



Université de Montréal

**Rôle du facteur de transcription BP1 dans  
la régulation des gènes du locus humain de  $\beta$ -globine**

par

**Nicolas Ah-Son**

Programme de biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M.Sc.) en Biochimie

Option Génétique moléculaire

Avril 2013

© Nicolas Ah-Son, 2013

Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

**Rôle du facteur de transcription BP1 dans  
la régulation des gènes du locus humain de  $\beta$ -globine**

présenté par :

**Nicolas Ah-Son**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Dre Muriel Aubry**  
Présidente-rapportrice

**Dre Marie Trudel**  
Directrice de recherche

**Dr Éric Lécuyer**  
Membre du jury

## Résumé

Le facteur de transcription BP1 humain est exprimé dans les cellules érythroïdes pendant le développement fœtal mais son niveau d'expression est réduit au stade adulte. Les études antérieures *in vitro* ont montré que BP1 est un répresseur du gène adulte de  $\beta$ -globine mais sa fonction dans la régulation des gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$  n'a pas été abordée à ce jour. Dans notre étude, nos analyses de BP1 humain ont été menées *in vivo* au stade embryonnaire en utilisant une lignée de souris transgénique surexprimant BP1 dans les cellules érythroïdes définitives murines. Au niveau protéique, BP1 humain est exprimé aux âges E12.5 et E13.5 dans les cellules érythroïdes fœtales des embryons transgéniques. Toutefois, les niveaux de BP1 humain ne perturbent pas l'érythropoïèse définitive fœtale: les embryons transgéniques ne sont pas anémiques et ne meurent pas *in utero*. La surexpression de BP1 humain altère tout de même le niveau endogène des facteurs de transcription Ikaros et SOX6 impliqués dans la régulation des gènes de  $\beta$ -globine durant l'érythropoïèse définitive fœtale murine. Chez les embryons doubles transgéniques exprimant BP1 et les gènes humains de  $\beta$ -globine à E12.5, l'expression du gène adulte  $\beta$  est réduite alors que celle des gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$  est non réprimée. Les mesures d'expression des gènes humains de  $\beta$ -globine effectuées en absence d'Ikaros à E12.5 précisent le rôle de BP1 humain dans l'activation du gène embryonnaire  $\epsilon$ . Dans les cellules érythroïdes fœtales murines dépourvues d'Ikaros à E12.5, BP1 humain augmente grandement l'expression des facteurs de transcription EKLF et BCL11A et semble dérprimer l'expression de SOX6, ce qui conduit à une répression des gènes fœtaux et une activation du gène adulte  $\beta$  au jour embryonnaire murin suivant. Puisque BP1 atténue l'altération de l'expression des gènes fœtaux et adultes causée par l'absence d'Ikaros, nous proposons que BP1 et Ikaros soient liés dans les mécanismes de transcription des gènes humains de  $\beta$ -globine.

**Mots-clés :** BP1, facteur de transcription, érythropoïèse,  $\beta$ -globine, Ikaros.

## Abstract

The transcription factor BP1 is expressed in erythroid cells during fetal development but is downregulated at adult stage. *In vitro* previous studies revealed that BP1 acts as a repressor of adult  $\beta$ -globin gene expression but its function in  $\epsilon$  and  $\gamma$  globin gene regulation has not been investigated so far. In our studies, BP1 functions analyses were proceeded *in vivo* at embryonic stage by using a transgenic mouse line overexpressing human BP1 in murine definitive erythroid cells. At protein level, human BP1 is expressed in E12.5 and E13.5 fetal erythroid cells of transgenic embryos. However, levels of human BP1 do not impair murine fetal definitive erythropoiesis : transgenic embryos are not anemic and survive during gestation. Overexpression of human BP1 impairs, nonetheless, endogenous level of the transcription factors Ikaros and SOX6 involved in  $\beta$ -globin gene regulation during murine fetal definitive erythropoiesis. In double transgenic mice expressing BP1 and human  $\beta$ -globin genes at embryonic day E12.5,  $\beta$  gene expression is reduced whereas  $\epsilon$ - and  $\gamma$ -globin genes are not repressed. Measurements of  $\beta$ -globin gene expression in absence of Ikaros pinpoint the role of human BP1 in embryonic  $\epsilon$ -globin gene activation. In E12.5  $Ik^{-/-}$  murine fetal erythroid cells, human BP1 highly increases EKLF and BCL11A transcription level and seems to derepress SOX6 expression which lead to  $\gamma$  silencing and  $\beta$  activation at E13.5. Since BP1 attenuates globin gene alterations caused by absence of Ikaros, we propose that BP1 and Ikaros are linked in transcriptional mechanisms of human  $\beta$ -globin genes.

