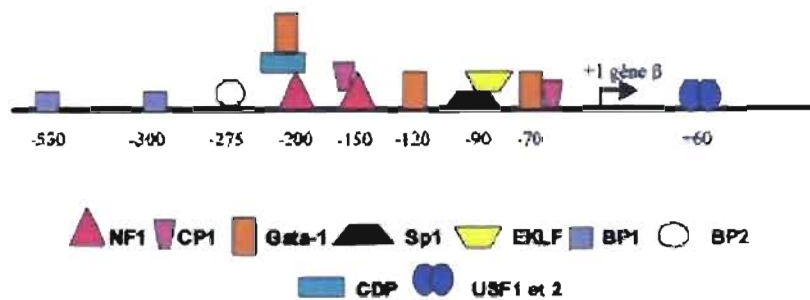


Figure 7: Représentation schématique des facteurs transcriptionnels du promoteur du gène adulte de  $\beta$  globine.

Tiré de Beaudoin, 2003.

### 2.5.1 Organisation et structure

La protéine homéotique BP1 a été décrite pour la première fois dans les cellules érythroleucémiques humaines K562, des cellules érythroïdes de type embryonnaire /fœtal qui n'expriment pas de  $\beta$  globines adultes (Dean et al., 1983; Rutherford et al., 1981). BP1 humain est membre de la famille des gènes à homéoboîte, et appartient précisément à la sous famille des gènes *distal-less* (*DLX*) (Chase et al., 2002). La famille des gènes *DLX*

humain est proche parent des gènes *distal-less* (*Dll*) de la drosophile importants pour le développement des pattes et des antennes de l'insecte (Cohen et al., 1989; Lewis, 1978). Tout comme chez la drosophile, les gènes *distal-less* sont importants pour la morphogénèse. Chez l'humain et la souris les gènes *DLX* sont organisés en loci bigéniques, on compte donc six membres répartis en trois paires de gènes *DLX* (*DLX* 1-6) (tableau 1). Les deux gènes partageant le même locus sont transcrits de façon convergente (Nakamura et al., 1996; Simeone et al., 1994). Chaque gène *DLX* possède une organisation de trois exons et deux introns. L'homéodomaine partagé entre le deuxième et le troisième exon est fortement conservé à travers toutes les espèces paralogues et les homologues de type *DLX* (Panganiban and Rubenstein, 2002). La région intergénique contient des éléments de régulation communs aux deux gènes. Il est intéressant de noter que chacune des paires de gènes *DLX* humains et murins est associée à un locus de gènes *HOX* (Nakamura et al., 1996; Rossi et al., 1994; Simeone et al., 1994) (tableau 1), des gènes à homéoboîte qui jouent aussi d'importants rôles dans le développement et l'hématopoïèse (van Oostveen et al., 1999).

Tableau I: Nomenclature des gènes *Dlx* et gènes *Hox* associés

Espèces	Paires de gènes <i>Dlx</i>		Gènes <i>Hox</i> associés
	Humain	Souris	
	<i>DLX 1/DLX2</i>	<i>Dlx 1/Dlx2</i>	Hoxa
	<i>DLX7*/DLX3</i>	<i>Dlx7**/Dlx3</i>	Hoxb
	<i>DLX6/DLX5</i>	<i>Dlx6/Dlx5</i>	Hoxd

\* Autres noms de *DLX7* chez l'humain: *DLX4*, \*\**DLX8*; Autre synonyme de *Dlx7* chez la souris : *Dlx4*.

Chez l'humain, la protéine BP1 est codée par le gène *DLX4* encore appelé *DLX7* localisé sur le chromosome 17 à la position 17q. Le gène *DLX4* est situé dans le même locus que le gène *DLX3*, les deux gènes sont liés du côté télomérique du chromosome au locus de gènes HOXB (Nakamura et al., 1996). *DLX3/DLX4* partagent des éléments de régulation positive au niveau de leur séquence intergénique commune (Sumiyama et al., 2002). Le locus bigénique humain *DLX3/DLX4* est similaire en organisation et en structure à celui de la souris. Les deux loci comportent plusieurs séquences conservées dans les régions non codantes des gènes ainsi que l'homéoboîte des gènes. Chez la souris, le gène *Dlx4* murin partage 69 % d'homologie avec son homologue humain (Sumiyama et al., 2002). Bien qu'aucun homologue murin de BP1 humain n'ait été formellement identifié, des analyses de séquences révèlent que le gène *Dlx4* murin partage une homologie de 88% avec le cDNA de BP1 humain (Chase et al., 2002; Nakamura et al., 1996).

### 2.5.2 Expression et fonction

Chez la souris, les gènes *Dlx3/Dlx7* sont exprimés très tôt dans le placenta au jour embryonnaire E8.5. Contrairement aux autres paires de gènes *Dlx*, les gènes *Dlx3/Dlx7* ne sont pas exprimés dans le système nerveux central de la souris. Chez la souris l'expression de *Dlx* est nécessaire pour la survie embryonnaire, la délétion de *Dlx3* entraîne des défauts importants dans le placenta et conduit à la mort des souris *Dlx3* déficientes au jour embryonnaire E10.5 (Morasso et al., 1999). La carence en *Dlx3* est aussi associée à une réduction significative des  $\alpha$  et  $\beta$  globines embryonnaires (Han et al., 2007). L'incapacité de *Dlx7* à compenser pour le phénotype létal embryonnaire des souris *Dlx3* déficientes illustre le fait que les deux gènes bien qu'ayant un profil d'expression similaire possèdent des fonctions distinctes au niveau du placenta. Chez l'humain, la mutation dans le gène *DLX3* qui cause le syndrome tricho-dento osseux (TDO), qui affecte la morphogenèse des dents, du crane et des cheveux, supporte aussi le fait que les deux gènes aient des fonctions

exclusives (Price et al., 1999). Le gène *DLX4* humain possède trois isoformes : BP1, *DLX4*, *DLX7* (figure 8) (Nakamura et al., 1996; Quinn et al., 1997). Les trois transcrits partagent une forte homologie de séquence en 3', mais diffèrent en leurs extrémités 5' (Chase et al., 2002; Fu et al., 2001).

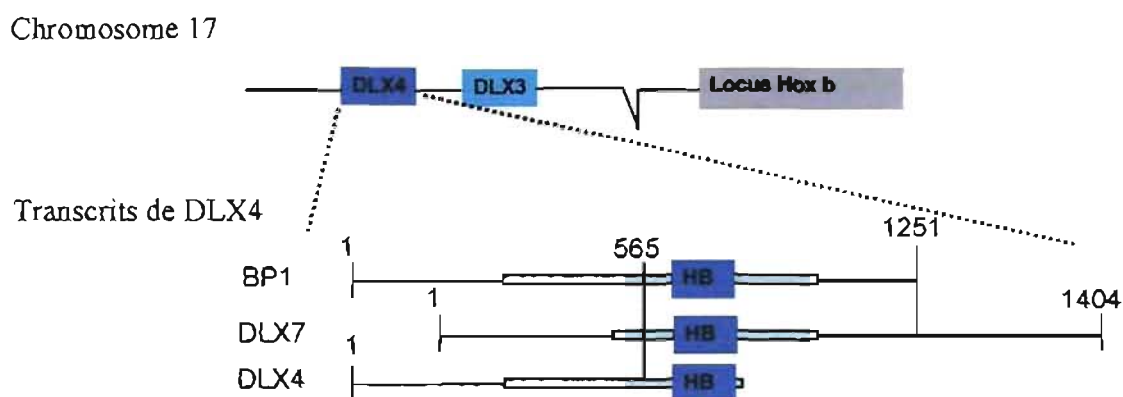


Figure 8: Organisation des loci des gènes DLX 3/4 et Hoxb humains et représentation des transcrits du gène humain DLX4

Dans les tissus normaux humains, BP1 est abondamment exprimé dans le placenta, le foie fœtal, les reins et à une intensité moindre dans les cellules CD34<sup>+</sup> de la moelle osseuse de souris adulte (Chase et al., 2002; Haga et al., 2000). Aucune fonction ne lui a été attribuée dans les tissus non érythroïdes. Cependant son expression abondante dans le foie fœtal, site hématopoïétique où les gènes de  $\beta$  globines adultes sont relativement absents, suggère un rôle dans la régulation négative des gènes adultes de  $\beta$  globine humaine au cours du développement. C'est d'ailleurs dans des cellules humaines (K562) qui n'expriment pas de  $\beta$  globine adulte qu'il a été découvert 1989 (Berg et al., 1989). De nombreuses observations supportent son rôle comme répresseur de gènes de  $\beta$  globine. Ainsi en utilisant un modèle cellulaire de différenciation érythroïde des cellules MB-O2,

Chase a montré que BP1 est abondamment exprimé en absence de  $\beta$  globine, et son expression est régulée à la baisse lors de la commutation des globines fœtales-adulte (Chase et al., 2002).

Les protéines à homéodomaine sont connues pour leur capacité à moduler la transcription des gènes en se liant à l'ADN via leur homéodomaine en N-terminale (Chase et al., 2002; van Oostveen et al., 1999), la région C-terminale étant réservée à l'interaction avec des protéines partenaires. Ainsi en évaluant l'affinité de liaison de la protéine BP1 à des oligonucléotides dégénérés correspondant à différentes régions du promoteur du gène humain de  $\beta$  globine adulte, Berg et al. ont établi la séquence (A/T)T(A/C)(A/T)ATATG comme le site consensus de BP1 (Berg et al., 1989). *In vitro* BP1 agit en liant deux silenciers dans le promoteur du gène humain de  $\beta$ -globine adulte SI (-530bp) et SII (-300 bp). BP1 est également capable de lier le promoteur du gène humain de  $\delta$  globine. Des données d'alignements de séquences suggèrent l'existence d'un potentiel site de liaison de BP1 dans le promoteur du gène murin de la  $\beta$  globine adulte,  $\beta$ -majeur (Berg et al., 1989). Dans les cellules humaines K562, la transfection du silencer SI en amont de gènes rapporteurs révèle que BP1 induit une réduction significative de la transcription de ces gènes. En outre la réactivation de la  $\beta$  globine adulte lors de l'inhibition par antisens du messenger de BP1 dans les cellules K562, défend davantage l'implication de BP1 dans la répression transcriptionnelle de la  $\beta$  globine adulte *in vitro* (Zoueva and Rodgers, 2004). Ces études en culture cellulaire suggèrent fortement que BP1 est le premier membre de la famille des gènes humains *DLX* de site consensus connu, ayant un rôle dans la régulation des gènes humains de  $\beta$  globine adulte. *DLX7*, contrairement à son isoforme BP1, bien qu'exprimé dans les cellules K562 et capable de lier les silenciers SI et SII, est incapable de réprimer les gènes humains de  $\beta$  globines adulte (Fu et al., 2001; Shimamoto et al., 1997; Shimamoto et al., 2000). Il semble donc que bien qu'étant co exprimé dans des tissus érythroïdes (la moelle osseuse) avec BP1, *DLX7* ait des fonctions distinctes (Ferrari et al., 2003; Haga et al., 2000). *DLX7* aurait plutôt des propriétés antiapoptotiques. Ainsi l'inhibition de l'isoforme *DLX7* par oligonucléotide antisens dans les cellules K562, réduit

l'efficacité d'ensemencement et augmente l'apoptose (Shimamoto et al., 1997). Par ailleurs, d'autres protéines à homéoboîte liant des régions riches en AT ont aussi été décrites dans l'hématopoïèse (van Oostveen et al., 1999). Les gènes HOX B2 ont été rapportés comme des antagonistes de la maturation érythroïde. Leur inhibition stimule la maturation érythroïde dans les cellules HEL (Leucémie érythroïde humaine) (Mathews et al., 1991). Par ailleurs, Shen et al ont montré que la surexpression des gènes HOX B2 dans les cellules K562 entraîne une réduction de l'expression des gènes de  $\alpha$  et  $\beta$  globine (Shen et al., 1992).

### **2.5.3 BP1 et les protéines HMG**

La présence de deux sites de liaison de BP1 dans le promoteur du gène de la  $\beta$  globine a soulevé la possibilité que la protéine BP1 puisse fonctionner en dimères. La détection sur gel de plusieurs bandes suite à l'incubation d'extraits nucléaires de cellules K562 avec la séquence consensus de BP1 supporte cette hypothèse (Berg et al., 1989; Chase et al., 2002). Cependant, à ce jour aucune protéine partenaire de BP1 n'a été identifiée. Toutefois, plusieurs auteurs ont rapporté que des sites de liaison des protéines de type HMG (High mobility group) chevauchent les sites de liaison de BP1 dans le promoteur de  $\beta$  globine (Chase et al., 1999; Drew et al., 2000). Les protéines de type HMG sont impliquées dans le remodelage de la chromatine (Thomas, 2001; Thomas and Travers, 2001; Wolffe, 1999). Leur liaison au sillon mineur de l'ADN induit une torsion de celui-ci, qui favorise le rapprochement de séquences distales. Ce changement de conformation de l'ADN promouvoit la formation de complexes nucléoprotéiques actifs en favorisant l'interaction entre facteurs transcriptionnels localisés sur des régions éloignées (Friedmann et al., 1993). Il a d'ailleurs été rapporté qu'*in vitro* les protéines architecturales, HMG1 et 2 lient trois sites dans le promoteur de la  $\beta$  globine, dont deux des sites chevauchent ceux de BP1 (Drew et al., 2000). La liaison de ces protéines induit une torsion dans le promoteur de la  $\beta$  globine adulte. Plus intéressant encore, la mutation d'un site HMG1+2 dans le

promoteur de  $\beta$  globine, à l'extérieur des silencers SI et SII de BP1, supprime la répression des gènes de  $\beta$  globine adultes dans les cellules K562 (Drew et al., 2000). Cette réactivation des gènes est observée même en présence de la liaison des SI et SII non mutés par la protéine BP1. D'autres protéines HMG, HMG I et Y se lient au silencer I (-530 bp) de BP1 et induisent une courbure dans l'ADN (Chase et al., 1999). Bien qu'elles soient exprimées de façon ubiquitaire, leur régulation à la baisse lors de la différenciation érythroïde des cellules hématopoïétiques primaires, suggèrent un rôle dans la régulation des gènes érythroïdes (Chase et al., 1999). Les protéines HMG ont été rapportées dans la régulation de nombreux gènes, soit pour l'activation, soit pour la répression (Du and Maniatis, 1994; Verrier et al., 1997). Récemment la protéine HMG, SOX 6 a été décrite comme répresseur du gène de  $\beta$  globine embryonnaire  $\epsilon$  (Cohen-Barak et al., 2007; Yi et al., 2006). Chez la drosophile, la protéine de type HMG, DSP1 réprime la transcription de gènes en se liant directement au facteur général de la transcription TBP (protéine qui lie la boîte TATA) et forme ainsi un complexe ternaire stable entre TBP et l'ADN (Kirov et al., 1996; Lehming et al., 1998; Sutrias-Grau et al., 1999). Cette liaison de DSP1 à TBP empêche l'interaction de TBP et de TFIIA et bloque ainsi la formation du complexe général de transcription.

#### 2.5.4 Régulation des gènes *Dlx*

Plusieurs protéines et événements post traductionnels modifient l'activité transcriptionnelle des protéines *Dlx*. Chez la souris, l'interaction *in vitro* de la protéine homéotique Msx avec l'homéodomaine des protéines *Dlx*, régule négativement leur fonction (Zhang et al., 1997). La séquestration de l'homéodomaine des protéines *Dlx* par Msx, les rend inaptes à lier l'ADN (Merlo et al., 2000; Zhang et al., 1997). La phosphorylation est aussi connue pour activer ou inhiber l'activité des gènes *Dlx*. La phosphorylation de *Dlx3* murin par la kinase PKC diminue son affinité de liaison pour l'ADN (Park et al., 2001). L'activité transcriptionnelle du facteur érythroïde spécifique,



EKLF est aussi régulée par phosphorylation, via la kinase CKII (Ouyang et al., 1998). La kinase CKII a été rapportée comme étant capable de phosphoryler les protéines à homéodomaine et d'augmenter ainsi leur affinité de liaison (Kasahara and Izumo, 1999). L'analyse détaillée de BP1 révèle que la protéine possède des résidus phosphorylables en C-terminale de l'homéoboîte (Chang, 1995), ce qui ouvre la possibilité à une régulation de son activité par la phosphorylation.

## **Objectif**

Compte tenu de l'impact de BP1 sur le gène humain de la  $\beta$  globine adulte *in vitro* et de son profil d'expression dans le tissu hématopoïétique, mon objectif de maîtrise est de caractériser le rôle de BP1 dans la régulation des gènes adulte de  $\beta$  globine et au cours de l'érythropoïèse.



## Chapitre II

### Article

# BP1 IS A NEGATIVE MODULATOR OF DEFINITIVE ERYTHROPOIESIS

Marthe-Sandrine Eiyimo Mwa Mpollo<sup>1</sup>, Mélissa Beaudoin<sup>1</sup>, Patricia E. Berg<sup>2</sup>, Hugues Beauchemin  
Vivette D'Agati<sup>3</sup>, Marie Trudel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Molecular Genetics and Development, Faculté  
Médecine de L'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

<sup>2</sup>The George Washington University Medical Center, Dept. of Biochemistry and Molecular Biology,  
Washington, D.C.

<sup>3</sup>College of Physicians and Surgeons of Columbia U., Dept of Pathology, New York, N.Y.

**Nucleic Acids Research, Volume 34, Numéro 18, 2006. Pages: 5232-5237**

The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be  
regarded as joint first authors. \*To whom correspondence should be addressed: [information retirée /  
[information retirée / information withdrawn]; Email: [information retirée / information  
[information retirée / information withdrawn]

Received August 14, 2006; Revised September 1, 2006; Accepted September 5, 2006

## Abstract

BP1, a human homeotic transcription factor, is expressed during hematopoiesis in the erythroid lineage. To determine the *in vivo* role of BP1 in erythropoiesis, we have undertaken two complementary approaches using enforced BP1 expression in both transgenic mice and embryonic stem (ES) cells. Despite repeated attempts, only one adult transgenic BP1 founder mouse among 121 mice was obtained. This mouse presumably survived due to transgene mosaicism because the transgene could not be transmitted. This mouse expressed BP1 and displayed splenomegaly, extramedullary erythropoiesis, and severe amyloidosis A in the kidney, a phenotype compatible with thalassemia. Consistently, the presence of BP1 transgene in fetuses was associated with paleness and lethality. In ES cells, BP1 expression in primary differentiation appeared to antagonize adult  $\beta$ -globin expression. In secondary differentiation, BP1 expression reduced significantly  $\beta$ -globin gene expression in both primitive and definitive erythroid cells, whereas it impaired only the definitive erythroid cell differentiation. These studies showed that BP1 can negatively modulate adult  $\beta$ -globin gene expression and definitive erythroid cell differentiation, and suggest that BP1 could play a role in thalassemia.

## **Introduction**

The transcription factor beta protein 1 (BP1) is a member of the homeobox gene family and the distal-less subfamily. The expression of BP1 is highly tissue-specific and developmentally restricted. Among 50 human tissues, BP1 was highly expressed in placenta, kidney and at lower levels in fetal liver (1). Such restricted pattern of expression is compatible with a specific gene function in development and/or differentiation.

In transient transfection studies, BP1 protein appears to act as a repressor of the human adult  $\beta$ -globin gene, through two silencers upstream of the  $\beta$ -globin gene (1-3). In addition, BP1 protein was shown to bind to negative control regions upstream of the adult  $\beta$ -globin gene and the murine  $\beta$ major globin gene (4). The clinical relevance of BP1 is supported by the inverse correlation between the binding affinity of BP1 protein to polymorphic DNA sequences associated with sickle cell disease (SCD) (5). We found that DNA with stronger BP1 binding in the Indian-Arabo haplotype, or weaker BP1 binding, as in the Bantu haplotype, have respectively reduced or increased clinical evidence for red blood cell sickling. Taken together, these studies support the hypothesis that BP1 is a physiologic repressor of  $\beta$ -globin gene expression.

A role for BP1 in bone marrow hematopoiesis is also emerging. BP1 is expressed in purified CD34<sup>+</sup> hematopoietic bone marrow cells, a primitive subpopulation of human hematopoietic cells, and its expression decreases to undetectable levels during terminal erythropoiesis(1,6). Enforced expression of BP1 in embryonic/fetal erythroid K562 cells leads to decreased erythroid differentiation potential, while ectopic expression of BP1 increases clonogenicity, suggesting a role for BP1 in leukemogenesis. In fact, expression of BP1 was detected in 63% of primary leukemia blasts from AML patients and in 32% of leukemic blasts from T-ALL patients (6).

The aim of this study was to determine the role of BP1 in erythroid differentiation of transgenic mice and in totipotent embryonic stem (ES) cells. In ES cells constitutively expressing BP1, we demonstrate marked repression in the generation of definitive erythroid ( $E^d$ ) cells with no effect on growth of the ES-derived embryoid bodies (EB) or in primitive erythroid ( $E^p$ ) cells. Moreover, expression of BP1 in definitive erythroid cells in transgenic mice appears incompatible with survival.

## Materials and Methods

### *Constructs*

The LCRBP1 construct was produced in p-Bluescript vector by joining the human  $\beta$ -globin promoter to the 1.1 kb BP1 cDNA (7). Subsequently, the human  $\beta$ -globin 8 kb mini LCR (8) was linked upstream and the human 2.8kb  $\beta$ -globin 3' sequences consisting of 18bp of exon 2, all of exon 3, and 3' flanking sequences were adjoined downstream. The LCR $\Delta$ BP1 construct was identical to LCRBP1 but without the BP1 cDNA. A 12 kb Sal I-Not I fragment was purified from LCRBP1 to generate transgenic mice in (C57Bl/6J X CBA/J)F2 mouse strains as described (8).

### *Cell culture and differentiation*

CCE-ES cells (kind gift Dr. G. Keller, NY) were maintained as previously described (9). ES cells were co-electroporated (10) using equivalent molar ratios of the LCRBP1 or LCR $\Delta$ BP1 and the pSV3neo vector and selected with G418 (400  $\mu$ g/ml). DNA from several independent subclones was analyzed by Southern with two restriction digests, Sal I/Eco RI and Sal I/Bam HI, and a BP1- $\beta$ -globin probe to verify contiguous integrity. Conditions for erythroid differentiation consist of SCF (100ng/ml), IL-3 (5ng/ml) and Epo (2U/ml) (11).

### *RNA extraction and expression analysis*

Total RNA was isolated from ES cells using Trizol reagent (Invitrogen). cDNA synthesis was performed for E<sup>p</sup> and E<sup>d</sup> samples by two successive series of oligo dT-primers and PCR amplification; for EB samples, one µg of RNA was used as described previously (12). Semi-quantitative expression analysis for the BP1 transgene and βmajor genes were carried out with the following primers: for BP1, forward 5'-TGGAGCCTGGTATCAGCATC-3' and reverse 5'-TGGACAGCAAGAAAGCGAGC-3' (in exon 3 β-globin gene) producing an amplicon of 417 bp; for β-globin, forward 5'-GGACCCAGCGGTACTTTGATAG-3' (exon 2) and reverse 5'-GTGGCCCAGCACAAATCACGAT-3' (in exon 3) generating a 239 bp product. S16 ribosomal primers were previously described (13). Conditions for BP1 amplification were 94° C, 30 s, 57° C, 30 s, 72° C, 30 s for 30 cycles; conditions for β-globin and S16, were 94° C, 30 s, 60° C, 30 s, 72° C, 30 s for 14 and 20 cycles and a final elongation of 10 min. at 72° C. Radioactive PCR products were analyzed on 8% polyacrylamide/TBE gel and quantified by phosphoimager. For real time quantitative analysis, the same primers were used, except the BP1 primers were replaced with forward 5'-CCCCAATTTGTCCTACTCCA-3' reverse 5'-GGTTGCTGGCAGGACAGGTA-3' and produced an amplicon of 100bp. Four series of ES primary and secondary differentiation experiments were done with duplicate of each clone in each experiment. All reactions were performed in triplicate in a master mix (QIAGEN, Mississauga, Can), containing 0.3µM of each primer. Amplification conditions were 95° C, 15min followed by 44 cycles of 94° C, 30s, 60° C, 35s, 72° C, 30s, in a MX3500pro multiplex quantitative PCR analyzer.

### *Histological analysis*

Age-matched controls and transgenic tissues were formalin-fixed and embedded in paraffin. Tissue sections of 5 µm were stained with hematoxylin/eosin and Congo red for light microscopy. Immunofluorescence for IgG, IgM, IgA, Kappa and Lambda light chains

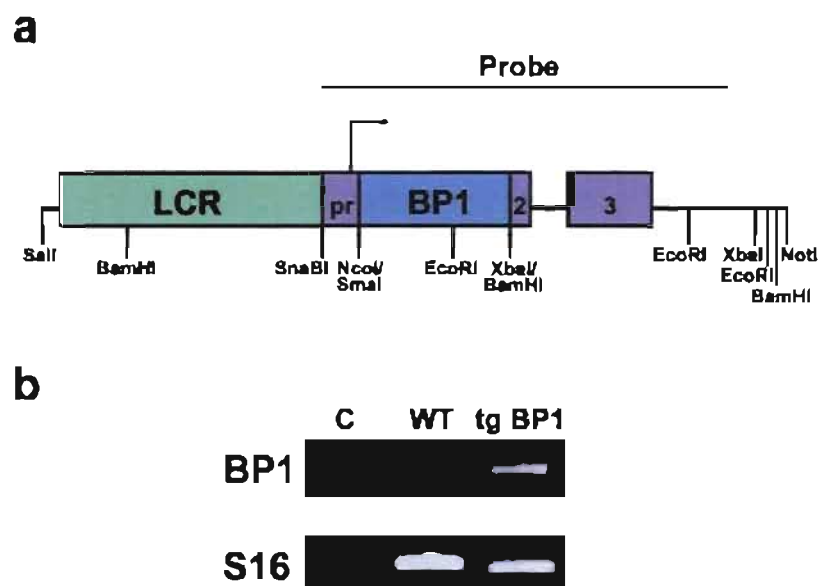
was performed following pronase digestion of paraffin sections. Staining for serum amyloid A protein (SAA) was performed by immunoperoxidase using avidin-biotin labeling. Tissues for ultrastructural analysis were fixed in 2.5% glutaraldehyde-buffered with 0.01M cacodylate (pH7.4) and postfixed in 2% osmium tetroxide and embedded in Epon. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate (14).



## Results and Discussion

### *BP1 expression in vivo appears to be embryonic lethal*

Characterization of the *in vivo* role of BP1 in erythroid cells was undertaken by introducing a LCRBP1 construct into mice. LCRBP1 was produced by linking the human  $\beta$ -globin regulatory sequences without the two BP1 silencer regions to the human BP1 cDNA (Fig.1a).



**Figure 1. LCRBP1 transgene structure and expression in transgenic mouse**

a) The LCRBP1 construct was produced in a bluescript vector by joining the human  $\beta$ -globin promoter (pr) lacking the two silencer sequences (-264/SnaBI to +48/NcoI) to the 1.1 kb BP1 cDNA (Sma I-Xba I). The human  $\beta$ -globin 8 kb mini LCR was linked to this DNA upstream, and downstream 2.8 kb of the  $\beta$ -globin gene including 3' sequences of exon 2, all of exon 3, and 3' flanking sequences (BamHI nt 62613 to XbaI nt 65421, Accession #U01317), containing the two globin 3' enhancers (18). The probe BP1- $\beta$ -globin (Sna BI-Xba I, 3.2kb) used for transgenic mouse screening by Southern blot analysis is indicated above the LCRBP1 construct.

b) Expression analysis in peripheral blood using RT-PCR. Three RNA blood samples from control H<sub>2</sub>O (C), transgenic mouse (tg-BP1) and control identical mouse strain (WT) were monitored for BP1 and S16 expression. Human BP1 expression was readily detectable in the blood of the transgenic founder mouse and undetectable in the blood of the control identical mouse strain. Expression of the ribosomal protein S16 served as internal control.

Only one adult founder transgenic mouse with an intact transgene was generated from 121 mice (P28 in Table 1). This female founder mouse appeared to have one copy of the transgene and was extensively mated with wild type (C57Bl/6J X CBA/J)F1 mice. From 11 litters, all 76 mice were negative for the transgene. The average litter size was 7 pups, well below the 10-12 pups on average for these strains. The lack of transmission can be explained by high mosaicism and/or embryonic lethality resulting from BP1 transgene expression. The very low frequency of adult transgenic mice obtained compared to the frequency of ~10-15% for other transgenes (data not shown), also indicated that expression of BP1 in differentiating and mature erythroid cells could be lethal during gestation. To test this hypothesis, microinjection of additional oocytes of the LCRBP1 construct was carried out and fetuses were analyzed for the presence of the transgene at various stages of gestation. As shown in Table 1, one of two embryos at E15.5 and four of 27 embryos at E16.5 were LCRBP1 positive. Among those four transgenic fetuses, one was resorbed and one was pale (anemic). The frequency of transgenic fetuses decreased thereafter. Since the maximal expression of the endogenous murine adult globin gene occurs at E16.5 for definitive erythroid cells, it would be expected that repression by BP1 would be most detrimental from this stage onwards.

**Table 1.** Genotype analysis of fetuses/pups from LCRBP1 microinjected oocytes

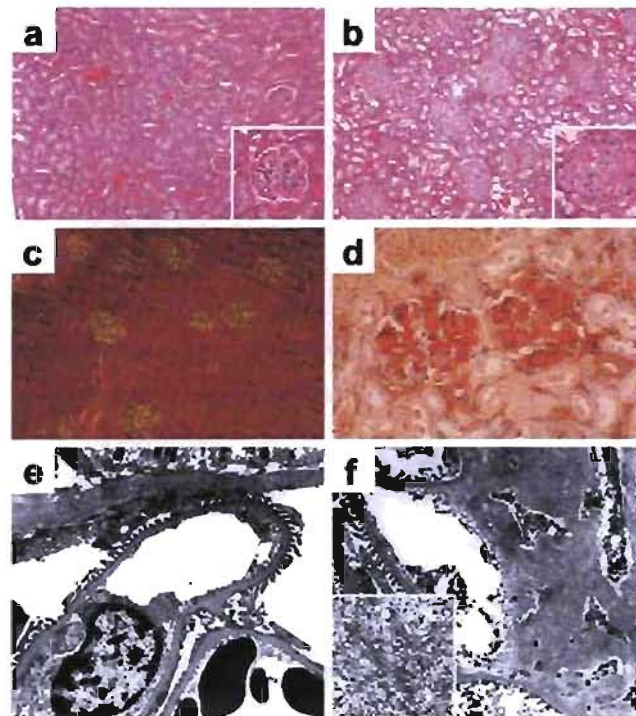
Stage (age)	Total n (fetuses or pups)	BP1 Genotype	
		-	+
E15.5	2	1	1
E16.5	27	23	4 <sup>a</sup>
E17.5	41	40	1
E18.5	39	38	1 <sup>b</sup>
P28	121	120	1 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Among 4 fetuses: 1 resorbed and 1 pale.

<sup>b</sup>Fetus completely resorbed.

<sup>c</sup>Mouse does not transmit the transgene.

The only adult female transgenic founder expressed BP1 in peripheral blood, shown by RT-PCR and Rnase protection (Fig.1b and data not shown). Pathological analysis upon the unexpected death of this transgenic founder mouse showed splenic enlargement by ~2-fold compared to the age-matched control mouse strain. The bone marrow cellularity was increased by 1.8-fold in the femur of the founder mouse ( $8.4 \times 10^7$  cells) relative to controls ( $4.6 \times 10^7 \pm 0.9$  cells; n=4) which is consistent with the ~1.4-fold increase in cellularity observed in hemizygous  $\beta$ -globin knock-out mice, a model of  $\beta$ -thalassemia (15). Both of these features are indicative of stimulated hematopoiesis and consistent with the observation of numerous foci of extramedullary hematopoiesis in organs such as spleen and kidney. While renal tissues had normal tubules, interstitium, and blood vessels, the glomeruli showed expansion of the mesangium compared to controls (Fig.2a, b), with narrowing of the capillaries due to large Congo red positive amyloid deposits (Fig.2c, d). By specific staining for identification of amyloid precursor proteins, these amyloid deposits were negative for immunoglobulins, kappa and lambda light chains but positive for serum amyloid A protein (Fig.2c, d). Electron microscopy revealed glomerular deposits of randomly oriented 8-10nm fibrils typical of amyloid (Fig.2e, f). Presence of increased serum amyloid A protein is observed in conditions of chronic inflammation as in thalassemia (16). The composite of these pathologic findings, increase in erythropoiesis/hematopoiesis and amyloid deposits, are consistent with a thalassemic condition in the BP1 transgenic mouse.

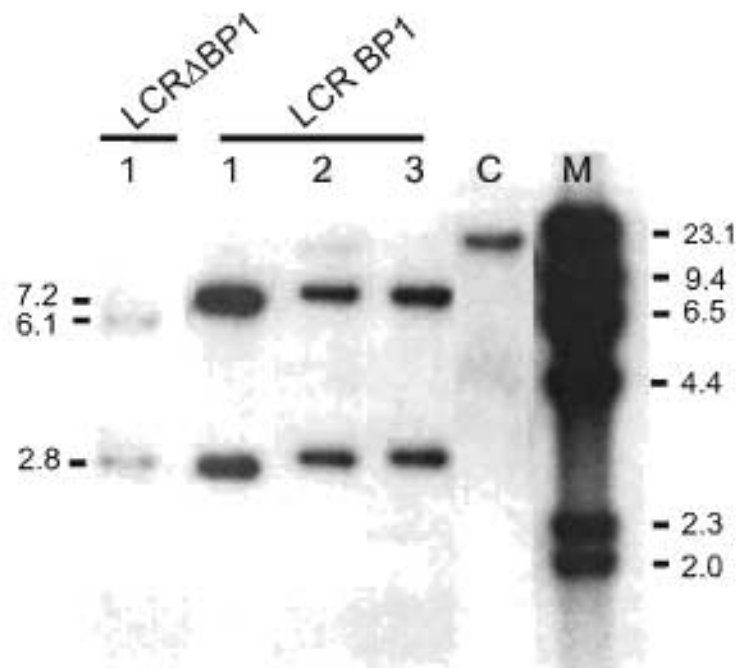


**Figure 2. Histopathological analysis of the LCRBP1 transgenic founder mouse**

a) Normal histology of the kidney displaying small regular glomeruli and surrounding tubulo-interstitial compartment (H &E, x100). Inset shows glomerulus of normal size and cellularity with patent capillaries and basement membranes of normal thickness (H&E, x400). b) Renal histology of the transgenic LCRBP1 mouse showed diffuse and uniform enlargement of the glomeruli due to expansion of the glomerular tuft by amorphous pale eosinophilic material. The outlying tubules, interstitium and blood vessels are uninvolved (H &E, x100). Inset shows a representative glomerulus of the transgenic LCRBP1 mouse with expansion of the mesangium and narrowing of the glomerular capillary lumina by voluminous deposits of amorphous material typical of amyloid. The glomerular cellularity appeared reduced (H&E, x400). c) Kidney of the transgenic LCRBP1 mouse viewed under polarized light displayed apple green birefringence diagnostic of amyloid deposits in a diffuse and global glomerular distribution (Congo red, polarized light, x100). d) Kidney of the transgenic LCRBP1 mouse showed strong diffuse and global glomerular positivity for serum amyloid A protein (SAA immunostain, x250). e) Ultrastructural analysis of a normal renal glomerular capillary showed the normal glomerular architecture, without fibrillar deposits (EM, x6000). f) Ultrastructure of a renal glomerulus from the transgenic LCRBP1 mouse showed abundant randomly oriented 8-10nm fibrils expanding the mesangial regions and narrowing the adjacent glomerular capillary lumen (EM, x6000). Inset shows fibrils at higher magnitude (EM, x20000).

*BP1 expression impairs definitive erythropoiesis*

To gain further insight into the *in vivo* role of BP1 in primitive and definitive hematopoiesis, the LCRBP1 and empty vector control LCR $\Delta$ BP1 constructs were targeted to totipotent ES cells by co-electroporation with the pSV3neo vector. Several independent clones were obtained for both constructs and were analyzed by Southern blot for integrity of the transgenes (Fig. 3). Among the clones with an intact transgene, three clones for LCRBP1 (1, 2 and 5 transgene copies) and three clones for LCR $\Delta$ BP1 (1 and 2 copies) were selected for subsequent analysis.



**Figure 3. Integrity of the BP1 transgene in ES cells.**

Southern blot analysis of electroporated ES cells with LCR $\Delta$ BP1 and LCRBP1 constructs. Restriction enzyme digestion was carried out for LCR $\Delta$ BP1 and LCRBP1 clones using Sal I/BamHI. Probe used is depicted in Fig. 1a and spanned the adult  $\beta$ -globin and BP1 sequences. Expected fragments are 6.1kb and 2.8kb for the LCR $\Delta$ BP1 clones, and 7.2kb and 2.8kb for the LCRBP1 clones. The intensity of the 6.1kb band of LCR $\Delta$ BP1 clones is weaker than the 2.8kb or the 7.2kb of the LCRBP1 clones since only  $\sim$ 0.3kb of the probe is homologous to globin. Extra bands correspond to junction of the constructs with genomic sequences. M: molecular weight marker  $\lambda$  digested with HindIII and C: copy of LCRBP1 unit length.

Parental and electroporated ES cells were differentiated *in vitro* to form EBs (which contain a variety of cell types) and assessed for BP1 expression. The potential of these electroporated ES cells to generate EBs was not significantly affected, as the primary plating efficiency was  $17.5 \pm 3.9\%$  for parental ES cells,  $17.1 \pm 4.3\%$  for LCR $\Delta$ BP1 cells and  $14.1 \pm 3.5\%$  for LCRBP1 cells (mean  $\pm$  standard deviation). In addition, LCRBP1 electroporated ES cells yielded similar sized EBs as the parental and empty vector ES cells (data not shown), suggesting that the number of cells per EB was not altered. During this primary differentiation process, the percentage of hemoglobinized EBs was comparable between the parental and electroporated cells at day 9 (Table 2).

**Table 2.** Quantification of erythroid progenitors

	EBs d9 % Hb EBs/total EBs	E <sup>P</sup> d3 No. E <sup>P</sup> /10 <sup>5</sup> cells	E <sup>d</sup> d7 % E <sup>d</sup> /total colonies
WT	53.97 $\pm$ 1.45	0.17 $\pm$ 0.01	27.00 $\pm$ 0.50
LCR $\Delta$ BP1	53.49 $\pm$ 3.39	0.18 $\pm$ 0.01	25.00 $\pm$ 0.35
LCRBP1-1	55.48 $\pm$ 8.77	0.17 $\pm$ 0.02	17.16 $\pm$ 1.75****
LCRBP1-2	54.00 $\pm$ 2.82	0.19 $\pm$ 0.00	17.50 $\pm$ 0.00*****
LCRBP1-3	51.35 $\pm$ 3.32	0.15 $\pm$ 0.02	17.66 $\pm$ 0.76*****

Analysis was carried out on optimal culture days for EBs (day 9), primitive erythroid progenitors E<sup>P</sup>(day 3), definitive erythroid progenitors E<sup>d</sup> (day 7) from parental or electroporated ES cells as described (9). The proportion of erythroid CFC was determined in the presence of BP1 expression for EBs (% hemoglobinized Hb/ EBs), E<sup>P</sup> (No. E<sup>P</sup> per 10<sup>5</sup> cells) and E<sup>d</sup> (% E<sup>d</sup>/total colonies). The data from wild type WT, LCR $\Delta$ BP1 (mean of two clones), or LCRBP1 from three clones (1–3) are shown as mean  $\pm$  standard deviation. *P*-value: student's *t*-test.

Values are compared to WT-CCE: \**P*  $\leq$  0.01, \*\**P*  $\leq$  0.001, and to LCR $\Delta$ BP1: \*\*\**P*  $\leq$  0.01.

To quantify expression levels, we first established the RT-PCR conditions to be within the linear range (Fig.4a). The expression time course of the endogenous adult  $\beta$ -globin gene was similar between wild type and empty vector control (Figure 4b and data not shown). Noticeably, wild type ES cells or EBs with empty LCR $\Delta$ BP1 control did not express BP1 (Fig. 4). In two independent experiments, the expression of BP1 in the LCRBP1 clones was highest at day 6 and 9 and decreased from day 12 onwards whereas the  $\beta$ -globin gene showed strongest expression on days 12 and 15. Semi-quantitative analysis of the LCRBP1 clones indicated a ~1.5 to 2-fold reduction in  $\beta$ -globin expression normalized to S16 on days 12 and 15 relative to empty vector control. Consistently, quantification by real-time PCR of EBs at day 9 showed a decrease in  $\beta$ -globin expression levels by at least 4- fold, a time when BP1 is strongest (Table 3, Fig. 4). Hence the LCRBP1 clones indicated that BP1 might antagonize expression of the murine  $\beta$ -globin gene. Conversely, repression of BP1 in the erythroleukemic K562 cell line was shown to enhance endogeneous human  $\beta$ -globin gene expression (3).

**Cette page est inexistante**



To investigate more precisely the role of BP1, we carried out secondary differentiation under conditions favorable for erythroid/hematopoietic colony forming cells (CFCs). In four series of experiments, the number of primitive erythroid E<sup>P</sup> progenitors detected at day 3 was unchanged upon differentiation of parental, LCRBP1 and control LCRΔBP1 ES cells (Table 2). Quantitative expression analysis from pools of LCRBP1 E<sup>P</sup> normalized to S16 showed a significant increase in BP1 expression levels (~20- to 25-fold) compared to pools of LCRBP1 EBs (Table 3).

Table 3. Quantitative expression of BP1 and adult β-globin genes in erythroid progenitors

	EBs d9		E <sup>P</sup> d3		E <sup>d</sup> d7	
	BP1/S16	β-globin(10 <sup>-3</sup> )/S16	BP1/S16	β-globin/S16	BP1/S16	β-globin/S16
WT	N.D.	28 ± 2.6	0.03 ± 0.0	10.0 ± 2.2	N.D.	300.5 ± 7.3
LCRΔBP1	N.D.	14 ± 8.5	0.05 ± 0.0	10.3 ± 1.5	N.D.	250.4 ± 4.2
LCRBP1-1	2.7 ± 0.6	2 ± 0.6*	73.8 ± 1.7	3.9 ± 0.3**	60.0 ± 2.8	150.3 ± 14.7
LCRBP1-2	25.4 ± 4.5	3 ± 0.4*	672.4 ± 19.4	5.1 ± 1.9*	702.3 ± 99.5	225.9 ± 19.2
LCRBP1-3	5.2 ± 1.8	1 ± 0.1*	126.3 ± 2.0	7.5 ± 2.1*	117.7 ± 22.0	180.8 ± 24.5

The data from wild type (WT), LCRΔBP1 (mean of three clones), or LCRBP1 from three clones (1 to 3) are shown. Values of real-time PCR represent relative unit normalized to control S16 expression ± standard deviation. N.D.: Not detected.

Statistical significance: \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.005$ , compared to WT.

As shown in Table 2, this increase in BP1 expression appeared to exert no significant negative effect on production of primitive erythroid cells. However, the number of definitive erythroid-CFC (E<sup>d</sup>-CFC) at day 7, as identified by hemoglobinized colonies, was significantly decreased in LCRBP1 relative to empty vector and parental ES cells. Pools of individual hemoglobinized definitive erythroid E<sup>d</sup> LCRBP1 progenitors showed high BP1 expression levels similar to those observed for primitive erythroid E<sup>P</sup> LCRBP1 progenitors by real time PCR (Table 3). These results indicated that the elevated BP1 expression led to a specific decrease of definitive erythropoiesis compared to primitive erythropoiesis. Importantly, BP1 expression caused a significant decrease in adult β-globin gene expression for both E<sup>P</sup> and E<sup>d</sup> cells relative to wild type and empty vector control, reaching 2- to 2.5-fold (Table 3). In contrast to definitive erythropoiesis, the adult β-globin chain is

not the most prevalent  $\beta$ -like globin chain in primitive erythropoiesis and consistently, decreased expression had no apparent impact on primitive differentiation. Of note, pools of hemoglobinized erythroid E<sup>d</sup> LCRBP1 progenitors were picked for expression analysis since non-hemoglobinized colonies include other cell types. However, pooling hemoglobinized E<sup>d</sup> would be expected to select for higher  $\beta$ -globin levels, possibly skewing the data toward less repression. Thus, the actual decrease in  $\beta$ -globin may be much greater than the one observed. Nevertheless, such a decrease in expression would be likely to have an important impact in the mouse, since the hemizygous  $\beta$ -globin knock-out mice with only a 25% reduction in  $\beta$ -globin gene expression resulted in a severe  $\beta$ -thalassemic phenotype with half the levels of hemoglobin and hematocrit levels (15,17). Further, expression of BP1 did not significantly alter the number of mac-CFC (macrophages), mix-CFC (mixed lineages: erythroid/granulocyte/macrophage/megakaryocyte) or E<sup>d</sup>/mac-CFC (data not shown). Therefore, BP1 expression in the erythroid lineage targeted specifically definitive erythroid progenitors.

In summary, our findings demonstrate that high expression of BP1 leads to decreased adult  $\beta$ -globin gene expression and inhibition of definitive erythroid differentiation. Together, previous *in vitro* studies and the data presented here support the concept that sustained BP1 expression, through repression of the adult  $\beta$ -globin gene, may cause globin chain imbalance resulting in thalassemia. Future studies should be directed to determining the role of BP1 in human thalassemia.

## References:

1. Chase, M. B., Fu, S., Haga, S. B., Davenport, G., Stevenson, H., Do, K., Morgan, D., Mah, A. L. and Berg, P. E. (2002) BP1, a Homeodomain-Containing Isoform of DLX4, Represses the  $\beta$ -Globin Gene. *Molecular and Cellular Biology*, **22**(8), 2505-2514.
2. Ebb, D., Tang, D. C., Drew, L., Chin, K., Berg, P. E. and Rodgers, G. P. (1998) Identification of upstream regulatory elements that repress expression of adult beta-like globin genes in a primitive erythroid environment. *Blood Cells Mol Dis*, **24**, 356-369.
3. Zoueva, O. P. and Rodgers, G. P. (2004) Inhibition of  $\beta$  protein 1 expression enhances  $\beta$ -globin promoter activity and  $\beta$ -globin mRNA levels in the human erythroleukemia (K562) cell line. *Experimental Hematology*, **32**, 700-708.
4. Berg, P. E., Williams, D. M., Qian, R.-L., Cohen, R. B., Cao, S.-X., Mittelman, M. and Schechter, A. N. (1989) A common protein binds to two silencers 5' to the human  $\beta$ -globin gene. *Nucleic Acids Research*, **17**(21), 8833-8852.
5. Elion, J., Berg, P. E., Lapoumeroulie, C., Trabuchet, G., Mittelman, M., Krishnamoorthy, R., Schechter, A. N. and Labie, D. (1992) DNA Sequence Variation in a Negative Control Region 5' to the  $\beta$ -Globin Gene Correlates With the Phenotypic Expression of the  $\beta^s$  Mutation. *Blood*, **79**(3), 787-792.
6. Haga, S. B., Fu, S., Karp, J. E., Ross, D. D., Williams, D. M., Hankins, W. D., Behm, F., Ruscetti, F. W., Chang, M., Smith, B. D., Becton, D., Raimondi, S. C. and Berg, P. E. (2000) BP1, a new homeobox gene, is frequently expressed in acute leukemias. *Leukemia*, **14**(11), 1867-1875.
7. Fu, S., Stevenson, H., Strovel, J. W., Haga, S. B., Stamberg, J., Do, K. and Berg, P. E. (2001) Distinct functions of two isoforms of a homeobox gene, BP1 and DLX7, in the regulation of the  $\beta$ -globin gene. *Gene*, **278**, 131-139.
8. Trudel, M., Saadane, N., Garel, M.-C., Bardakdjian-Michau, J., Blouquit, Y., Guerquin-Kern, J.-L., Rouyer-Fessard, P., Vidaud, D., Pachnis, A., Romeo, P.-H., Beuzard, Y. and

- Costantini, F. (1991) Towards a transgenic mouse model of sickle cell disease: hemoglobin SAD. *Embo J.*, **10**(11), 3157-3165.
9. Wiles, M. and Keller, G. (1991) Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development*, **111**(2), 259-267.
  10. Simon, M. C., Pevny, L., Wiles, M., Keller, G., Constantini, F. and Orkin, S. H. (1992) Rescue of erythroid development in gene targeted GATA-1<sup>-</sup> mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics*, **1**, 92-98.
  11. Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T. and Wiles, M. V. (1993) Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 473.
  12. Lanoix, J., D'Agati, V., Szabolcs, M. and Trudel, M. (1996) Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Oncogene*, **13**, 1153-1160.
  13. Trudel, M., Lanoix, J., Barisoni, L., Blouin, M.-J., Desforges, M., L'Italien, C. and D'Agati, V. (1997) C-MYC-induced apoptosis in polycystic kidney disease is Bcl-2 and p53 independent. *J. Exp. Med.*, **186**, 1873-1884.
  14. Trudel, M., De Paepe, M. E., Chretien, N., Saadane, N., Jacmain, J., Sorette, M., Hoang, T. and Beuzard, Y. (1994) Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood*, **84**(9), 3189-3197.
  15. Beauchemin, H., Blouin, M. J. and Trudel, M. (2004) Differential Regulatory and Compensatory Responses in Hematopoiesis/Erythropoiesis in  $\alpha$ - and  $\beta$ -Globin Hemizygous Mice. *J Biol Chem*, **279**(19), 19471-19480.
  16. Uguccioni, M., Meliconi, R., Lalli, E., Nesci, S., Delfini, C., Lucarelli, G., Gasbarrini, G. and Facchini, A. (1992) Serum amyloid A protein concentration in bone marrow transplantation for  $\beta$  thalassaemia. *J Clin Pathol*, **45**, 348-351.
  17. Ciavatta, D. J., Ryan, T. M., Farmer, S. C. and Townes, T. M. (1995) Mouse model of human  $\beta^0$  thalassemia: Targeted deletion of the mouse  $\beta^{\text{maj}}$ -  $\beta^{\text{min}}$ -globin genes in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9259-9263.

18. Trudel, M. and Costantini, F. (1987) A 3' enhancer contributes to the stage-specific expression of the human  $\beta$ -globin gene. *Genes and Dev.*, **1**, 954-961.

### **Acknowledgements**

This study was supported by the CIHR/IRSC of Canada to M.T.

## Chapitre III

### Discussion

#### 5.1 Rôle de BP1 humain dans l'érythropoïèse définitive *in vitro*

Récemment des études en culture cellulaire ont démontré que la protéine homéotique BP1 réprime la  $\beta$  globine adulte dans les cellules érythroleucémiques humaines K562. Fort de ce fait, nous avons décidé de déterminer en premier le rôle de BP1 dans l'érythropoïèse normale. La dérégulation de gènes étant chose courante dans les cellules cancéreuses, il n'est pas rare que des gènes ayant montré un certain potentiel échouent à reproduire le même effet en situation non pathologique. Pour étudier le rôle de BP1 au cours de l'érythropoïèse, nous avons utilisé le système de différenciation érythroïde *in vitro* de cellules souches embryonnaires murines (cellules ES). En effet, l'homologie fonctionnelle des facteurs érythroïdes orthologues entre l'humain et la souris permet d'adresser dans le système murin le rôle de facteurs humains. Par ailleurs, la différenciation érythroïde des cellules ES offre l'avantage de reproduire en peu de temps les différents stades de l'érythropoïèse au cours du développement. Les cellules ES murines (LCR  $\beta$ BP1 $\beta$ ) ont été transfectées avec le transgène  $\beta$ BP1 $\beta$  sous le contrôle du LCR. Les séquences de régulation incluses dans la construction ont été démontrées comme capables de conférer aux transgènes de type  $\beta$  globine une expression abondante érythroïde spécifique et indépendante du site d'intégration. Le LCR (8Kb) présent dans la construction assure un niveau d'expression élevé au transgène et le protège de potentiels effets de position liés au site d'intégration (Forrester et al., 1986). La portion minimale du promoteur du gène humain de  $\beta$  globine adulte utilisé ici, a déjà été démontrée comme étant capable de conduire l'expression de transgènes de type  $\beta$  globine dans les cellules érythroïdes de souris transgéniques. Au préalable, nous avons pris soin de déléter le promoteur de  $\beta$  globine de ses silenciers BP1 afin d'éviter une auto inhibition du transgène. La région 3' (*Bam*HI<sub>62613</sub> – *ECOR*V<sub>65427</sub>) du gène de la  $\beta$  globine adulte, suivie de la queue poly A du gène de  $\beta$  globine adulte complète la construction. L'importance de l'intron 2 de  $\beta$  globine

inclut dans cette séquence, a auparavant été démontrée pour l'épissage adéquat des gènes en transgénèse (Collis et al., 1990). Quant à la queue poly A, elle assure la stabilité au transcrit primaire. La présence de l'enhancer 3' de la  $\beta$  globine adulte humaine, également situé en 3' de la construction, contribue à la restriction de l'expression de BP1 aux cellules érythroïdes. Ceci est très important car les corps embryonnaires (EBs) générés dans la première étape de différenciation, des cellules ES, contiennent différents types cellulaires en plus des cellules érythroïdes.

L'expression de BP1 dans les corps EBs LCR  $\beta$ BP1 $\beta$  s'est avérée nettement inférieure à celle des colonies érythroïdes primitives et définitives de la seconde étape de différenciation. Le mode de prélèvement des colonies et des EBs destinés à l'analyse d'expression a contribué probablement à cet écart. Car, contrairement aux colonies érythroïdes hémoglobinisées qui ont été prélevées individuellement, les EBs totaux du pétri ont été collectés pour analyse. BP1 étant principalement exprimé dans les cellules érythroïdes, l'analyse de son expression à partir des EBs totaux du pétri introduit une sous estimation de son niveau réel dans les corps EBs hémoglobinisés. Lesquels ne comptent que pour 55-60% des EBs totaux (Keller et al., 1993). La variété de types cellulaires présents dans un corps embryonnaire, même hémoglobinisé, constitue un facteur supplémentaire qui justifierait la différence d'expression du transgène entre les EBs et les colonies. Par ailleurs, les transgènes de type  $\beta$  globine placés sous le contrôle du LCR sont connus pour avoir des niveaux d'expression comparables à ceux du gène adulte à tous les stades du développement et une perte de la spécificité développementale (Enver et al., 1989; Grosveld et al., 1987). De ce fait, il n'est donc pas étonnant d'observer que les niveaux d'expression de BP1 soient quasi équivalents dans les colonies primitives à ceux des colonies définitives. On observe cependant que quelque soit le stade de différenciation, l'expression de BP1 induit la répression du gène murin de  $\beta$  globine adulte,  $\beta^{\text{maj}}$ . Au cours de la différenciation primaire des corps embryonnaires LCR BP1, l'expression de BP1 est inversement proportionnelle à celle de la  $\beta$  globine adulte. Ainsi lorsqu'au jour 9 le transgène atteint son maximum d'expression, la  $\beta^{\text{maj}}$  est très peu exprimée. À l'inverse au

terme de la différenciation des EBs au jour 12 lorsque l'expression de BP1 s'éteint celle de  $\beta^{\text{maj}}$  devient abondante. Des résultats semblables ont été obtenus lors la différenciation érythroïde en culture de cellules MB-O2 (Chase et al., 2002). Notre résultat est consistant avec le fait que l'inhibition de BP1 humain par antisens entraîne la réactivation du gène adulte de  $\beta$  globine humaine dans les cellules K562 (Zoueva and Rodgers, 2004). Compte tenu du biais apporté par la technique de prélèvement des EBs, il est plausible que l'effet de BP1 sur la  $\beta^{\text{maj}}$  dans les EBs soit plus important que celui observé. L'effet de BP1 dans les EBs se limite toutefois à la régulation négative de la  $\beta$  globine adulte. BP1 n'a pas d'impact sur la prolifération des cellules, car l'efficacité d'ensemencement est similaire aussi bien chez les cellules transfectées avec BP1 que chez les cellules sauvages ou celles transfectées avec le vecteur exempt de BP1. Lors de la seconde étape de différenciation, BP1 diminue l'expression de la  $\beta^{\text{maj/min}}$  dans l'érythropoïèse primitive et définitive mais n'altère que la production de colonies définitives ( $E^d$ ), le nombre des colonies primitives ( $E^p$ ) demeurant inchangé. La réduction des colonies  $E^d$  trahit un défaut dans la différenciation érythroïde. Une telle perte de cellules érythroïdes définitives a été rapportée chez les souris  $\beta$  thalassémiques, possédant une délétion hémizygote de la  $\beta^{\text{maj}}$  (Beauchemin et al., 2004). La perte de près de 25 % de l'expression de  $\beta$  globines adultes chez ces souris ( $\text{hemi}\beta^{\text{thal}}$ ) conduit à une mort cellulaire prématurée des cellules érythroïdes en différenciation terminale. Ainsi, on pourrait s'attendre à ce que la répression drastique (60 %) des gènes de  $\beta$  globine adulte par BP1, qui est près de 2.4 fois supérieure à celle observée chez les souris  $\text{hemi}\beta^{\text{thal}}$ , entraîne la perte des  $E^d$  lors de l'érythropoïèse définitive. Toutefois, on pourrait aussi envisager que la baisse des  $\beta$  globines soit plutôt une conséquence de la perte de cellules érythroïdes définitives. Dans ce cas de figure il faudrait donc considérer que BP1 nuit à la prolifération des cellules érythroïdes définitives. Cependant, l'absence d'effet de BP1 sur la capacité des cellules ES LCR  $\beta\text{BP1}\beta$  à générer des EBs, exclut l'hypothèse que ces pertes des  $E^d$  soient dues à une action pro apoptotique directe de BP1 plutôt qu'à son effet sur l'expression des  $\beta$  globines adultes. En effet, le nombre égal d'EBs, et la taille similaire d'EBs en présence ou en absence de BP1, suggère fortement que le nombre de



cellules/EBs n'est pas altéré. De plus le fait que BP1 soit fortement exprimé dans plusieurs cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose refute l'éventualité d'une quelconque action pro apoptotique (Fu et al., 2003; Man et al., 2005). À l'inverse de l'érythropoïèse définitive où la  $\beta$  globine exprimé est la globine adulte  $\beta^{\text{maj}}$ , lors de l'érythropoïèse primitive la  $\beta^{\text{maj}}$  n'est pas majoritaire. Ce qui expliquerait probablement pourquoi malgré la diminution de la  $\beta$  globine adulte dans les  $E^P$  on n'observe pas de réduction du nombre de colonies. Les  $\beta$  globine embryonnaires  $\epsilon\gamma$  et  $\beta\text{H1}$  compenseraient pour la perte de  $\beta^{\text{maj/min}}$ , et préviendraient ainsi la perte de colonies  $E^P$ . De toute évidence BP1 n'a pas d'effet sur les globines embryonnaires, son action est donc restreinte à l'érythropoïèse définitive. L'ensemble de ces résultats en cellules ES nous porte à croire que BP1 antagonise spécifiquement l'érythropoïèse murine définitive, et régule négativement l'expression des  $\beta$  globines adultes. Par ailleurs, l'utilisation de trois différents clones LCR  $\beta\text{BP1}\beta$ , exclut la possibilité que ces effets sur l'érythropoïèse puissent être attribuables aux sites d'intégration du transgène.

La répression des gènes murins de la  $\beta$  globine adulte, suggère l'existence et la fonctionnalité des sites de liaison de BP1 humain en amont du promoteur des gènes adultes de souris. Il a en effet été préalablement proposé qu'un motif  $(\text{AT})_4\text{AT}_2$  riche en AT similaire au site consensus humain de BP1 se trouvait à la position -545 bp amont du promoteur de  $\beta^{\text{maj}}$  (Berg et al., 1989). Plusieurs études ont démontré que la répression de  $\beta$  globine par BP1 nécessite sa liaison à son site consensus. Nos résultats supportent le fait que BP1 médie son action sur les  $\beta$  globines adultes en se liant à ce site dans le promoteur de la  $\beta^{\text{maj}}$ .

Les observations faites en culture cellulaire étant consistantes avec les données de la littérature, nous avons voulu confirmer les effets de BP1 sur les  $\beta$  globine et l'érythropoïèse murine *in vivo*.

## 5.2. Rôle de BP1 dans l'érythropoïèse murine *in vivo*

### 5.2.1. Surexpression de BP1 humain chez la souris LCR $\beta$ BP1 $\beta$

À partir de la construction LCR  $\beta$ BP1 $\beta$  utilisée pour les transfections de cellules ES, nous avons essayé de générer des souris transgéniques exprimant BP1 humain. Malheureusement, nous n'avons pu obtenir de souris LCR  $\beta$ BP1 $\beta$  viables, exception faite d'une fondatrice qui n'a jamais pu transmettre le transgène à sa descendance. Ce qui suggère soit une expression mosaïque du transgène chez cette souris, soit une létalité embryonnaire des foetus BP1 positifs potentiellement liée à l'expression du transgène. Le décès inattendu de cette fondatrice a empêché l'analyse détaillée du phénotype érythropoïétique causé par la surexpression de BP1 *in vivo*. Toutefois l'examen pathologique *post mortem* suggère fortement que la souris avait un phénotype de type  $\beta$  thalassémique. En effet le recrutement de foyer d'érythropoïèse extramédullaire, illustré par le grossissement du volume de la rate révèle clairement une érythropoïèse inefficace, un trait commun des thalassémies. De plus, l'augmentation de la cellularité de la moelle osseuse comparable à celle présente chez les thalassémiques, trahit une prolifération soutenue de cellules précurseurs. De fait, une telle augmentation de cellules médullaires est associée, chez les  $\beta$  thalassémiques à une augmentation des précurseurs hématopoïétiques (Beauchemin et al., 2004). Cette mobilisation de cellules précurseurs dans les organes hématopoïétiques indique une stimulation de l'hématopoïèse chez cette souris fondatrice. Bien que toutes ces observations soient en faveur d'un phénotype de  $\beta$  thalassémie, l'évidence la plus marquante vient probablement des dépôts de protéines amyloïdes de sérum (SAA) observés dans les reins de la souris LCR $\beta$ BP1 $\beta$ . Ces dépôts de SAA rappellent clairement ceux retrouvés dans les reins des patients humains (Ugucioni et al., 1992). La présence de ces défauts érythropoïétiques dans un contexte d'expression abondante de BP1 *in vivo*, et l'absence de transmission du transgène malgré de nombreuses portées suggère une létalité embryonnaire causée par le transgène BP1. Ceci est d'autant

plus probable que nos expériences de transfection de BP1 en cellules ES ont démontré que la surexpression de BP1 mène à une baisse importante de la production de  $\beta$  globines, mais aussi à une perte de cellules érythroïdes définitives. Dans le cas d'un fœtus en développement le blocage de l'expression de  $\beta$  globine adulte pourrait nuire à la différenciation des cellules érythroïdes définitives, et en fin de compte s'avérer fatal pour le fœtus. Il a d'ailleurs été déjà rapporté que l'absence d'activation du gène adulte de la  $\beta$  globine lors de l'érythropoïèse définitive entraîne la mort embryonnaire (Nuez et al., 1995; Perkins et al., 1995). Cependant, il se pourrait aussi qu'une expression mosaïque du transgène BP1 favorise la survie de la souris, ce qui expliquerait peut-être la survie jusqu'à l'âge adulte de l'unique souris LCR  $\beta$ BP1 $\beta$  obtenue. Toutefois, l'évaluation de la fréquence d'obtention de fœtus LCR  $\beta$ BP1 $\beta$  positif et leur courbe embryonnaire de survie supportent l'hypothèse de létalité embryonnaire du transgène. Les fœtus BP1 positifs survivent jusqu'aux jours embryonnaires E15.5-16.5. L'expression transcriptionnelle et protéique du gène adulte de  $\beta$  globine atteignent respectivement leurs maxima vers E12.5 et E15.5. Il est donc concevable que la répression transcriptionnelle initiée par BP1 vers E12.5 ait un impact négatif sur la production protéique de  $\beta$  globines à E16.5. L'anémie observée chez ces fœtus reflète bien une baisse d'expression de gènes de globines. Par ailleurs le fait que les fœtus survivent après la commutation des  $\beta$  globines embryonnaires-adulte suggère fortement que les érythrocytes primitifs résiduels en circulation, compensent pour l'inefficacité de l'érythropoïèse définitive. Cette observation démontre aussi que BP1 n'affecte pas l'érythropoïèse primitive, et confirme que l'action de BP1 est spécifique à l'érythropoïèse définitive. Toutefois, on ne peut exclure la possibilité que cette antagonisation de l'érythropoïèse définitive puisse n'être qu'une conséquence des effets pléiotropiques engendrés par une expression trop élevée de BP1. Le transgène  $\beta$ BP1 $\beta$  étant placé sous le contrôle du LCR, son expression se situe bien au-delà des niveaux physiologiques de facteurs de transcription. Afin d'éliminer cette possibilité, nous avons étudié l'expression de BP1 à des niveaux plus représentatifs de ceux de facteur de transcription, en utilisant des éléments régulateurs mort, soit le promoteur faible du gène

adulte de  $\beta$  globine humain. Cette stratégie nous a permis en plus de promouvoir la survie des souris BP1 positives et d'étudier l'impact de l'expression de BP1 au stade adulte.

### **5.2.2. Expression de BP1 au stade adulte et régulation des gènes de $\beta$ globine chez les souris $\beta$ BP1 $\beta$**

En utilisant la même construction que précédemment, mais en omettant le LCR, nous avons généré cinq lignées de souris transgéniques  $\beta$ BP1 $\beta$  possédant le transgène dans son intégrité (figures A-1 et A-2). L'analyse d'expression du transgène à partir de la moelle osseuse totale, démontre que ces cinq lignées expriment le gène fœtal humain BP1 au stade adulte à des niveaux intermédiaires (figure A-3). Par ailleurs, le fait que l'ordre d'expression du transgène BP1 entre les cinq lignées soit conservé tant au niveau transcriptionnel que protéique, indique que l'expression évaluée est bien celle du transgène BP1 et non celle d'un des isoformes de BP1 humain chez la souris. Cette observation est renforcée par le fait que nous ayons utilisé un anticorps spécifique à la partie N-terminale de BP1 plutôt que sa région C-terminale pour l'analyse de l'expression protéique. En effet la région N-terminale codée par la séquence 5' est la partie qui diverge le plus entre BP1 humain et ses autres isoformes (Chase et al., 2002; Fu et al., 2001). Par ailleurs, la présence d'une protéine de taille équivalente ( $\sim 32$  kDa) à la protéine sauvage BP1 des cellules K562 suggère que la protéine BP1 humaine produite est intègre (figure A-4). Du moins nous pouvons affirmer qu'il n'y a pas de protéine BP1 tronquée en C-terminale ou tout au moins si troncation il y a, elle est mineure compte tenu de la taille de la protéine identifiée. Car l'anticorps utilisé ne nous aurait permis de détecter que des protéines intègres ou des protéines tronquées en C-terminale et de N-terminale intacte.

L'expression de BP1 humain chez les souris  $\beta$ BP1 $\beta$  diminue la transcription du gène murin de  $\beta$  globine adulte dans la moelle osseuse comparativement aux souris

sauvages (Figure A-5a). Ce qui confirme *in vivo*, nos précédentes observations sur le rôle de BP1 lors de la différenciation érythroïde des cellules ES. Cette baisse d'expression des  $\beta$  globine adultes en présence de concentrations moyennes de BP1, démontre que les phénotypes observés en surexpression de BP1 résultaient bien de l'action spécifique du transgène humain BP1. Ceci expliquerait donc l'anémie observée chez les fœtus LCR $\beta$ BP1 $\beta$ . Plus important encore, cette régulation de gènes murins par le facteur humain BP1 démontre non seulement la fonctionnalité *in vivo* du site de liaison du promoteur de  $\beta$  globine murin, mais en plus propose l'existence d'un facteur de transcription de fonction similaire chez la souris. Parallèlement, le croisement des souris  $\beta$ BP1 $\beta$  avec des souris YAC- $\beta$  globine homozygote pour les allèles de type  $\beta$  globine, a également révélé que BP1 régule négativement, *in vivo*, l'expression du gène humain de  $\beta$  globine adulte (figure A-5b). Ces données valident *in vivo* le rôle présumé de BP1 proposé dans les cellules K562.

Bien que BP1 réprime les gènes adultes murin et humain de  $\beta$  globine dans la moelle osseuse totale, cette répression n'est pas proportionnelle aux niveaux d'expression de BP1 dans les différentes lignées  $\beta$ BP1 $\beta$ . En effet on remarque que les lignées  $\beta$ BP1 $\beta$  80 et 83 qui ont le plus haut niveau d'expression de BP1 ont un potentiel de répression faible. À l'inverse, la lignée  $\beta$ BP1 $\beta$  43 qui affiche de faibles concentrations de BP1 par rapport aux deux précédentes présente une répression des gènes de  $\beta$  globines adultes humains et murins plus importante. Plusieurs raisons pourraient expliquer cette apparente inconsistance entre les niveaux d'expression de BP1 et le potentiel de répression observé. La première étant la présence en abondance d'une protéine BP1 tronquée en N-terminale dans la moelle osseuse de souris transgéniques  $\beta$ BP1 $\beta$  80 et 83. L'absence de la région N-terminale de cette protéine tronquée abolirait sa capacité de liaison à l'ADN et elle agirait donc en dominant négatif. N'ayant pas effectué de précipitation avec un anticorps spécifique au C-terminale de BP1, nous ne pouvons affirmer ou infirmer cette hypothèse. Toutefois l'analyse de l'intégrité du transgène par Southern blot ne révèle pas de transgène tronqué dans le génome de souris  $\beta$ BP1 $\beta$ ; fort de ceci nous supposons que le messenger produit est possiblement intact, et par conséquent la protéine BP1 aussi. Par ailleurs, on

pourrait supposer qu'un éventuel effet de variegation (effet de PEV) chez les lignées  $\beta$ BP1 $\beta$  expliquerait l'incompatibilité apparente des niveaux d'expression de BP1 et du potentiel de répression chez certaines lignées  $\beta$ BP1 $\beta$ . En d'autres termes, il serait possible d'envisager une expression hétérocellulaire du transgène BP1 dans la moelle osseuse de ces lignées. Laquelle résulterait en différentes sous populations de cellules érythroïdes ayant chacune des niveaux d'expression du transgène distincts. Cette variation du niveau d'expression a déjà été décrite pour d'autres transgènes dans les cellules de mammifères (Graubert et al., 1998; Widlund et al., 1997). Cet effet est généralement attribué à l'influence des éléments régulateurs et au r/arrangement de la chromatine présents au site d'intégration sur le transgène. La présence d'un tel phénomène chez les lignées  $\beta$ BP1 $\beta$  aurait pour résultat de diluer l'effet de BP1 sur l'expression de  $\beta$  globine adulte, malgré la détection de hauts niveaux d'expression de BP1. Tant soit peu qu'il y ait une population qui exprime le transgène en abondance et une autre qui ne l'exprime pas du tout. Cette seconde hypothèse quoique plausible, advenant sa vérification ne nous aurait pas renseigné sur le rôle de BP1 sur la régulation du gène érythroïde spécifique  $\beta$  globine chez ces lignées. Or, étant donné que l'effet de BP1 était attendu sur un gène érythroïde, il était important de vérifier que l'expression du transgène était limitée aux cellules érythroïdes. Ainsi, l'hypothèse d'une expression non érythroïde du transgène supérieure à celle des cellules érythroïdes, expliquerait la faible répression de  $\beta$  globine dans les lignées  $\beta$ BP1 $\beta$  80 et 83. Ce qui résulterait en une expression pancellulaire du transgène, c'est-à-dire une expression dans d'autres types cellulaires au sein de la moelle osseuse. L'observation de l'altération du nombre de plaquettes chez nos lignées  $\beta$ BP1 $\beta$  suggérait aussi une éventuelle expression non érythroïde du transgène BP1. Par ailleurs, ce type d'effet de position lié au site d'intégration a auparavant été rapporté pour les transgènes de type  $\beta$  globine (Trudel and Costantini, 1987). L'absence de LCR dans la construction, connu pour ses propriétés d'isolateur, rend le transgène plus susceptible d'être influencé par la chromatine environnante. Les transgènes de petite taille sont souvent plus sujets à cet effet. Car du fait de leur petite taille, ils sont susceptibles de contenir moins d'éléments régulateurs et par

régulateurs du site d'intégration. Cette hypothèse semble plus probable car la construction  $\beta$ BP1 $\beta$  est un transgène de type  $\beta$  globine, de petite taille dépourvu de LCR.

Afin de vérifier les données d'expression de BP1 avec la répression chez les différentes lignées  $\beta$ BP1 $\beta$ , nous avons évalué l'expression de BP1 sur des cellules érythroïdes purifiées de la moelle osseuse. Fort a été de constater que les lignées qui présentaient une expression élevée de BP1 dans la moelle osseuse totale, après purification ont révélé une expression de BP1 moins élevée dans les cellules érythroïdes (tableau A-1). Tandis que dans les cellules érythroïdes de la lignée  $\beta$ BP1 $\beta$  43 on a observé une concentration de près de 3 fois de l'expression de BP1, comparativement à l'expression dans la moelle totale (Tableau A-1). Les cellules érythroïdes représentant  $\sim$  du 1/3 des cellules totales de la moelle, ceci indique que l'expression du transgène est majoritairement érythroïde spécifique dans cette lignée. Le profil d'expression érythroïde du transgène BP1 justifie donc le potentiel de répression observé pour les lignées  $\beta$ BP1 $\beta$  43 et 83. Toutefois, l'absence de réduction de la  $\beta$  globine malgré une expression érythroïde élevée de BP1 suggère ici la présence d'un effet de PEV dans les cellules érythroïdes dans la lignée  $\beta$ BP1 $\beta$  80. Par ailleurs la détection d'une expression non érythroïde de BP1 dans les globules blancs offre une explication aux niveaux d'expression élevés de BP1 dans la moelle osseuse totale. Bien que l'expression érythroïde de BP1 humain réprime la  $\beta$  globine, il semble toutefois que l'effet répresseur nécessite un seuil d'expression minimum de BP1. En effet on constate que des lignées telles que  $\beta$ BP1 $\beta$  59 et 81, qui ont pourtant une expression érythroïde de BP1, ne présentent pas de réduction significative du gène adulte de la  $\beta$  globine. De la même façon qu'il y aurait un seuil minimum pour médier la répression, de même il semble y avoir un plafond de répression de la  $\beta$  globine. Ainsi, en comparant la relation dose dépendante du potentiel de répression avec l'expression de BP1 des lignées  $\beta$ BP1 $\beta$  43 et 83, on s'aperçoit que celle-ci est non linéaire. En effet, bien que l'expression érythroïde de BP1 en 43 soit 7x supérieure à celle de la lignée  $\beta$ BP1 $\beta$  83, nous n'observons pas un pourcentage de répression similaire. Chase avait déjà fait état d'un tel seuil maximal de répression lors d'expériences de co-transfection de BP1 avec des gènes

rapporteurs dans les cellules K562 (Chase et al., 2002). Il semble donc qu'au delà d'un certain niveau d'expression de BP1 l'effet répresseur plafonne et devient dose indépendant.

### **5.2.3 BP1 et la commutation de l'expression des $\beta$ globines fœtales – adultes**

Ayant démontré que l'expression modérée du facteur transcriptionnel fœtal humain BP1 réprime la  $\beta$  globine adulte humaine au stade adulte et que son expression élevée antagonise l'érythropoïèse définitive, nous avons émis l'hypothèse qu'*in vivo* à faible dose il pourrait causer le retard de l'activation de la  $\beta$  globine adulte lors de l'initiation de l'érythropoïèse définitive chez les souris  $\beta$ BP1 $\beta$ . L'analyse d'expression du gène humain de  $\beta$  globine adulte lors de la commutation des  $\beta$  globines fœtales à adultes à E12.5 révèle que BP1 ne diminue pas l'expression de la  $\beta$  globine humaine dans le foie fœtal (tableau A-2). Ceci suggère que l'expression de BP1 ne cause pas de retard de la commutation des gènes de  $\beta$  globine foetaux à adulte, du moins dans la lignée  $\beta$ BP1 $\beta$  83. La difficulté à obtenir des foetus déletés d'un allèle de  $\beta$  globine adulte de souris, et contenant les deux transgènes (BP1, YAC- $\beta$  globine) nous a empêchés d'analyser les autres lignées. La présence d'un potentiel de répression de  $\beta$  globine au stade adulte, bien que faible dans la 83, exclut l'éventualité que cette absence de retard soit dû aux faibles niveaux de BP1 dans cette lignée. On peut cependant imaginer qu'une réduction de  $\beta$  globine en dessous de 5% passerait inaperçue, dû à l'écart type. Toutefois cette absence de répression dans le foie fœtal suggère aussi la possibilité que BP1 ne soit pas un gène nécessaire à la répression de  $\beta$  globine adulte au stade fœtal. Mais plutôt un gène participant au processus de répression sans toutefois en être le facteur clé. La régulation de l'expression du gène  $\beta$  globine humain, lorsque placé sous le contrôle du LCR en absence des autres gènes du locus, dans des souris transgéniques est en faveur de cette hypothèse. En effet le gène humain de  $\beta$  globine adulte échappe à la répression développementale au stade embryonnaire et fœtal



(Behringer et al., 1990; Enver et al., 1990), bien que la construction contienne des sites consensus de BP1. Contrairement à ce qu'on observe pour les gènes humains  $\epsilon$  et  $\gamma$  qui sont respectivement régulés en tout ou en partie par le mécanisme de répression autonome lorsque liée au LCR (Behringer et al., 1990; Raich et al., 1990). Ces observations combinées à l'absence de répression des gènes de  $\beta$  globine adulte par BP1 au stade embryonnaire–fœtal chez la souris, suggèrent que les éléments cis présents dans le gène adulte de  $\beta$  globine ne sont nécessaires pour la répression du gène adulte de  $\beta$  globine au stade foetal. Il est donc plausible que BP1 soit un gène accessoire pour la répression du gène adulte au stade fœtal et que les éléments nécessaires pour cette répression développementale se trouvent dans d'autres séquences du locus. À cet effet d'ailleurs, l'expression de  $\beta$  globine humaine dans une construction (LCR $\gamma\beta$ ) contenant le gène fœtal humain  $\gamma$ , rétablit la répression du gène humain de la  $\beta$  globine adulte dans le foie fœtal (Behringer et al., 1990). Une observation consistante avec l'idée que la répression du gène adulte de  $\beta$  globine tient aux séquences à l'extérieur du gène. Néanmoins, on pourrait aussi objecter que cette absence de répression développementale du gène humain de  $\beta$  globine soit due à l'absence de protéines partenaires de BP1 humain à E12.5 dans le foie fœtal de souris. Des données de la littérature sont en faveur de l'existence de tels partenaires (Berg, 1989). Ainsi, l'absence de tels partenaires chez la souris à ce stade du développement, expliquerait le manque d'effet de BP1 humain sur la commutation fœtale à adulte à E12.5. Par ailleurs, s'il n'existe pas d'homologue fonctionnel de BP1 humain chez la souris il est aussi fort probable qu'on n'observerait pas de retard dans la commutation, comme c'est actuellement le cas à E12.5. Cependant certaines de nos données supportent l'existence d'une protéine murine BP1, du moins en ce qui a trait à la structure protéique. Nous discuterons de cette option par la suite. Pour l'heure si on considère l'existence d'un homologue fonctionnel murin de BP1 humain, cette absence de répression au stade embryonnaire–fœtal chez la souris suggère que les éléments nécessaires pour la répression sont absents à E12.5 dans le foie fœtal chez la souris. De plus, il est aussi envisageable que le contexte érythropoïétique qui prévaut dans le foie fœtal dilue l'effet de BP1 à E12.5. En

effet chez la souris dans le foie fœtal le gène murin de  $\beta$  globine principalement exprimé est le gène adulte  $\beta^{\text{maj}}$ , tandis que dans le foie fœtal humain les gènes fœtaux  $\gamma$  sont majoritaires. À E12.5 le foie fœtal murin est plus proche de l'érythropoïèse adulte définitive que de l'érythropoïèse fœtale définitive humaine. Il se peut donc que dans ce contexte de signaux activateurs des gènes adultes, l'effet de BP1 sur les gènes de  $\beta$  passe inaperçu. Afin de vérifier cette alternative nous avons investigué le rôle de BP1 dans le modèle de souris YAC PBGD qui, au stade adulte présente déjà un retard de l'activation du gène adulte de  $\beta$  globine (Beauchemin, en préparation). L'idée étant que la réduction de signaux activateurs du gène humain de  $\beta$  globine adulte permettrait de mieux visualiser l'effet de BP1 sur la commutation des gènes de  $\beta$  globine fœtaux à adultes. Nous n'avons pu constater aucune différence dans l'expression de la  $\beta$  globine adulte de souris BP1/YAC PBGD exprimant le transgène BP1 humain, comparativement aux souris YAC PBGD (figure A-6). Ceci suggère davantage l'existence de potentiels partenaires de BP1 requis pour un plein exercice de répression par BP1. Ainsi, BP1 étant un gène fœtal, il est possible que l'expression de son partenaire soit restreinte à l'érythropoïèse fœtale définitive chez l'humain. Chez la souris l'absence de ces partenaires de BP1 dans le foie fœtal murin (E12.5) et dans la moelle osseuse, des environnements de type érythropoïèse adulte définitive, pourrait réduire le potentiel de répression de BP1. À cet effet, des protéines de type HMG constitueraient des partenaires potentiels de choix. Ceci d'autant plus que leur expression en culture cellulaire, tout comme celle de BP1, est élevée en absence de  $\beta$  globine adulte humaine et régulée à la baisse lorsque cette dernière est présente (Chase et al., 1999). De plus la délétion de leurs sites de liaison dans le promoteur du gène humain de  $\beta$  globine adulte abolit la répression de celui-ci. Par ailleurs, la protéine BP2 apparentée à BP1 pourrait aussi être un partenaire potentiel de BP1. La protéine BP2 est connue pour liée la séquence -298 bp entre les deux sites consensus BP1 dans le promoteur de la  $\beta$  globine adulte (Berg et al., 1989). Toutefois aucune étude n'a été faite sur son présumé rôle dans la régulation des gènes de  $\beta$  globine, et ce encore moins sur sa phylogénie.

#### 5.2.4 Potentiels cibles érythroïdes de BP1

La similitude des phénotypes entre les foetus surexprimant BP1 (LCRBP1) et ceux présentant une déficience des facteurs GATA-1 et EKLF nous a porté à croire à l'existence d'un lien entre BP1 et ces activateurs transcriptionnels de la  $\beta$  globine adulte. De fait, les souris déficientes en GATA-1 et EKLF meurent *in utero* lors de l'érythropoïèse définitive (Fujiwara et al., 1996; Nuez et al., 1995). Par ailleurs, l'absence de ces activateurs transcriptionnels tout comme la surexpression de BP1 conduit à une suppression / réduction de l'expression du gène de la  $\beta$  globine adulte. Ces observations nous ont poussé à postuler que BP1 pourrait réprimer la  $\beta$  globine adulte en antagonisant ces activateurs transcriptionnels soit au niveau protéique, soit au niveau transcriptionnel. Étant donné qu'à ce jour aucune protéine à doigt de zinc n'est connue pour interagir avec des protéines homéotiques codées par les gènes *distal-less*, il est peu probable que BP1 module l'activité de ces activateurs par des interactions protéiques. L'analyse d'expression des activateurs GATA-1 et EKLF chez les souris  $\beta$ BP1 $\beta$  a révélé que BP1 n'influence pas la transcription des facteurs érythroïdes clés dans l'activation du gène adulte de  $\beta$  globine (figure A-7). Ceci suggère que ces facteurs ne constituent pas des cibles transcriptionnelles de BP1. Une observation consistante avec les données de Zoueva, lesquelles indiquaient que l'inhibition de BP1 dans les cellules K562, ne changeait pas l'expression des d'EKLF et de GATA-1 (Zoueva and Rodgers, 2004). Il est toutefois plausible qu'en plus de réprimer la  $\beta$  globine en se liant à son promoteur, BP1 pourrait influencer d'autres gènes érythroïdes importants pour l'activation de  $\beta$  globine et l'érythropoïèse définitive. D'ailleurs, plusieurs gènes érythroïdes possèdent des sites de liaison de BP1 dont l'affinité a été confirmée par retard sur gel (Données non publiées, Dr. Patricia Berg). Par ailleurs, on pourrait concevoir qu'une éventuelle liaison de BP1 près des sites consensus de ces activateurs dans le promoteur de la  $\beta$  globine, bloquerait leur liaison et médierait ainsi la répression des gènes de  $\beta$  globine adulte. Un mode d'action qui a déjà été décrit pour DRED le répresseur du gène embryonnaire  $\epsilon$  (Tanimoto et al., 2000). En outre, l'expression d'EKLF dans les

cellules K562 dans lesquelles les gènes de  $\beta$  globine adulte humains sont non exprimés (Bieker et al., 1998), laisse supposer la possibilité qu'une contrainte stérique puisse empêcher les activateurs d'interagir avec le promoteur de la  $\beta$  globine adulte. Certains auteurs ont d'ailleurs émis l'hypothèse que les protéines HMG contribueraient à l'établissement d'une telle contrainte, en rapprochant les deux sites distants de liaison de BP1 dans le promoteur de  $\beta$  globine (Drew et al., 2000). D'ailleurs la mutation d'un site HMG abolit la répression de  $\beta$  globine dans les cellules K562, bien que la protéine BP1 soit liée à ses sites consensus. Supportant ainsi l'hypothèse d'un potentiel complexe de répression transcriptionnel auquel prendrait part BP1 et les protéines de type HMG.

### **5.3 Modèle intégré de répression de la $\beta$ globine adulte par BP1**

Plusieurs études suggèrent un rôle important des protéines HMG dans la transcription des gènes en général et ceux de  $\beta$  globine en particulier (Chase et al., 1999; Drew et al., 2000; Kirov et al., 1996; Lehming et al., 1998). Des études *in vitro* ont démontré que la liaison de ces protéines HMG à l'ADN induisait la formation de boucles d'ADN (Bagga and Emerson, 1997; Bagga et al., 2000). L'interaction entre les facteurs liés à ces séquences distales préalablement éloignés participeraient à la formation et au maintien de la structure en boucle observée en microscopie électronique suite à la liaison de HMG I (Y) (Bagga et al., 2000). Dans la régulation des gènes de  $\beta$  globines, ces protéines semblent jouer un rôle important dans le maintien de la répression du gène adulte par la protéine BP1. Drew suggère d'ailleurs que la torsion de l'ADN induite par la liaison des protéines HMG (I)Y et HMG1+2 près du silencer I de BP1, promouvoit la formation d'un complexe de répression transcriptionnelle auquel participe BP1 (Drew et al., 2000). Ainsi la liaison des protéines HMG contribuerait au rapprochement des protéines BP1 liées aux deux sites distants SI et SII dans le promoteur de la  $\beta$  globine. L'interaction entre les deux protéines maintiendrait le complexe en place. Le complexe ainsi formé constituerait un encombrement spatial au niveau du promoteur de la  $\beta$  globine adulte, et empêcherait l'accès aux activateurs transcriptionnels au promoteur (figure 9).

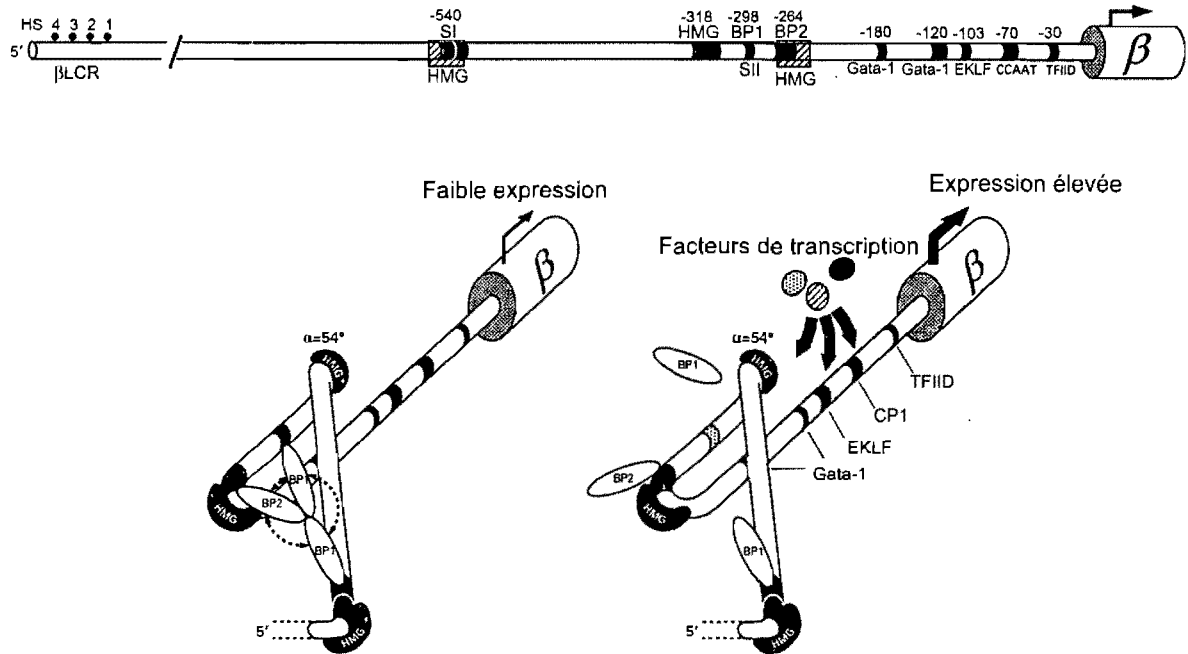


Figure 9: Modèle intégré de régulation du gène de  $\beta$  globine par BP1

Légende : A) Promoteur du gène adulte de la  $\beta$  globine humaine et site consensus des facteurs associés; S I : silencer I; SII : Silencer II. B) Au stade fœtal, l'interaction des protéines HMG et BP1 avec le promoteur du gène de la  $\beta$  globine engendre une contrainte stérique au niveau du promoteur défavorable à la transcription. Cette contrainte stérique bloque l'accès du promoteur aux activateurs transcriptionnels. C) Au stade adulte, la diminution de l'interaction de BP1 avec le promoteur favorise le relâchement de la contrainte stérique, ce qui rend le promoteur accessible aux activateurs transcriptionnels.

Toutefois, on ne saurait dire si la liaison de BP1 promouvoit celle de HMG, ou s'il s'agit de la situation inverse. Toujours est-il que les liaisons de HMG (I) Y et de BP1 au silencer SI sont non exclusives (Chase et al., 1999). Par contre lors de l'érythropoïèse adulte définitive, la régulation à la baisse de BP1 provoquerait un relâchement de la boucle et la disparition de la contrainte stérique, permettant ainsi l'accès à la machinerie basale de

transcription et aux activateurs. Sachant que lors d'expériences de transgénèse sur le locus humain, le LCR au cours de l'érythropoïèse foetale ne vient pas à proximité du promoteur du gène de  $\beta$  globine adulte, on peut se demander quelle est l'importance de ce complexe de répression au stade foetal. Ceci d'autant plus qu'à ce stade l'absence d'interaction du LCR avec le promoteur constitue déjà en soit une sorte d'inhibition. L'une des hypothèses la plus probable est que ce complexe prévienne l'interaction du promoteur  $\beta$  avec le LCR. En effet, plusieurs données supportent le fait que les promoteurs de certains gènes du locus participent à la détermination de l'activation stade spécifique des gènes (Perez-Stable, 1989; Perez-Stable and Costantini, 1990; Starck et al., 1994; Trudel et al., 1987b). De plus, des observations récentes dans notre laboratoire proposent aussi que la régulation de la commutation ne serait plus une fonction intrinsèque au LCR mais plutôt une fonction des promoteurs de certains gènes du locus (Beauchemin, en préparation). Ainsi les facteurs de transcription associés à ces promoteurs spécifieraient l'initiation de la commutation des gènes de  $\beta$  globines.

Dans ce contexte, il est possible que l'interaction du LCR avec le promoteur de la  $\beta$  globine soit EKLF et/ou GATA-1 dépendante. En effet, l'on sait maintenant que l'interaction d'EKLF avec le complexe de remodelage de la chromatine SWIN/SNF participerait à l'ouverture de la chromatine au niveau du promoteur de la  $\beta$  globine adulte lors de l'érythropoïèse définitive (Armstrong et al., 1998). Du fait de cette interaction, la liaison d'EKLF faciliterait celle du LCR avec le promoteur. Ceci est d'autant plus important car de plus en plus de données suggèrent que le LCR n'est pas nécessairement le facteur clé de l'ouverture de la chromatine du locus (Epner et al., 1998). De plus, cette fonction d'EKLF est envisageable au niveau du promoteur du gène adulte de  $\beta$  globine. Car EKLF présent au stade embryonnaire est exprimé dans les cellules K562 où il n'y pas d'expression de la  $\beta$  globine adulte (Bieker et al., 1998; Hodge et al., 2006; Tewari et al., 1998); Cependant il est pourtant nécessaire à son activation (Nuez et al., 1995). Il est donc plausible que dans les cellules K562 ce complexe de répression incluant BP1 soit mis en place. Par ailleurs, l'interaction de GATA-1 avec le promoteur du gène de  $\beta$  globine de

souris,  $\beta$  maj, quoiqu'insuffisante est requise pour l'interaction physique entre le LCR et le promoteur (Vakoc et al., 2005). La formation de la boucle d'activation entre le LCR et le promoteur de la  $\beta^{\text{maj}}$  est requise pour une pleine activation du gène adulte. Compte tenu de ceci, le complexe BP1/HMG pourrait donc maintenir la chromatine du promoteur dans une structure non permissive à la liaison d'EKLF et de GATA-1, de sorte à prévenir ainsi l'activation du gène adulte de  $\beta$  globine par le LCR.

#### 5.4 Expression de BP1 et homéostasie de l'érythropoïèse définitive

Quelque que soit son mode d'action, il n'en demeure pas moins que BP1 a un impact sur les gènes de  $\beta$  globine adultes. Chez les souris transgéniques  $\beta\text{BP1}\beta$ , la baisse de la transcription des gènes de  $\beta$  globine se traduit par la réduction de la quantité des chaînes de  $\beta$  globines, ce qui cause un déséquilibre du ratio des chaînes de globine en faveur des chaînes  $\alpha$  (figure A-8). Au niveau cellulaire, ce déséquilibre se traduit par la précipitation de chaînes  $\alpha$  globine dans les globules rouges. Un phénotype observé dans les cas de  $\beta$  thalassémie. L'observation de ces précipités de chaînes  $\alpha$  globines (corps de Heinz) dans le sang périphérique laisse supposer que l'expression de BP1 altère déjà le ratio des chaînes de globine bien avant le stade de globule rouge mature. L'analyse des précurseurs érythroïdes dans la moelle osseuse des souris BP1 révèle effectivement que BP1 antagonise la maturation érythroïde à partir des précurseurs tardifs, dès le stade des érythroblastes polychromatophiles. La restriction de la perte de 4% des précurseurs au stade tardif de maturation supporte le fait qu'il s'agisse d'une action spécifique de BP1 sur le gène de  $\beta$  globine (figure A-9). Plutôt que la résultante de l'altération du processus de maturation par BP1. Car c'est en effet à ce stade que le maximum de concentration en globine est atteint. Cette perte des érythroblastes orthochromatophiles aussi présente chez les souris thalassémiques hémis  $\beta^{\text{thal}}$  est associée à une stimulation de l'érythropoïèse (Beauchemin et al., 2004; Magis and Martin, 1995). En effet, l'augmentation des réticulocytes de

concentration élevée en ARN (cellules érythroïdes immatures) dans le sang périphérique trahit un processus de maturation érythroïde écourté (tableau A-3). Lequel serait un genre de mécanisme de compensation mis en place pour répondre rapidement aux besoins de l'organisme en globules rouges, suite à la perte de précurseurs tardifs immatures. Bien que l'élévation des globules blancs suggère aussi une prolifération cellulaire accrue des progéniteurs hématopoïétiques, il est difficile d'affirmer qu'il s'agit d'une conséquence connexe à l'effet de BP1 sur les cellules érythroïdes. Puisque ayant préalablement détecté une expression non érythroïde de BP1 dans les globules blancs, il est possible qu'il s'agisse d'un effet de BP1 non lié à son rôle dans l'érythropoïèse. Toutefois, l'absence d'érythropoïèse extramédullaire, souligne le caractère minime de cette stimulation (tableau A-4). De plus, l'absence d'impact sur la cellularité de la moelle osseuse et le nombre de progéniteurs hématopoïétiques CFU-e et BFU-e supporte cette observation (tableau A-5). Il semble donc que le mécanisme de compensation ne sollicite pas les progéniteurs précoces (BFU-e et CFU-e), mais plutôt les tardifs. De façon générale, cette absence d'impact sur les progéniteurs précoces indique que BP1 n'affecte pas la prolifération cellulaire et encore moins la différenciation érythroïde *in vivo*. Par ailleurs, il semble que BP1 induise une élévation artificielle des paramètres érythrocytaires (Hb, Hct, RBC, CHCM), ce qui suggère un état de déshydratation chez les souris.

### 5.5 Importance clinique de BP1

La  $\beta$  thalassémie et l'anémie falciforme sont des hémoglobinopathies les plus courantes qui affectent le gène adulte de  $\beta$  globine. Des études récentes attribuent un rôle déterminant à la protéine BP1 dans la sévérité de ces maladies. En effet, les polymorphismes de la séquence consensus de BP1 dans le promoteur de la  $\beta$  globine adulte, modifient l'affinité de liaison de la protéine BP1. Ainsi, BP1 se lie plus fortement au silencer I (-530 bp) de la forme la plus douce de la maladie (Haplotype Arabo-Indien)



comparativement à celui présent dans les formes les plus sévères de la maladie (haplotype Bantu)(Chebloune et al., 1988; Elion et al., 1992). Ces observations ont permis de proposer que la liaison de cette séquence par BP1 *in vivo* réduirait l'expression de la chaîne adulte de  $\beta$  globine anormale et ainsi influencerait le cours de la maladie. En outre, l'augmentation significative de l'hémoglobine fœtale, généralement associée à l'haplotype Arabo-indien contribue davantage à tempérer le phénotype de la maladie. À ce propos, plusieurs ont d'ailleurs suggéré que la présence d'un site consensus de forte affinité pour BP1, -158 bp en amont du promoteur de la globine fœtale  $G\gamma$  soit à l'origine de cette persistance de l'hémoglobine fœtale (Berg et al., 1989; Gilman and Huisman, 1985) (Données non publiées Patricia Berg). Par ailleurs la liaison de BP1 à certaines variantes du site consensus a aussi été décrite comme responsable de la sévérité dans les  $\beta$  thalassémies (Chan et al., 2007). Bien que toutes ces études semblent attester d'un éventuel rôle de BP1 dans les hémoglobinopathies, il apparaît cependant difficile de concilier ce présumé rôle avec le profil d'expression de BP1 au stade adulte. Car, BP1 est régulé à la baisse au stade adulte et, c'est précisément à ce stade que se développent ces maladies. Il semble donc que, nos connaissances actuelles du profil d'expression de BP1 ne nous permettent pas d'établir avec certitude une corrélation entre BP1 et la sévérité des hémoglobinopathies. Cependant, à l'instar de marqueurs cellulaires des cellules souches dont l'expression est restreinte aux cellules primitives dans la moelle osseuse (Doyonnas et al., 2005), on pourrait concevoir que l'induction d'un stress hématopoïétique comme c'est le cas dans ces hémoglobinopathies, contribuerait à l'augmentation des niveaux d'expression de BP1 dans les précurseurs érythroïdes. Quoiqu'il en soit, au-delà de l'éventuel rôle de BP1 dans la détermination de la sévérité clinique des hémoglobinopathies, son effet répresseur de gènes de  $\beta$  globine offre une avenue prometteuse pour le traitement de l'anémie falciforme par thérapie génique. L'expression de BP1 au stade adulte servirait à réprimer l'expression de la protéine de  $\beta$  globine adulte mutée responsable de la maladie. De plus, s'il s'avère que le motif en -158 bp du gène foetal soit une séquence de régulation positive, cette thérapie

contribuerait aussi à élever le niveau d'hémoglobine fœtale chez les patients sans avoir recours à un vecteur permettant l'expression du gène fœtal au stade adulte.

## 5.6 Profil d'expression de BP1 et autres rôles dans l'hématopoïèse

Outre le rôle de BP1 dans la régulation des gènes de  $\beta$  globine adulte, certaines données lui prêtent un rôle émergent dans l'hématopoïèse. En effet, BP1 est régulée à la hausse dans les leucémies et cancers du sein au potentiel invasif élevé. De plus, cette expression élevée augmente la clonogénicité des progéniteurs malins et module leur survie (Fu et al., 2003; Man et al., 2005). *In vivo*, lors de l'hématopoïèse normale, BP1 est fortement exprimé dans le foie fœtal, organe hématopoïétique en cours de colonisation par les cellules érythroïdes du sac vitellin/AGM. De plus, au stade adulte son expression dans la moelle osseuse est restreinte aux cellules souches hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>. La combinaison de ces données suggère que dans l'hématopoïèse normale, BP1 pourrait participer à la colonisation/invasion des organes hématopoïétiques. Car le processus de colonisation à certains égards peut être comparé au processus d'invasion des cellules cancéreuses. Dans les deux cas les cellules migrantes ont besoin de modifier leur signalisation pour pouvoir envahir de nouveaux organes. Et au stade adulte la colonisation de nouveaux sites étant désormais obsolète, il serait normal de voir le potentiel d'invasion réduit : ce qui expliquerait la réduction de l'expression de BP1.

## 5.7 Évidence de l'existence d'une protéine murine BP1

Parallèlement, l'identification dans les tissus érythroïdes de souris sauvages, d'une protéine de profil d'expression et de taille équivalente (~32kDa) à la protéine humaine BP1, supporte fortement l'existence d'un homologue murin de la protéine humaine BP1 (figure A-10). Ainsi tout comme la protéine BP1 humaine, la protéine murine identifiée est abondante dans le foie fœtal et régulée à la baisse au cours du développement. Ce qui corréle avec une fonction potentielle de cette protéine murine dans la régulation des gènes

adultes de  $\beta$  globine. De plus, l'utilisation d'un anticorps spécifique à la région N-terminale de BP1 humain exclut la possibilité qu'il s'agisse d'un autre membre de la famille des gènes *Dlx* murin. Toutefois la présence d'une bande supplémentaire de près de 40 kDa dans les tissus érythroïdes de souris sauvages, témoigne de l'existence de deux formes de la protéine murine apparentée à BP1 humain (Annexe 11). La forme de 40 kDa semble présenter un profil d'expression opposé à celui de celle à 32 kDa. Il semble en effet que la protéine de 40 kDa soit régulée à la hausse au cours de l'érythropoïèse adulte définitive (E16.5), ce qui suggère un rôle distinct de la forme à 32 kDa. Cette protéine de 40 kDa pourrait être soit une forme modifiée de la protéine BP1 (32kDa) ayant subi des modifications posttraductionnelles ou alors une protéine différente de BP1. La phosphorylation ayant déjà été décrite comme capable de modifier l'activité transcriptionnelle de protéines à homéoboîte, il se pourrait que la protéine à 40 kDa soit une forme phosphorylée de celle à 32 kDa. Il est possible que ce mécanisme soit mis en place dans notre cas pour modifier l'activité de la protéine murine BP1 (32 kDa). Toutefois, à la vue de l'absence de répression du gène de  $\beta$  globine adulte dans le foie foetal chez les transgéniques YAC- $\beta$  globine, on peut se demander si la protéine murine de 32 kDa et BP1 humain sont fonctionnellement équivalents. De plus, la commutation prématurée des gènes fœtaux à adultes humains au début de la colonisation du foie foetal chez les transgéniques YAC- $\beta$  globine, plutôt qu'à la fin de l'érythropoïèse fœtale comme c'est le cas chez l'humain suggère aussi une divergence de fonction. Il se pourrait donc que sur le plan évolutif, chez l'humain la protéine BP1 ait divergé sur le plan fonctionnel de façon à moduler la régulation des gènes humains de  $\beta$  globine. Ceci est fortement probable car l'Humain comparativement à la souris n'exprime pas de  $\beta$  globine adulte lors de l'érythropoïèse fœtale.

## 5.8 Le BAC du gène BP1 murin

De nombreux obstacles à l'analyse fonctionnelle exhaustive de BP1 *in vivo*, dans des modèles de souris transgéniques, subsistent encore. Ces obstacles se traduisent d'une part, par le peu de connaissance au niveau de la régulation du gène endogène BP1 chez la souris. D'autre part, par la méconnaissance d'un chevauchement de fonction entre BP1 et les autres gènes DLX. Dans ce contexte, il devient primordial d'isoler et d'identifier le gène BP1 murin. Basé sur la comparaison de séquence de l'homéodomaine et des régions codantes de BP1 humain, nous avons identifié un BAC (Chromosome artificiel de bactérie) contenant la séquence homologue murine au gène humain BP1. En utilisant des sondes correspondant respectivement à l'exon 1 (Sonde a : Xho I – BsRG I) et l'exon 2-3 (Sonde b : Xho I- Sph I) de BP1 humain, nous avons caractérisé par Southern blot le gène murin BP1 (figure A-11). L'amplification d'ADN par PCR nous a permis d'attester de la présence de l'exon 2 et l'exon 3 dans leur intégralité. La caractérisation de ce BAC révèle qu'il s'agit du gène *Dlx 4* murin intègre, possédant la structure caractéristique des gènes *Dlx* : deux introns et trois exons. Le profil d'hybridation n'a pas démontré d'hybridation croisée avec un autre gène *Dlx*, nous en avons conclu que le gène *Dlx 4* est bien le gène qui code pour le transcrite de BP1 murin. Une observation en accord avec la littérature (Chase et al., 2002).

## Conclusions et perspectives

Notre étude sur le rôle de BP1 dans l'érythropoïèse a permis de confirmer *in vivo* le rôle de BP1 humain comme répresseur du gène adulte de la  $\beta$  globine. Toutefois, l'importance de ce répresseur dans la commutation humaine de l'hémoglobine fœtale à adulte reste discutable. Il s'agirait donc dans un premier temps d'évaluer l'existence de protéines partenaires de BP1 et leur pertinence dans le rôle de BP1 sur les gènes adultes de  $\beta$  globines au stade fœtal. Des travaux actuels suggèrent la participation des protéines de type HMG et de la protéine BP2 au potentiel de répression de BP1; il serait donc fort enrichissant d'évaluer la présence d'un complexe de répression *in vivo* par co-

immunoprecipitation de ces protéines. En se basant sur les évidences que nous avons du rôle des protéines HMG dans la formation de ce complexe transcriptionnel, nous pourrions aussi déterminer s'il y a formation d'une boucle de répression par la technique de capture de la conformation chromosomique. Le rapprochement des séquences SI et SII chez nos transgéniques  $\beta$ BP1 $\beta$  servirait d'indicateur de la formation de cette boucle. Par la même occasion nous confirmerons l'interaction *in vivo* de BP1 avec ses silenciers. L'analyse du profil d'expression de ces partenaires dans les cellules érythroïdes au cours du développement, permettra de solidifier leur contribution au rôle de BP1 au stade fœtal. Afin d'unifier l'action de BP1 avec nos connaissances actuelles de la régulation du gène adulte de  $\beta$  globine, il serait intéressant d'adresser par immunoprécipitation de la chromatine l'interaction des activateurs transcriptionnels, EKLF et GATA-1, avec le promoteur de la  $\beta$  globine adulte en présence de la protéine BP1 chez nos souris  $\beta$ BP1 $\beta$ . Une étude similaire dans les cellules K562 permettrait de valider le modèle intégré du mécanisme de répression de BP1. En plus de valider ce modèle, cette analyse permettrait de juger de la portée de cette répression au cours du développement.

Essentiellement, l'identification de la protéine murine apparentée à BP1 et le profil d'expression des formes qui lui sont associées démontrent que BP1 ne peut plus être considéré comme un gène qui a uniquement une fonction de répression de la  $\beta$  globine. Nos travaux révèlent particulièrement que le profil d'expression de la forme de 32 kDa supporte un rôle dans la régulation des gènes adultes de  $\beta$  globine. Par ailleurs, nous proposons que la forme à 40 kDa soit associée à une autre fonction, possiblement dans l'hématopoïèse. Nous suggérons l'étude de ces deux formes séparément dans un système de différenciation *in vitro* des cellules ES. L'inhibition par antisens des transcrits de ces deux formes, lesquels seront déduits à partir de la séquence peptidique obtenue par spectrométrie de masse, permettra de déterminer les fonctions redondantes/distinctes s'il y a lieu des deux formes dans l'érythropoïèse. Plus encore cette étude permettra d'établir clairement l'homologue fonctionnel murin de la protéine humaine BP1. Par ailleurs cette équivalence fonctionnelle pourra aussi être validée *in vivo* grâce au BAC de BP1 murin.

Ainsi, des études de perte de fonction effectuées chez des souris délétées de BP1 endogène nous permettront de dresser le portrait des cibles de BP1 dans les cellules érythroïdes. Des études complémentaires de surexpression de BP1 murin viendront affiner la compréhension des effets observés en perte de fonction. Compte tenu des effets de position observés chez nos transgéniques  $\beta$ BP1 $\beta$  nous proposons l'inclusion d'un isolateur soit le 5'HS5 de poulet ou le 5'HS5 humain, dans la construction pour protéger le transgène contre les éléments de régulation du site d'intégration.

Ces approches fourniront non seulement un outil thérapeutique majeur pour les hémoglobinopathies telles que l'anémie falciforme, mais aussi permettra une meilleure compréhension de l'expression séquentielle des gènes adulte de la  $\beta$  globine. À plus large spectre l'exploration du mécanisme de régulation des gènes de  $\beta$  globine offrira aussi une meilleure compréhension de la régulation des gènes organisés en locus.

## **Bibliographie**

Andrews, N.C., Kotkow, K.J., Ney, P.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Orkin, S.H. (1993). 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* *90*, 11488-11492.

Armstrong, J.A., Bieker, J.J., and Emerson, B.M. (1998). A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell* *95*, 93-104.

Armstrong, J.A., and Emerson, B.M. (1996). NF-E2 disrupts chromatin structure at human beta-globin locus control region hypersensitive site 2 in vitro. *Mol Cell Biol* *16*, 5634-5644.

Bagga, R., and Emerson, B.M. (1997). An HMG I/Y-containing repressor complex and supercoiled DNA topology are critical for long-range enhancer-dependent transcription in vitro. *Genes Dev* *11*, 629-639.

Bagga, R., Michalowski, S., Sabnis, R., Griffith, J.D., and Emerson, B.M. (2000). HMG I/Y regulates long-range enhancer-dependent transcription on DNA and chromatin by changes in DNA topology. *Nucleic Acids Res* *28*, 2541-2550.

Bailey, A.S., and Fleming, W.H. (2003). Converging roads: evidence for an adult hemangioblast. *Exp Hematol* *31*, 987-993.

Bailey, A.S., Jiang, S., Afentoulis, M., Baumann, C.I., Schroeder, D.A., Olson, S.B., Wong, M.H., and Fleming, W.H. (2004). Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood* *103*, 13-19.

Bank, A., O'Neill, D., Lopez, R., Pulte, D., Ward, M., Mantha, S., and Richardson, C. (2005). Role of intergenic human gamma-delta-globin sequences in human hemoglobin switching and reactivation of fetal hemoglobin in adult erythroid cells. *Ann N Y Acad Sci* *1054*, 48-54.

Beauchemin, H. (2007). Étude de la fonction du promoteur foetal Agamma dans la régulation de la commutation de l'hémoglobine foetale à adulte. In Programme de Biologie Moléculaire, Université de Montréal (Montréal, Université de Montréal).

Beauchemin, H., Blouin, M.J., and Trudel, M. (2004). Differential regulatory and compensatory responses in hematopoiesis/erythropoiesis in alpha- and beta-globin hemizygous mice. *J Biol Chem* *279*, 19471-19480.

Beaudoin, M. (2003). BP1, un gène homéotique distal-less et son rôle dans l'érythropoïèse murine définitive. In Programme de Biologie Moléculaire, Université de Montréal (Montréal, Université de Montréal), pp. 149.



- Behringer, R.R., Ryan, T.M., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., and Townes, T.M. (1990). Human gamma- to beta-globin gene switching in transgenic mice. *Genes Dev* 4, 380-389.
- Bell, A.C., West, A.G., and Felsenfeld, G. (2001). Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic. *Science* 291, 447-450.
- Bellantuono, I. (2004). Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 607-620.
- Bender, M.A., Reik, A., Close, J., Telling, A., Epner, E., Fiering, S., Hardison, R., and Groudine, M. (1998). Description and targeted deletion of 5' hypersensitive site 5 and 6 of the mouse beta-globin locus control region. *Blood* 92, 4394-4403.
- Berg, P.E., Williams, D.M., Qian, R.L., Cohen, R.B., Cao, S.X., Mittelman, M., and Schechter, A.N. (1989). A common protein binds to two silencers 5' to the human beta-globin gene. *Nucleic Acids Res* 17, 8833-8852.
- Bieker, J.J., Ouyang, L., and Chen, X. (1998). Transcriptional factors for specific globin genes. *Ann N Y Acad Sci* 850, 64-69.
- Blouin, M.J., Beauchemin, H., Wright, A., De Paepe, M., Sorette, M., Bleau, A.M., Nakamoto, B., Ou, C.N., Stamatoyannopoulos, G., and Trudel, M. (2000). Genetic correction of sickle cell disease: insights using transgenic mouse models. *Nat Med* 6, 177-182.
- Bodine, D.M., and Ley, T.J., (1987). A enhancer element lies 3' to human  $\Lambda\gamma$  globin gene. *Embo J* 6, 2997-3004.
- Bulger, M., and Groudine, M. (1999). Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* 13, 2465-2477.
- Bungert, J., Dave, U., Lim, K.C., Lieu, K.H., Shavit, J.A., Liu, Q., and Engel, J.D. (1995). Synergistic regulation of human beta-globin gene switching by locus control region elements HS3 and HS4. *Genes Dev* 9, 3083-3096.
- Bungert, J., Tanimoto, K., Patel, S., Liu, Q., Fear, M., and Engel, J.D. (1999). Hypersensitive site 2 specifies a unique function within the human beta-globin locus control region to stimulate globin gene transcription. *Mol Cell Biol* 19, 3062-3072.
- Cantor, A.B., and Orkin, S.H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 21, 3368-3376.

- Chan, P.K., Ma, E.S., Philipsen, S., and Tan-Un, K.C. (2007). The study of sequence configuration and functional impact of the (AC)<sub>n</sub>(AT)<sub>x</sub>Ty motif in human beta-globin gene promoter. *Am J Hematol* 82, 342-348.
- Chase, M.B., Fu, S., Haga, S.B., Davenport, G., Stevenson, H., Do, K., Morgan, D., Mah, A.L., and Berg, P.E. (2002). BP1, a homeodomain-containing isoform of DLX4, represses the beta-globin gene. *Mol Cell Biol* 22, 2505-2514.
- Chase, M.B., Haga, S.B., Hankins, W.D., Williams, D.M., Bi, Z., Strovel, J.W., Obriecht, C., and Berg, P.E. (1999). Binding of HMG-I(Y) elicits structural changes in a silencer of the human beta-globin gene. *Am J Hematol* 60, 27-35.
- Chebloune, Y., Pagnier, J., Trabuchet, G., Faure, C., Verdier, G., Labie, D., and Nigon, V. (1988). Structural analysis of the 5' flanking region of the beta-globin gene in African sickle cell anemia patients: further evidence for three origins of the sickle cell mutation in Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4431-4435.
- Choi, K. (1998). Hemangioblast development and regulation. *Biochem Cell Biol* 76, 947-956.
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125, 725-732.
- Cohen-Barak, O., Erickson, D.T., Badowski, M.S., Fuchs, D.A., Klassen, C.L., Harris, D.T., and Brilliant, M.H. (2007). Stem cell transplantation demonstrates that Sox6 represses epsilon y globin expression in definitive erythropoiesis of adult mice. *Exp Hematol* 35, 358-367.
- Cohen, S.M., Bronner, G., Kuttner, F., Jurgens, G., and Jackle, H. (1989). Distal-less encodes a homeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature* 338, 432-434.
- Coleman, M.B., Lu, Z.H., Smith, C.M., 2nd, Adams, J.G., 3rd, Harrell, A., Plonczynski, M., and Steinberg, M.H. (1995). Two missense mutations in the beta-globin gene can cause severe beta thalassemia. Hemoglobin Medicine Lake (beta 32[B14]leucine-->glutamine; 98 [FG5] valine-->methionine). *J Clin Invest* 95, 503-509.
- Collis, P., Antoniou, M., and Grosveld, F. (1990). Definition of the minimal requirements within the human beta-globin gene and the dominant control region for high level expression. *EMBO J* 9, 233-240.
- Costantini, F., Radice, G. (1985). Developmental regulation of human globin genes in transgenic mice. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 50, 361-370.

- Crispino, J.D., Lodish, M.B., MacKay, J.P., and Orkin, S.H. (1999). Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Mol Cell* 3, 219-228.
- Dillon, N., and Grosveld, F. (1991). Human  $\gamma$ -globin gene silenced independently of other genes in the  $\beta$ -globin locus. *Nature (London)* 350, 252-254.
- Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87, 27-45.
- Dorfman, D.M., Wilson, D.B., Bruns, G.A., and Orkin, S.H. (1992). Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 267, 1279-1285.
- Doyonnas, R., Nielsen, J.S., Chelliah, S., Drew, E., Harra, T., Miyajima, A., and McNagny, K.M. (2005). Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood* 105, 4170-4178.
- Drew, L.R., Tang, D.C., Berg, P.E., and Rodgers, G.P. (2000). The role of trans-acting factors and DNA-bending in the silencing of human beta-globin gene expression. *Nucleic Acids Res* 28, 2823-2830.
- Drissen, R., Lindern, M., Kolbus, A., Driegen, S., Steinlein, P., Beug, H., Grosveld, F., and Philipsen, S. (2005). The erythroid phenotype of EKLF-null mice: defects in hemoglobin metabolism and membrane stability. *Mol Cell Biol* 25, 5205-5214.
- Dumitriu, B., Patrick, M.R., Petschek, J.P., Cherukuri, S., Klingmuller, U., Fox, P.L., and Lefebvre, V. (2006). Sox6 cell-autonomously stimulates erythroid cell survival, proliferation, and terminal maturation and is thereby an important enhancer of definitive erythropoiesis during mouse development. *Blood* 108, 1198-1207.
- Durand, C., and Dzierzak, E. (2005). Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica* 90, 100-108.
- Dzierzak, E., and Medvinsky, A. (1995). Mouse embryonic hematopoiesis. *Trends Genet* 11, 359-366.
- Ebb, D., Tang, D.C., Drew, L., Chin, K., Berg, P.E., and Rodgers, G.P. (1998). Identification of upstream regulatory elements that repress expression of adult beta-like globin genes in a primitive erythroid environment. *Blood Cells Mol Dis* 24, 356-369.

- Elion, J., Berg, P.E., Lapoumeroulie, C., Trabuchet, G., Mittelman, M., Krishnamoorthy, R., Schechter, A.N., and Labie, D. (1992). DNA sequence variation in a negative control region 5' to the beta-globin gene correlates with the phenotypic expression of the beta s mutation. *Blood* 79, 787-792.
- Enver, T., Ebens, A.J., Forrester, W.C., and Stamatoyannopoulos, G. (1989). The human beta-globin locus activation region alters the developmental fate of a human fetal globin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7033-7037.
- Enver, T., Raich, N., Ebens, A.J., Papayannopoulou, T., Costantini, F., and Stamatoyannopoulos, G. (1990). Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. *Nature* 344, 309-313.
- Epner, E., Reik, A., Cimborra, D., Telling, A., Bender, M.A., Fiering, S., Enver, T., Martin, D.I., Kennedy, M., Keller, G., *et al.* (1998). The beta-globin LCR is not necessary for an open chromatin structure or developmentally regulated transcription of the native mouse beta-globin locus. *Mol Cell* 2, 447-455.
- Farrell, C.M., Grinberg, A., Huang, S.P., Chen, D., Pichel, J.G., Westphal, H., and Felsenfeld, G. (2000). A large upstream region is not necessary for gene expression or hypersensitive site formation at the mouse beta-globin locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14554-14559.
- Feingold, E.A., Collins, F.S., Metherall, J.E., Stoeckert, C.J., Jr., Weissman, S.M., and Forget, B.G. (1985). Analysis of mutations associated with deletion and nondeletion hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Prog Clin Biol Res* 191, 107-124.
- Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., Hu, M., Martin, D.I., Enver, T., Ley, T.J., and Groudine, M. (1995). 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* 9, 2203-2213.
- Forget, B.G., Tuan, D. (1983). Molecular studies of mutations that increase Hb F production in man. *Prog Clin Biol Res* 134, 65-76.
- Forget, B.G. (1998). Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N Y Acad Sci* 850, 38-44.
- Forrester, W.C., Epner, E., Driscoll, M.C., Enver, T., Brice, M., Papayannopoulou, T., and Groudine, M. (1990). A deletion of the human beta-globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire beta-globin locus. *Genes Dev* 4, 1637-1649.

Forrester, W.C., Thompson, C., Elder, J.T., and Groudine, M. (1986). A developmentally stable chromatin structure in the human beta-globin gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1359-1363.

Fraser, P., Gribnau, J., and Trimborn, T. (1998). Mechanisms of developmental regulation in globin loci. *Curr Opin Hemato* 5(2), 139-144.

Fraser, P., Hurst, J., Collis, P., and Grosveld, F. (1990). DNaseI hypersensitive sites 1, 2 and 3 of the human beta-globin dominant control region direct position-independent expression. *Nucleic Acids Res* 18, 3503-3508.

Fraser, P., Pruzina S., Antoniou, M., and Grosveld, F. (1993). Each hypersensitive site of the human  $\beta$ -globin locus control region confers a different developmental pattern of expression to the globin genes *Genes Dev* 7, 106-113.

Friedmann, M., Holth, L.T., Zoghbi, H.Y., and Reeves, R. (1993). Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. *Nucleic Acids Res* 21, 4259-4267.

Fu, S., Stevenson, H., Strovel, J.W., Haga, S.B., Stamberg, J., Do, K., and Berg, P.E. (2001). Distinct functions of two isoforms of a homeobox gene, BP1 and DLX7, in the regulation of the beta-globin gene. *Gene* 278, 131-139.

Fu, S.W., Schwartz, A., Stevenson, H., Pinzone, J.J., Davenport, G.J., Orenstein, J.M., Gutierrez, P., Simmens, S.J., Abraham, J., Poola, I., *et al.* (2003). Correlation of expression of BP1, a homeobox gene, with estrogen receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res* 5, R82-87.

Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C., and Orkin, S.H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12355-12358.

Gaensler, K., Zhang, Z., Lin, C., Yang, S., Hardt, K. and Flebbe-Rehwaltd, L. (2003). Sequences in the  $\gamma$ - $\delta$  intergenic region are not required for stage-specific regulation of the human  $\beta$ -globin gene locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3379-33798.

Gilman, J.G., and Huisman, T.H. (1985). DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. *Blood* 66, 783-787.

Godin, I., Dieterlen-Lievre, F., and Cumano, A. (1995). Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 773-777.

- Gong, Q.H., Stern, J., and Dean, A. (1991). Transcriptional role of a conserved GATA-1 site in the human epsilon-globin gene promoter. *Mol Cell Biol* *11*, 2558-2566.
- Goodwin, A.J., McInerney, J.M., Glander, M.A., Pomerantz, O., and Lowrey, C.H. (2001). In vivo formation of a human beta-globin locus control region core element requires binding sites for multiple factors including GATA-1, NF-E2, erythroid Kruppel-like factor, and Sp1. *J Biol Chem* *276*, 26883-26892.
- Graubert, T.A., Hug, B.A., Wesselschmidt, R., Hsieh, C.L., Ryan, T.M., Townes, T.M., and Ley, T.J. (1998). Stochastic, stage-specific mechanisms account for the variegation of a human globin transgene. *Nucleic Acids Res* *26*, 2849-2858.
- Grosveld, F., van Assendelft, G.B., Greaves, D.R., and Kollias, G. (1987). Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell* *51*, 975-985.
- Haar, J.L., and Ackerman, G.A. (1971). Ultrastructural changes in mouse yolk sac associated with the initiation of vitelline circulation. *Anat Rec* *170*, 437-455.
- Han, L., Dias Figueiredo, M., Berghorn, K.A., Iwata, T.N., Clark-Campbell, P.A., Welsh, I.C., Wang, W., O'Brien T, P., Lin, D.M., and Roberson, M.S. (2007). Analysis of the gene regulatory program induced by the homeobox transcription factor distal-less 3 in mouse placenta. *Endocrinology* *148*, 1246-1254.
- Hardison, R., Slightom, J.L., Gumucio, D.L., Goodman, M., Stojanovic, N., and Miller, W. (1997). Locus control regions of mammalian beta-globin gene clusters: combining phylogenetic analyses and experimental results to gain functional insights. *Gene* *205*, 73-94.
- Harju, S., McQueen, K.J., and Peterson, K.R. (2002). Chromatin structure and control of beta-like globin gene switching. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ *227*, 683-700.
- Hodge, D., Coghill, E., Keys, J., Maguire, T., Hartmann, B., McDowall, A., Weiss, M., Grimmond, S., and Perkins, A. (2006). A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood* *107*, 3359-3370.
- Iscoe, N.N., and Sieber, F. (1975). Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture. *Exp Hematol* *3*, 32-43.
- Jimenez, G., Griffiths, S.D., Ford, A.M., Greaves, M.F., and Enver, T. (1992). Activation of the beta-globin locus control region precedes commitment to the erythroid lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 10618-10622.

- Johnson, G.R., and Moore, M.A. (1975). Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. *Nature* 258, 726-728.
- Kasahara, H., and Izumo, S. (1999). Identification of the in vivo casein kinase II phosphorylation site within the homeodomain of the cardiac tissue-specifying homeobox gene product Csx/Nkx2.5. *Mol Cell Biol* 19, 526-536.
- Katsantoni, E.Z., Langeveld, A., Wai, A.W., Drabek, D., Grosveld, F., Anagnou, N.P., and Strouboulis, J. (2003). Persistent gamma-globin expression in adult transgenic mice is mediated by HPFH-2, HPFH-3, and HPFH-6 breakpoint sequences. *Blood* 102, 3412-3419.
- Keller, G., Kennedy, M., Papayannopoulou, T., and Wiles, M.V. (1993). Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol* 13, 473-486.
- Kennedy, M., Firpo, M., Choi, K., Wall, C., Robertson, S., Kabrun, N., and Keller, G. (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 386, 488-493.
- Kirov, N.C., Lieberman, P.M., and Rushlow, C. (1996). The transcriptional corepressor DSP1 inhibits activated transcription by disrupting TFIIA-TBP complex formation. *EMBO J* 15, 7079-7087.
- Kollias, G., Wrighton, N., Hurst, J., and Grosveld, F. (1986). Regulated expression of human A gamma-, beta-, and hybrid gamma beta-globin genes in transgenic mice: manipulation of the developmental expression patterns. *Cell* 46, 89-94.
- Kong, S., Bohl, D., Li, C., and Tuan, D. (1997). Transcription of the HS2 enhancer toward a cis linked gene is independent of the orientation, position and distance of the enhancer relative to the gene. *Mol Cell Biol* 17, 3955-3965.
- Kulozik, A.E., Bail, S., Bellan-Koch, A., Bartram, C.R., Kohne, E., and Kleihauer, E. (1991). The proximal element of the beta globin locus control region is not functionally required in vivo. *J Clin Invest* 87, 2142-2146.
- Leder, A., Kuo, A., Shen, M.M., and Leder, P. (1992). In situ hybridization reveals co-expression of embryonic and adult alpha globin genes in the earliest murine erythrocyte progenitors. *Development* 116, 1041-1049.
- Lehming, N., Le Saux, A., Schuller, J., and Ptashne, M. (1998). Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7322-7326.

- Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.
- Li, G., Lim, K.C., Engel, J.D., and Bungert, J. (1998). Individual LCR hypersensitive sites cooperate to generate an open chromatin domain spanning the human beta-globin locus. *Genes Cells* 3, 415-429.
- Li, Q., Clegg, C., Peterson, K., Shaw, S., Raich, N., and Stamatoyannopoulos, G. (1997). Binary transgenic mouse model for studying the trans control of globin gene switching: evidence that GATA-1 is an in vivo repressor of human epsilon gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2444-2448.
- Li, Q., Peterson, K.R., Fang, X., and Stamatoyannopoulos, G. (2002a). Locus control regions. *Blood* 100, 3077-3086.
- Liu, Q., Tanimoto, K., Bungert, J., and Engel J.D., (1998). The  $\Lambda\gamma$ -globin 3' element provides no unique function(s) for human  $\beta$ -globin locus gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9944-9949
- Li, Q., Zhang, M., Han, H., Rohde, A., and Stamatoyannopoulos, G. (2002b). Evidence that DNase I hypersensitive site 5 of the human beta-globin locus control region functions as a chromosomal insulator in transgenic mice. *Nucleic Acids Res* 30, 2484-2491.
- Liu, D., Chang, J.C., Moi, P., Liu, W., Kan, Y.W., and Curtin, P.T. (1992). Dissection of the enhancer activity of beta-globin 5' DNase I-hypersensitive site 2 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3899-3903.
- Magis, W., and Martin, D.I. (1995). HMG-I binds to GATA motifs: implications for an HPFH syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 214, 927-933.
- Malik, P., and Arumugam, P.I. (2005). Gene Therapy for {beta}-Thalassemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology*, 45-50.
- Malik, P., Arumugam, P.I., Yee, J.K., and Puthenveetil, G. (2005). Successful correction of the human Cooley's anemia beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector flanked by the chicken hypersensitive site 4 chromatin insulator. *Ann N Y Acad Sci* 1054, 238-249.
- Man, Y.G., Fu, S.W., Schwartz, A., Pinzone, J.J., Simmens, S.J., and Berg, P.E. (2005). Expression of BP1, a novel homeobox gene, correlates with breast cancer progression and invasion. *Breast Cancer Res Treat* 90, 241-247.



- Mathews, C.H., Detmer, K., Boncinelli, E., Lawrence, H.J., and Largman, C. (1991). Erythroid-restricted expression of homeobox genes of the human HOX 2 locus. *Blood* 78, 2248-2252.
- Matsuoka, S., Tsuji, K., Hisakawa, H., Xu, M., Ebihara, Y., Ishii, T., Sugiyama, D., Manabe, A., Tanaka, R., Ikeda, Y., *et al.* (2001). Generation of definitive hematopoietic stem cells from murine early yolk sac and paraaortic splanchnopleures by aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells. *Blood* 98, 6-12.
- May, C., Rivella, S., Callegari, J., Heller, G., Gaensler, K.M., Luzzatto, L., and Sadelain, M. (2000). Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. *Nature* 406, 82-86.
- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906.
- Medvinsky, A.L., Samoylina, N.L., Muller, A.M., and Dzierzak, E.A. (1993). An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364, 64-67.
- Merika, M., and Orkin, S.H. (1993). DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol* 13, 3999-4010.
- Merlo, G.R., and Zerega, B. (2000). Multiple functions of Dlx genes. *Int J Dev Biol* 44 (6), 619-626.
- Milot, E., Strouboulis, J., Trimborn, T., Wijgerde, M., de Boer, E., Langeveld, A., Tan-Un, K., Vergeer, W., Yannoutsos, N., Grosveld, F., *et al.* (1996). Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* 87, 105-114.
- Moon, A.M., and Ley, T.J. (1990). 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* 87, 7693-7697.
- Morasso, M.I., Grinberg, A. (1999). Placental failure in mice lacking the homeobox gene Dlx3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1), 162-167.
- Morrison, S.J., Wandycz, A.M., Hemmati, H.D., Wright, D.E., and Weissman, I.L. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 124, 1929-1939.
- Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1, 661-673.

- Muller, A.M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E. (1994). Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* *1*, 291-301.
- Murray, P.D.F. (1932). The development in vitro of the blood of the early chick embryo. *Pro. R Soc Lond B Biol Sci* *11*, 497-521.
- Nakamura, S., Stock, D.W., Wydner, K.L., Bollekens, J.A., Takeshita, K., Nagai, B.M., Chiba, S., Kitamura, T., Freeland, T.M., Zhao, Z., *et al.* (1996). Genomic analysis of a new mammalian distal-less gene: *Dlx7*. *Genomics* *38*, 314-324.
- Ney, P.A., Sorrentino, B.P., Lowrey, C.H., and Nienhuis, A.W. (1990). Inducibility of the HS II enhancer depends on binding of an erythroid specific nuclear protein. *Nucleic Acids Res* *18*, 6011-6017.
- Nichols, K.E., Crispino, J.D., Poncz, M., White, J.G., Orkin, S.H., Maris, J.M., and Weiss, M.J. (2000). Familial dyserythropoietic anemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in *Gata1*. *Nat Genet* *24*, 266-270.
- Nishikawa, S.I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., and Kodama, H. (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* *125*, 1747-1757.
- Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R., and Grosveld, F. (1995). Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the *EKLF* gene. *Nature* *375*, 316-318.
- O'Neill, D., Yang, J., Erdjument-Bromage, H., Bornschlegel, K., Tempst, P., and Bank, A. (1999). 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* *96*, 349-354.
- O'Neill, D.W., Schoetz, S.S., Lopez, R.A., Castle, M., Rabinowitz, L., Shor, E., Krawchuk, D., Goll, M.G., Renz, M., Seelig, H.P., *et al.* (2000). An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol Cell Biol* *20*, 7572-7582.
- Panganiban, G., and Rubenstein, J.L. (2002). Developmental functions of the Distal-less/*Dlx* homeobox genes. *Development* *129*, 4371-4386.

- Park, G.T., Denning, M.F., and Morasso, M.I. (2001). Phosphorylation of murine homeodomain protein Dlx3 by protein kinase C. *FEBS Lett* 496, 60-65.
- Pauling, L., Itano, H.A., and et al. (1949). Sickle cell anemia a molecular disease. *Science* 110, 543-548.
- Pelosi, E., Valtieri, M., Coppola, S., Botta, R., Gabbianelli, M., Lulli, V., Marziali, G., Masella, B., Muller, R., Sgadari, C., *et al.* (2002). Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood* 100, 3203-3208.
- Perkins, A.C., Peterson, K.R., Stamatoyannopoulos, G., Witkowska, H.E., and Orkin, S.H. (2000). Fetal expression of a human Agamma globin transgene rescues globin chain imbalance but not hemolysis in EKLF null mouse embryos. *Blood* 95, 1827-1833.
- Perkins, A.C., Sharpe, A.H., and Orkin, S.H. (1995). Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* 375, 318-322.
- Persons, A.J., Allay ER, Ashmun RA, Orlic D, Jane SM, Cunningham JM, Nienhuis AW. (1999). Enforced expression of GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. *Blood Cells* 93, 488-499.
- Peterson, K.R., Clegg, C.H., Navas, P.A., Norton, E.J., Kimbrough, T.G., and Stamatoyannopoulos, G. (1996). 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* 93, 6605-6609.
- Peterson, K.R., and Stamatoyannopoulos, G. (1993). Role of gene order in developmental control of human gamma- and beta-globin gene expression. *Mol Cell Biol* 13, 4836-4843.
- Peterson, K.R., Zitnik, G., Huxley, C., Lowrey, C.H., Gnirke, A., Leppig, K.A., Papayannopoulou, T., and Stamatoyannopoulos, G. (1993). Use of yeast artificial chromosomes (YACs) for studying control of gene expression: correct regulation of the genes of a human beta-globin locus YAC following transfer to mouse erythroleukemia cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11207-11211.
- Price, J.A., Wright, J.T., Walker, S.J., Crawford, P.J., Aldred, M.J., and Hart, T.C. (1999). Tricho-dento-osseous syndrome and amelogenesis imperfecta with taurodontism are genetically distinct conditions. *Clin Genet* 56, 35-40.
- Raich, N., Clegg, C.H., Grofti, J., Romeo, P.H., and Stamatoyannopoulos, G. (1995). GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human epsilon-globin gene. *EMBO J* 14, 801-809.

- Raich, N., Enver, T., Nakamoto, B., Josephson, B., Papayannopoulou, T., and Stamatoyannopoulos, G. (1990). Autonomous developmental control of human embryonic globin gene switching in transgenic mice. *Science* 250, 1147-1149.
- Raich, N., Papayannopoulou, T., Stamatoyannopoulos, G., and Enver, T. (1992). Demonstration of a human epsilon-globin gene silencer with studies in transgenic mice. *Blood* 79, 861-864.
- Rammey, H., and Sharma, V. (2001). Structure and function of hemoglobin. In William's hematology, E. Beutler, Coller, B.S. and Litchman, M.A.K.T.J.S.U., eds, ed. (New York, USA, McGraw-Hill), pp. p.83-98.
- Reik, A., Telling, A., Zitnik, G., Cimbara, D., Epner, E., and Groudine, M. (1998). The locus control region is necessary for gene expression in the human beta-globin locus but not the maintenance of an open chromatin structure in erythroid cells. *Mol Cell Biol* 18, 5992-6000.
- Rossi, E., Faiella, A., Zeviani, M., Labeit, S., Florida, G., Brunelli, S., Cammarata, M., Boncinelli, E., and Zuffardi, O. (1994). Order of six loci at 2q24-q31 and orientation of the HOXD locus. *Genomics* 24, 34-40.
- Sabin, F.R. (1920). Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of the chick during the second day of incubation. *Contrib Embryol* 9, 213-262.
- Sanchez, M.J., Holmes, A., Miles, C., and Dzierzak, E. (1996). Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* 5, 513-525.
- Shen, W.F., Detmer, K., Mathews, C.H., Hack, F.M., Morgan, D.A., Largman, C., and Lawrence, H.J. (1992). Modulation of homeobox gene expression alters the phenotype of human hematopoietic cell lines. *EMBO J* 11, 983-989.
- Shimamoto, T., Nakamura, S., Bollekens, J., Ruddle, F.H., and Takeshita, K. (1997). Inhibition of DLX-7 homeobox gene causes decreased expression of GATA-1 and c-myc genes and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3245-3249.
- Shivdasani, R.A., and Orkin, S.H. (1995). Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8690-8694.
- Simeone, A., Acampora, D., Pannese, M., D'Esposito, M., Stornaiuolo, A., Gulisano, M., Mallamaci, A., Kastury, K., Druck, T., Huebner, K., *et al.* (1994). Cloning and

- characterization of two members of the vertebrate Dlx gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 2250-2254.
- Siminovitch, L., McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1963). The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol* *62*, 327-336.
- Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* *241*, 58-62.
- Stamatayannopoulos, G., and Grosveld, F. (2001). The molecular basis of blood diseases. In *The molecular basis of blood diseases* (Philadelphia, W. B. Saunders Publishing Co), pp. p. 135-182.
- Starck, J., Sarkar, R., Romana, M., Bhargava, A., Scarpa, A.L., Tanaka, M., Chamberlain, J.W., Weissman, S.M., and Forget, B.G. (1994). Developmental regulation of human gamma- and beta-globin genes in the absence of the locus control region. *Blood* *84*, 1656-1665.
- Sumiyama, K., Irvine, S.Q., Stock, D.W., Weiss, K.M., Kawasaki, K., Shimizu, N., Shashikant, C.S., Miller, W., and Ruddle, F.H. (2002). Genomic structure and functional control of the Dlx3-7 bigene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 780-785.
- Sutrias-Grau, M., Bianchi, M.E., and al. (1999). High mobility group protein 1 interacts specifically with the core domain of human TATA box-binding protein and interferes with transcription factor IIB within the pre-initiation complex. *J Biol Chem* *274* (3), 1628-1634.
- Takashi, S., Shimizu, R., and Suwabe, N., Takashi Kuroha, Keigyou Yoh, Jun Ohta, Shigeko Nishimura, Kim-Chew Lim, James Douglas Engel, Masayuki Yamamoto (2000). GATA factor transgens under GATA-1 locus control rescue germline GATA-1 mutant deficiencies. *Blood Cells* *96*, 910-916.
- Talbot, D., Collis, P., Antoniou, M., Vidal, M., Grosveld, F., and Greaves, D.R. (1989). A dominant control region from the human beta-globin locus conferring integration site-independent gene expression. *Nature* *338*, 352-355.
- Tanimoto, K., Liu, Q., Grosveld, F., Bungert, J., and Engel, J.D. (2000). Context-dependent EKLF responsiveness defines the developmental specificity of the human epsilon-globin gene in erythroid cells of YAC transgenic mice. *Genes Dev* *14*, 2778-2794.
- Tavian, M., Robin, C., Coulombel, L., and Peault, B. (2001). The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. *Immunity* *15*, 487-495.

Tewari, R., Gillemans, N., Wijgerde, M., Nuez, B., von Lindern, M., Grosveld, F., and Philipsen, S. (1998). Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) is active in primitive and definitive erythroid cells and is required for the function of 5'HS3 of the beta-globin locus control region. *EMBO J* 17, 2334-2341.

Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.

Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1964). Repair Processes in Irradiated Mouse Hematopoietic Tissue. *Ann N Y Acad Sci* 114, 115-125.

Townes, T.M., Lingrel, J.B., Chen, H.Y., Brinster, R.L., and Palmiter, R.D. (1985). Erythroid-specific expression of human beta-globin genes in transgenic mice. *EMBO J* 4, 1715-1723.

Trudel, M., and Costantini, F. (1987a). A 3' enhancer contributes to the stage-specific expression of the human beta-globin gene. *Genes Dev* 1, 954-961.

Trudel, M., and Costantini, F. (1987b). A 3' Upstream G gamma-globin and downstream beta-globin sequences required for stage-specific expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 11, 4024-4029.

Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W., and Orkin, S.H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.

Tsai, S.F., Strauss, E., and Orkin, S.H. (1991). Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev* 5, 919-931.

Tsang, A.P., Fujiwara, Y., Hom, D.B., and Orkin, S.H. (1998). Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev* 12, 1176-1188.

Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.J., Crossley, M., and Orkin, S.H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 90, 109-119.

Tuan, D., Kong, S., and Hu, K. (1992). Transcription of the hypersensitive site HS2 enhancer in erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11219-11223.

- Tuan, D., Solomon, W., Li, Q., and London, I.M. (1985). The "beta-like-globin" gene domain in human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6384-6388.
- Uguccioni, M., Meliconi, R., Lalli, E., Nesci, S., Delfini, C., Lucarelli, G., Gasbarrini, G., and Facchini, A. (1992). Serum amyloid A protein concentration in bone marrow transplantation for beta thalassaemia. *J Clin Pathol* 45, 348-351.
- Vakoc, C.R., Letting, D.L., Gheldof, N., Sawado, T., Bender, M.A., Groudine, M., Weiss, M.J., Dekker, J., and Blobel, G.A. (2005). Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol Cell* 17, 453-462.
- van Oostveen, J., Bijl, J., Raaphorst, F., Walboomers, J., and Meijer, C. (1999). The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leukemia* 13, 1675-1690.
- Wang, W. (2004). Sick cell anemia and other sickling syndromes. In *In Wintrobe's clinical hematology* J.P.e.a. Greer, ed. (Philadelphia,USA, Lippincott Williams and Wilkins), pp. pp.1263-1296.
- Weiss, M.J., and Orkin, S.H. (1995). GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol* 23, 99-107.
- Weissman, I.L., Anderson, D.J., and Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 387-403.
- Whitelaw, E., Tsai, S.F., Hogben, P., and Orkin, S.H. (1990). Regulated expression of globin chains and the erythroid transcription factor GATA-1 during erythropoiesis in the developing mouse. *Mol Cell Biol* 10, 6596-6606.
- Widlund, H.R., Cao, H., Simonsson, S., Magnusson, E., Simonsson, T., Nielsen, P.E., Kahn, J.D., Crothers, D.M., and Kubista, M. (1997). Identification and characterization of genomic nucleosome-positioning sequences. *J Mol Biol* 267, 807-817.
- Wijgerde, M., Grosveld, F., and Fraser, P. (1995). Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo. *Nature* 377, 209-213.
- Wu, A.M., Till, J.E., Siminovitch, L., and McCulloch, E.A. (1967). A cytological study of the capacity for differentiation of normal hemopoietic colony-forming cells. *J Cell Physiol* 69, 177-184.

- Wu, A.M., Till, J.E., Siminovitch, L., and McCulloch, E.A. (1968). Cytological evidence for a relationship between normal hemopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J Exp Med* 127, 455-464.
- Yamamoto, M., Takahashi, S., Onodera, K., Muraosa, Y., and Engel, J.D. (1997). Upstream and downstream of erythroid transcription factor GATA-1. *Genes Cells* 2, 107-115.
- Yi, Z., Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Kingsley, P.D., Fuchs, D.A., Erickson, D.T., Epner, E.M., Palis, J., and Brilliant, M.H. (2006). Sox6 directly silences epsilon globin expression in definitive erythropoiesis. *PLoS genetics* 2, e14.
- Yoder, M.C., and Hiatt, K. (1997). Engraftment of embryonic hematopoietic cells in conditioned newborn recipients. *Blood* 89, 2176-2183.
- Yoder, M.C., Hiatt, K., Dutt, P., Mukherjee, P., Bodine, D.M., and Orlic, D. (1997). Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. *Immunity* 7, 335-344.
- Zhang, H., and Hu, G. (1997). Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. *Mol Cell Bio* 17 (5), 2920-2932.
- Zoueva, O.P., and Rodgers, G.P. (2004). Inhibition of beta protein 1 expression enhances beta-globin promoter activity and beta-globin mRNA levels in the human erythroleukemia (K562) cell line. *Exp Hematol* 32, 700-708.



**Annexes**

## Annexe 1 :

### Vérification de l'intégrité du transgène $\beta$ BP1 $\beta$

Afin de s'assurer de l'intégrité du transgène BP1 chez nos souris simples transgéniques  $\beta$ BP1 $\beta$  nous avons analysé leur ADN génomique par Southern blot, ceci en utilisant une sonde de 4 Kb correspondant à la construction  $\beta$ BP1 $\beta$ . Cette sonde couvre donc le transgène en entier.

Figure A-1 : Schéma de la construction  $\beta$ BP1 $\beta$

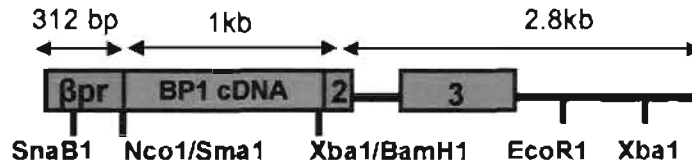
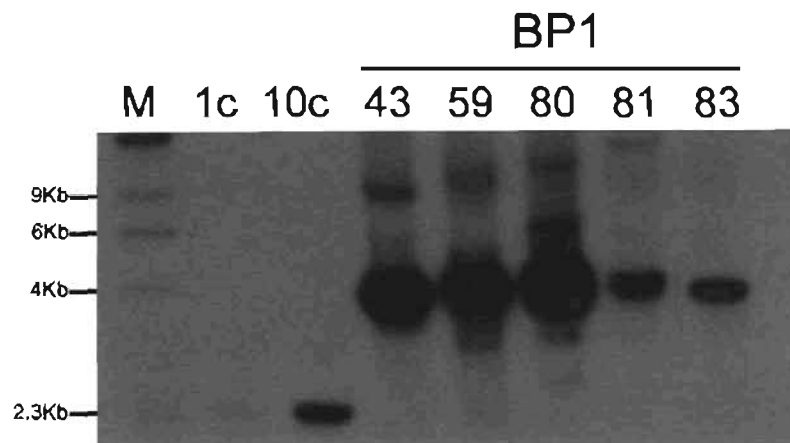


Figure A-2 : Analyse par Southern blot de l'intégrité du transgène BP1 chez les souris transgéniques  $\beta$ BP1 $\beta$ .

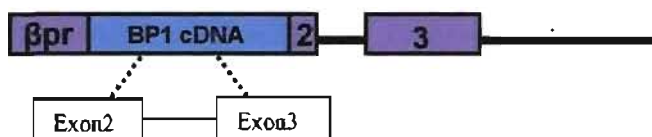


Légende : C : copies correspondant à la séquence partielle du transgène; M : marqueur de poids moléculaire  $\lambda$  Hind III; L'ADN génomique de chaque lignée a été digéré par BamH I

## Annexe 2 :

### Expression du transgène $\beta$ BP1 $\beta$

Figure A-3 : Analyse quantitative (Q-PCR) de l'expression du transgène BP1 dans la moelle osseuse des souris  $\beta$ BP1 $\beta$



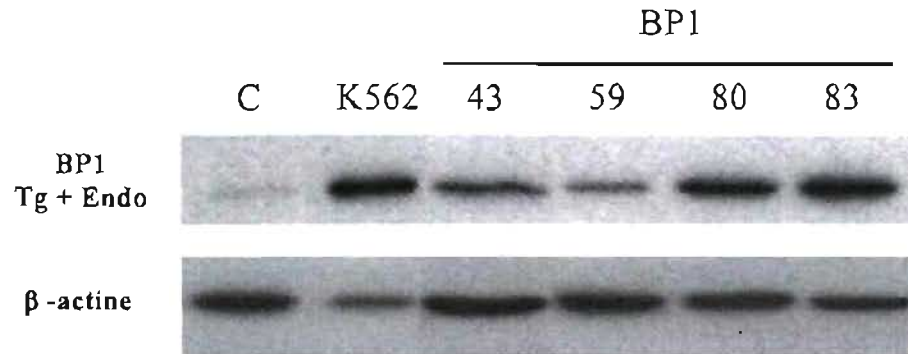
Souris	n	BP1/S16
Ctle	3	0.09 ± 0.05
BP1 43	3	0.22 ± 0.06
BP1 80	3	0.97 ± 0.58
BP1 83	3	0.33 ± 0.21
BP1 59	3	0.14 ± 0.00
BP1 81	3	1.30 ± 2.12

Légende : Ctle : souris sauvage de même fond génétique que les souris transgéniques (CBA/J x C57BL/6J). Les valeurs sont des unités relatives obtenues après normalisation de l'expression du transgène BP1 sur celle du gène ribosomale S16. Les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'écart-type.

### Annexe 3 :

## Expression protéique du transgène $\beta$ BP1 $\beta$

Figure A-4 : Détection de la protéine BP1 dans la moelle osseuse des souris transgéniques  $\beta$ BP1 $\beta$



Légende : Des extraits protéiques respectifs de 25  $\mu$ g et 100 $\mu$ g de cellules K562 et de cellules de moelle osseuse de souris adultes ont été déposés sur gel. L'anticorps utilisé est spécifique à la région N-terminale de la protéine humaine BP1; C : souris sauvages. K562 : contrôle positif pour la protéine sauvage BP1. La  $\beta$  actine est utilisée comme contrôle de chargement et sert aussi à la quantification de l'expression de la protéine BP1.

## Annexe 4 :

### Expression des gènes de $\beta$ globines adultes chez les souris $\beta$ BP1 $\beta$

Figure A-5a : Expression de  $\beta$  globine de souris dans la moelle osseuse totale des souris  $\beta$ BP1 $\beta$

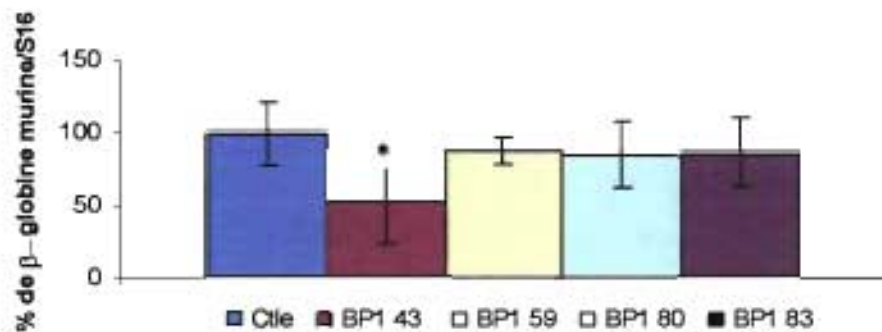
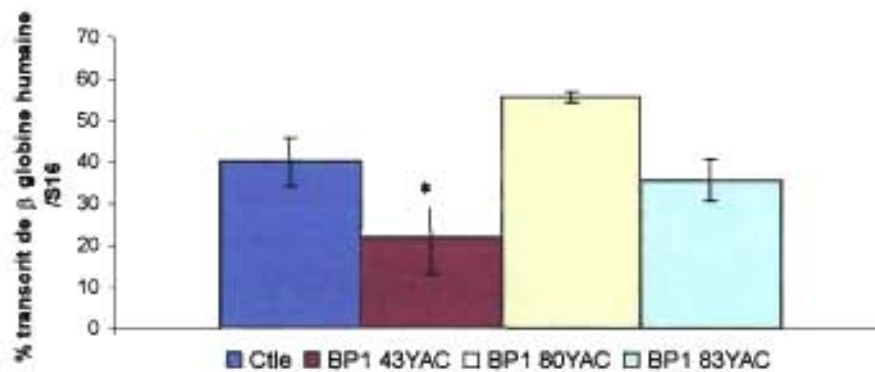


Figure A-5b : Expression des gènes humains de  $\beta$  globine adultes de souris  $\beta$ BP1 $\beta$



Légende : L'analyse de l'expression par PCR quantitatif a été effectuée à partir de cellules de moelle osseuse totale. Au moins trois souris ont servi aux analyses d'expression dans chacune des catégories. Les données d'expression de gènes de  $\beta$  globines chez les transgéniques exprimées en pourcentage sont basées sur une comparaison des niveaux d'expression de la  $\beta$  globine des contrôles à ceux des transgéniques (Ctle). a : Expression de gènes murins de  $\beta$  globine adulte chez les souris simples transgéniques  $\beta$  BP1 $\beta$ ; Ctle : souris sauvage (CBA/J x C57BL/6J); b : Expression du gène humain de  $\beta$  globine adulte chez les souris double transgéniques  $\beta$  BP1 $\beta$ / Yac- $\beta$  globine; Ctle : souris (CBA/J x C57BL/6J) YAC- $\beta$  globine, exempt du transgène  $\beta$ BP1 $\beta$ . \*p  $\leq$  0.05 selon le test statistique t-student.

## Annexe 5 :

### Expression du transgène BP1 dans les cellules érythroïdes de souris $\beta$ BP1 $\beta$

Tableau A-1 : Analyse d'expression de BP1 par PCR quantitatif.

Souris	n	BP1/S16	n	BP1/S16
		Ter 119 <sup>+</sup>		Ø Ter119
Ctle	4	$6 \times 10^{-4} \pm 5 \times 10^{-4}$	3	$0.09 \pm 0.05$
BP1 43	5	$0.88 \pm 0.78$	3	$0.22 \pm 0.06$
BP1 59	2	$0.02 \pm 0.003$	3	$0.14 \pm 0.01$
BP1 80	4	$0.94 \pm 0.43$	3	$0.97 \pm 0.58$
BP1 81	3	$0.25 \pm 0.40$	2	$1.30 \pm 2.12$
BP1 83	4	$0.13 \pm 0.05$	3	$0.33 \pm 0.21$

Légende : Ctle : souris sauvage de même fond génétique que les souris transgéniques (CBA/J x C57BL/6J). Les valeurs sont des unités relatives obtenues après normalisation de l'expression du transgène BP1 sur celle du gène ribosomale S16. Ter 119<sup>+</sup> : correspond à l'analyse d'expression à partir de cellules érythroïdes positives isolées de la moelle osseuse, avec une efficacité de tri de  $90\% \pm 463$ . Ø Ter119 : représente l'analyse d'expression à partir de cellules de moelle osseuse totale. Les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'écart-type.

## Annexe 6 :

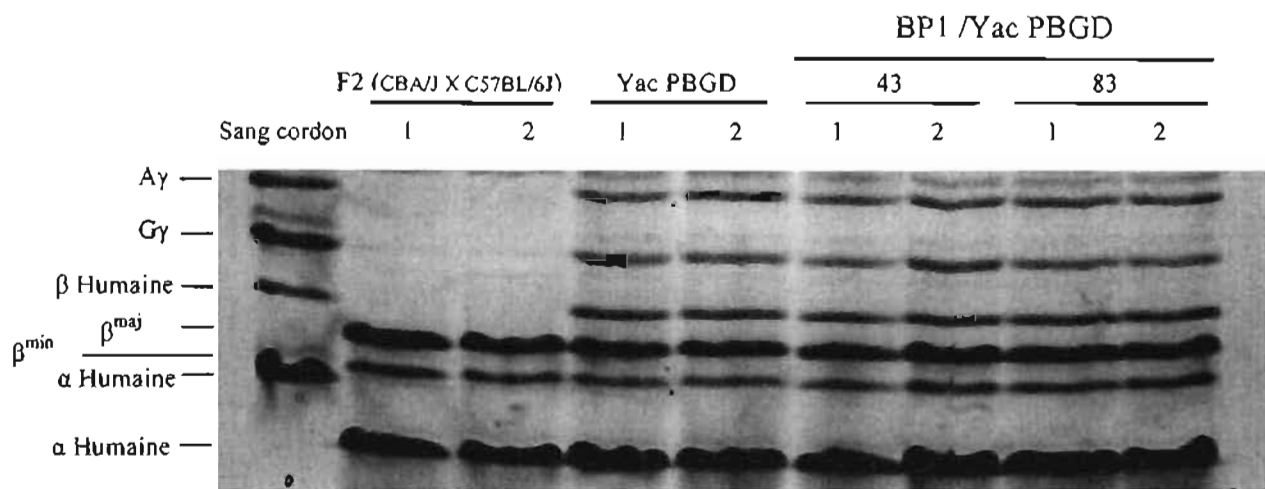
### Expression de gènes de $\beta$ globine lors de la commutation foetale à adulte

Tableau A-2 : Expression des gènes de  $\beta$  globines dans le foie foetal à E12.5.

Souris	n	$\epsilon$	$\gamma$	$\beta$
		%	%	%
C	5	1.90. $\pm$ 0.85	15.24 $\pm$ 3.09	81.86 $\pm$ 10.1
BP1 83Yacd/-	4	1.49 $\pm$ 0.67	18.14 $\pm$ 5.03	80.36 $\pm$ 5.65

Légende : L'analyse par Q-PCR de l'expression de  $\beta$  globine est rapportée par pourcentage de chacun des gènes de  $\beta$  globines par rapport à la somme totale des gènes de globine de type  $\beta$ . C : représente les souris, de même fond génétique que les doubles transgéniques, exprimant le locus entier de  $\beta$  globine mais exempts du transgène  $\beta$ BP1 $\beta$ . Les souris BP1 Yac d/- possèdent une délétion hémizygote des gènes de  $\beta$  globine adultes de souris.

## Annexe 7 :

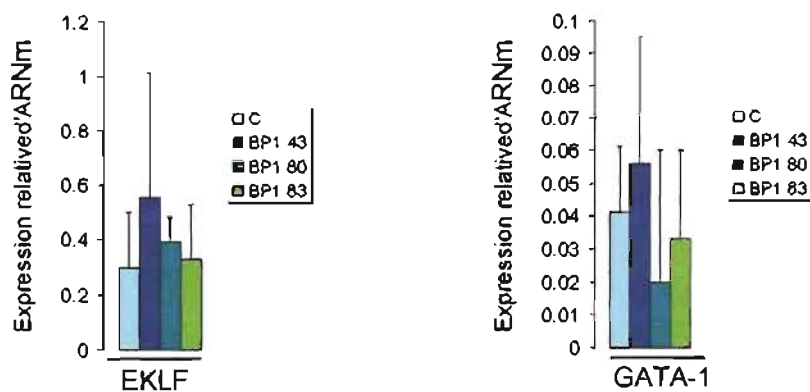
Figure A-6 : Expression de gènes de  $\beta$  globine chez les souris BPI/Yac PBGD

Légende : Les protéines (50 $\mu$ g) extraites du sang périphérique sont séparées sur un gel Urée-Triton page 12%. Deux lignées de souris BPI ont été analysés soit :  $\beta$ BPI $\beta$  43 et 83. Le sang de cordon sert de contrôle positif pour les chaînes de  $\beta$  globines humaines. La souris F2, une souris sauvage de même fond génétique que les souris transgéniques, sert de contrôle positif pour les chaînes de  $\beta$  globine de murines. La souris Yac PBGD possède uniquement le locus humain entier des gènes de  $\beta$  globine, modifié au niveau du promoteur de Ay. Les souris BPI/ Yac PBGD possèdent le locus modifié des gènes de  $\beta$  globines et le transgène humain BPI.



## Annexe 8 :

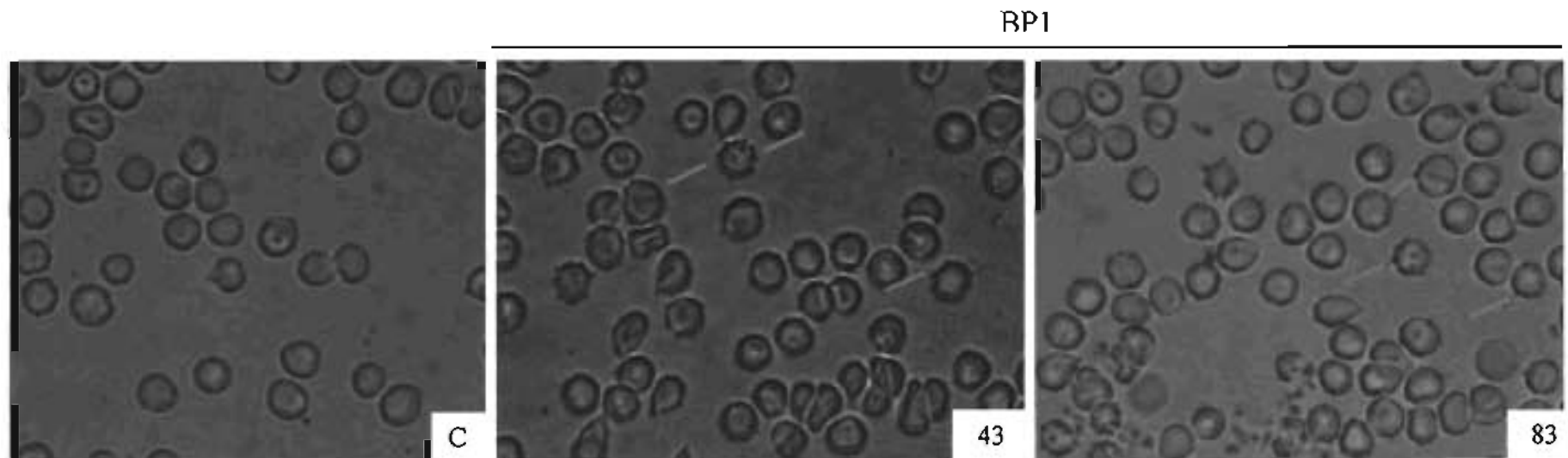
Figure A-7 : Expression de activateurs transcriptionnels GATA-1 et EKLF chez les souris  $\beta$ BP1 $\beta$



Légende : L'analyse d'expression a été effectuée par PCR en temps réel (PCR-Q) à partir de la moelle osseuse de cellules érythroïdes isolées de la moelle osseuse. Au moins 3 souris par lignée ont été utilisées. C : souris sauvage de même fond génétique que les souris transgéniques (CBA/JxC57BL/6J). Les valeurs sont des unités relatives obtenues après normalisation de l'expression du transgène BP1 sur celle du gène ribosomale S16.

## Annexe 9 :

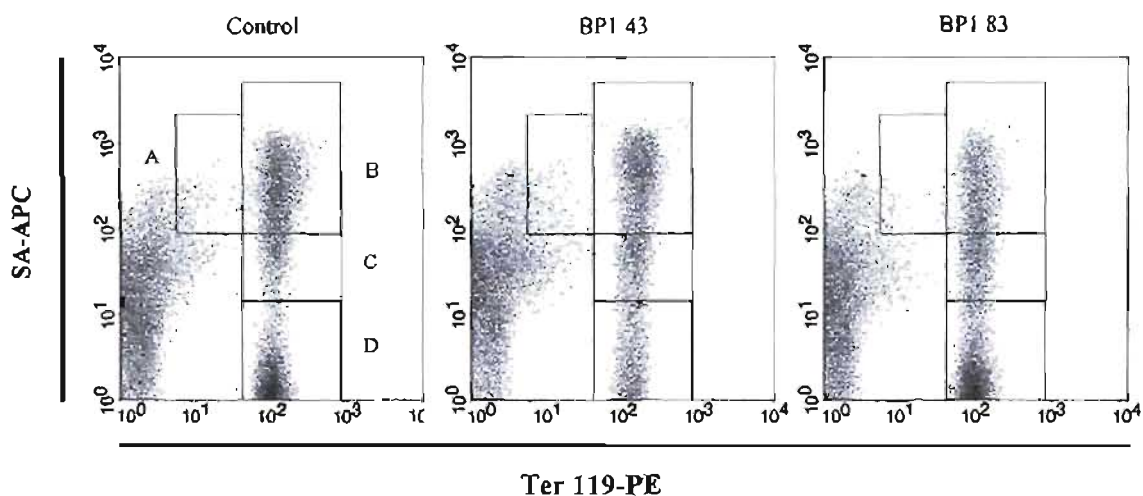
Figure A-8 : Détection des précipités de chaînes  $\alpha$  globine dans les érythrocytes de souris  $\beta\text{BP1}\beta$



Légende : L'analyse microscopique du sang périphérique coloré au crystal violet révèle la présence de corps de Heinz dans les globules rouges de lignées  $\beta\text{BP1}\beta$ . Les flèches en bleu indiquent les précipités de chaînes à la membrane des globules rouges. Toutes les souris utilisées sont d'âge semblable.

## Annexe 10 :

Figure A-9 : Analyse de la maturation des précurseurs érythroïdes



Légende : Séparation des précurseurs érythroïdes à partir de la moelle osseuse par cytométrie de flux. Au moins 3 souris par lignée ont été utilisées pour cette analyse. Toutes les souris utilisées étaient d'âge semblable. Les quatre sous populations de précurseurs sont identifiées selon leur stade de maturation en fonction de l'intensité de fluorescence des fluorochromes couplés au marqueur de surface érythroïde spécifique Ter 119 et le récepteur de la transferrine CD 71. Ces précurseurs regroupés en 4 sous populations distinctes délimitées par des carrés, sont classés du moins matures au plus matures selon l'intensité de la fluorescence des marqueurs de surface : les proérythroblastes (Ter119<sup>++</sup>CD71<sup>+++</sup>, region A), les érythroblastes basophiles (Ter119<sup>+++</sup>CD71<sup>+++</sup>, region B), les érythroblastes polychromatophiles (Ter119<sup>+++</sup>CD71<sup>-</sup>, region C), et les érythroblastes orthochromatophiles (Ter119<sup>+++</sup>CD71<sup>+</sup>, region D). Parmi toutes les lignées  $\beta$ BP1 $\beta$  analysées uniquement la lignée  $\beta$ BP1 $\beta$  43 (n=4) a démontré une diminution significative (4 %) des précurseurs tardifs (érythroblastes orthochromatophiles).  $p \leq 0.05$  selon le test statistique *t*-student.

## Annexe 11:

Tableau A-3 : Paramètres hématologiques de souris  $\beta$ BP1 $\beta$

Souris	n	Réticulocytes (%)		
		L	M	H
C	4	57.7 $\pm$ 3.2	34.5 $\pm$ 1.5	7.8 $\pm$ 1.7
BP1 43	6	46.7 $\pm$ 6.2 <sup>b</sup>	38.5 $\pm$ 4.6 <sup>b</sup>	14.7 $\pm$ 5.6 <sup>c</sup>
BP1 83	5	47.3 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	41.7 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	11.0 $\pm$ 2.4 <sup>c</sup>

Légende : L'analyse de ces paramètres hématologiques a été effectuée à partir du sang périphérique des souris. Les sigles L, M et H représentent la concentration du matériel nucléaire dans les réticulocytes ; L : faible contenu en ARN, M : contenu moyen en ARN; et H : contenu élevé en ARN; a:  $p < 0.001$ ; b:  $p < 0.01$ ; c:  $p \leq 0.05$  selon le test statistiques *t*-student.

## Annexe 12:

Tableau A-4 : Quantification de la cellularité et des progéniteurs érythroïdes précoces de la moelle osseuse

souris	n	Nbre de $\phi$ /Fémur $10^7$	CFU-e	BFU-e
ctl	4	$3.64 \pm 0.56$	$22755 \pm 4348$	$10295 \pm 2387$
BP1 43	4	$2.47 \pm 0.87$	$20735 \pm 2896$	$11843 \pm 2345$
BP1 83	$n \geq 3$	$3.41 \pm 1.04$	$18525 \pm 7891$	$7499 \pm 2518$

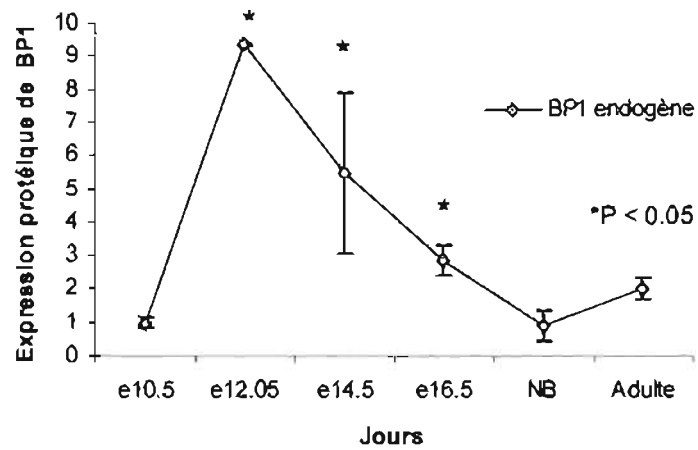
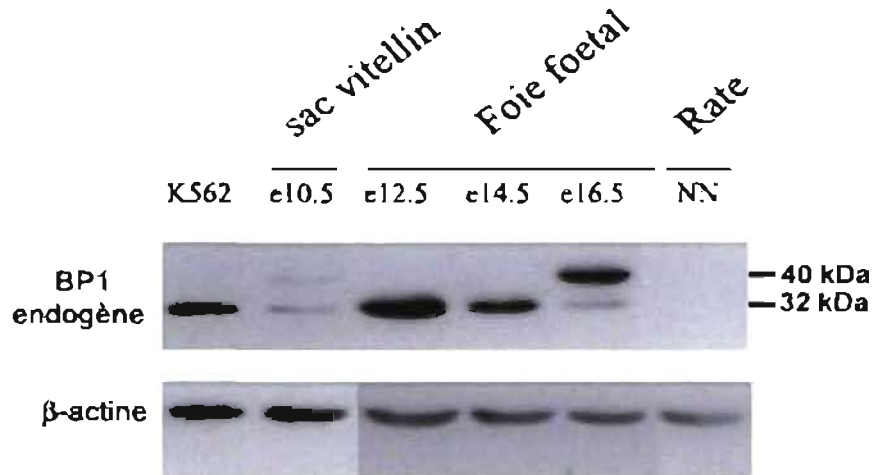
Tableau A-5 : Données physiologiques

souris	n	Ratio poids rate/poids du corps (%)
ctl	3	$0.30 \pm 0.08$
BP1 43	6	$0.31 \pm 0.09$
BP1 83	4	$0.33 \pm 0.19$

Les souris sont toutes d'âge similaire (3-5mois)

## Annexe 13:

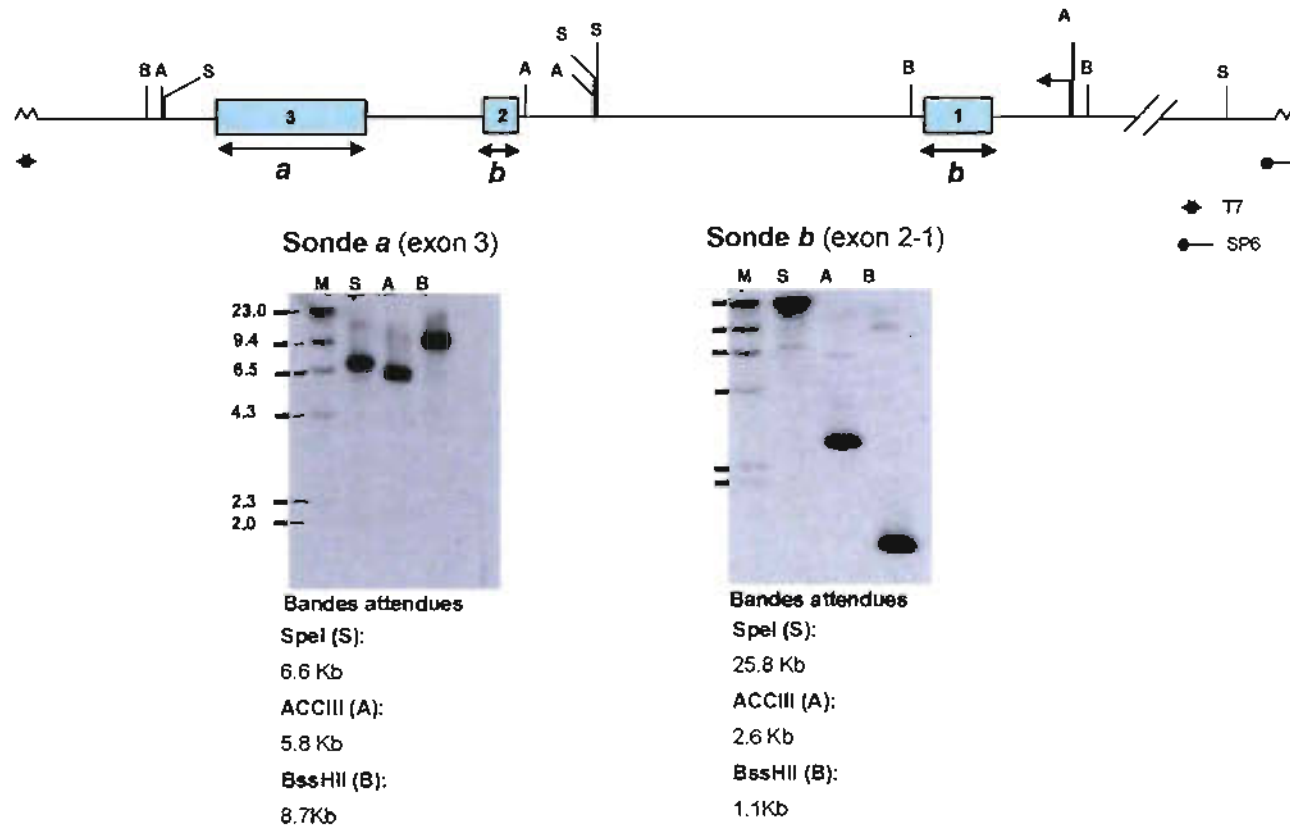
Figure A-10 : Profil d'expression de la protéine murine BP1



Légende : Des aliquots de 90  $\mu$ g de protéines, extraites de tissus érythroïdes de souris sauvages, ont été analysées sur gel SDS-Page 12% d'acrylamide. L'anticorps spécifique à la région N-terminale de la protéine humaine BP1 a été utilisé pour révéler la protéine murine BP1 de 32kDa. Le profil d'expression de la protéine murine de 32 kDa montre que BP1 murin est fortement exprimé dans le foie fœtal à E12.5.

**Annexe 14**

**Figure A-11 : Analyse de l'intégrité du Bac du gène murin BP1**



Légende : Le Bac BP1 murin a été caractérisé par Southern blot en utilisant des sondes générées à partir du cDNA de BP1 humain.. La sonde a (XhoI-BsrGI) reconnaît l'exon 3 du gène BP1 murin et la sonde b (XhoI-SphI) reconnaît les exons 2et1 du gène murin. Le profil de digestion correspond à celui du gène *distal-less* murin *Dlx4*. T7 et Sp6 indique l'orientation de l'insert dans le BAC.