**Keyword:** BP1, transcription factor, erythropoiesis,  $\beta$ -globin, Ikaros.

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Liste des figures .....	ix
Liste des tableaux.....	x
Liste des abréviations et des symboles .....	xi
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1: Introduction.....	15
1.1 Érythropoïèse et développement.....	15
1.1.1 Caractéristiques de l'érythropoïèse .....	15
1.1.2 L'érythropoïèse primitive embryonnaire.....	16
1.1.3 L'érythropoïèse définitive fœtale et adulte.....	18
1.1.4 Expression des marqueurs de surface des érythrocytes .....	19
1.2 L'hémoglobine.....	20
1.2.1 Structure et rôle dans le sang .....	20
1.2.2 Précurseurs érythroïdes et biosynthèse de l'hémoglobine .....	21
1.2.3 Synthèse d'hémoglobines durant le développement humain.....	22
1.3 Les hémoglobinopathies .....	25
1.3.1 L'anémie falciforme .....	26
1.3.1 Les $\beta$ -thalassémies .....	29
1.3.1 La persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale .....	30
1.3.1 Compréhension de la régulation des gènes de $\beta$ -globine.....	33
1.4 Étude des gènes humains de $\beta$ -globine chez la souris.....	34
1.4.1 Le locus de $\beta$ -globine chez la souris <i>Mus musculus</i> .....	34
1.4.2 La souris transgénique $\beta$ -YAC .....	35
1.5 Le $\beta$ LCR.....	36
1.5.1 Structure et rôle du $\beta$ LCR.....	36
1.5.2 Modèles de régulation des gènes par le $\beta$ LCR .....	39
1.6 Les facteurs de transcription.....	42
1.6.1 La famille GATA .....	42
1.6.1.1 Caractéristique de la famille GATA .....	42
1.6.1.2 GATA1 .....	42

1.6.1.3 Rôle de GATA1 dans l'érythropoïèse.....	43
1.6.1.4 Régulation de l'érythropoïèse par GATA1 et GATA2.....	44
1.6.1.5 Friend of GATA.....	45
1.6.1.6 Interactions protéiques de GATA1 .....	46
1.6.2 Sp1 .....	46
1.6.3 KLF1/EKLF .....	47
1.6.3.1 EKLF, cible de GATA1 .....	47
1.6.3.2 Rôle d'EKLF dans l'érythropoïèse définitive.....	47
1.6.3.3 Rôle d'EKLF dans l'érythropoïèse primitive.....	49
1.6.3.4 Importance d'EKLF dans la commutation fœtale-adulte.....	49
1.6.3.5 Régulation des gènes fœtaux par EKLF et BCL11A .....	50
1.6.3.5 EKLF, BCL11A et SOX6 .....	52
1.6.3.6 KLF1, KLF2 et <i>c-myc</i> .....	53
1.6.3.7 Interactions protéine-protéine impliquant EKLF.....	55
1.6.4 Ikaros.....	55
1.6.4.1 La famille Ikaros .....	55
1.6.4.2 Expression d'Ikaros dans l'hématopoïèse.....	56
1.6.4.3 Rôle d'Ikaros dans l'érythropoïèse .....	56
1.6.4.4 Ikaros dans la régulation des gènes de $\beta$ -globine.....	58
1.6.4.5 Le complexe Pyr et la commutation fœtale-adulte .....	58
1.6.4.6 Mécanisme de la commutation de l'hémoglobine par Ikaros .....	59
1.6.5 BP1 .....	60
1.6.5.1 BP1, un membre de la famille DLX .....	60
1.6.5.2 Expression de BP1 .....	62
1.6.5.3 Rôle de BP1 dans l'érythropoïèse.....	62
1.6.5.4 BP1, BP2 et les protéines de type HMG.....	64
1.6.5.5 BP1 et l'anémie falciforme .....	66
Objectif de maîtrise.....	67
Chapitre 2 : Matériels et méthodes .....	68
2.1 Les souris.....	68
2.1.1 Les souris transgéniques BP1 <sup>43</sup> .....	68
2.1.2 Les souris transgéniques $\beta$ -YAC .....	69
2.1.3 La souris Ikaros-nulle .....	69

2.2	Génotypage des souris.....	70
2.2.1	Extraction de l'ADN génomique des souris .....	70
2.2.2	SouthernBlot .....	70
2.2.3	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	71
2.2.4	Électrophorèse de l'hémoglobine.....	72
2.3	Les embryons transgéniques .....	72
2.3.1	BP1 <sup>43</sup> .....	72
2.3.2	$\beta$ -YAC et BP1 <sup>43</sup> ; $\beta$ -YAC .....	73
2.3.3	Ik <sup>-/-</sup> ; $\beta$ -YAC et BP1 <sup>43</sup> ; Ik <sup>-/-</sup> ; $\beta$ -YAC .....	73
2.3.4	Prélèvement des tissus et organes érythroïdes .....	73
2.4	Extraction de l'ARN et transcription inverse.....	74
2.4.1	Isolation et vérification de l'intégrité de l'ARN .....	74
2.4.2	Traitement à la DNase .....	74
2.4.3	Transcription inverse.....	74
2.5	PCR quantitatif en temps réel.....	75
2.5.1	Condition d'amplification.....	75
2.5.2	Analyse des résultats.....	75
2.6	WesternBlot.....	77
2.6.1	Lyse cellulaire .....	77
2.6.2	Quantification et préparation des échantillons.....	77
2.6.3	Migration et transfert des protéines .....	77
2.6.4	Hybridation et détection.....	78
2.6.5	Analyse des résultats.....	78
2.7	Analyses de séquences .....	79
2.7.1	Obtention des régions régulatrices.....	79
2.7.2	Identification des sites de liaison potentiels de BP1 .....	79
2.7.3	Identification des sites de liaison potentiels d'Ikaros.....	79
Chapitre 3: Résultats .....		80
3.1	Surexpression de BP1 humain au stade embryonnaire .....	80
3.1.1	Les embryons BP1 <sup>43</sup> .....	80
3.1.2	Expression de BP1 humain (ARN).....	81
3.1.3	Expression de la glycophorine A (GPA).....	82
3.1.4	Expression de BP1 humain (protéine) .....	83

3.1.5 Expression d'Ikaros, EKLF, BCL11A et SOX6.....	84
3.2 BP1 et les gènes humains de $\beta$ -globine .....	86
3.3 Régulation des gènes de $\beta$ -globines par BP1 et Ikaros .....	88
3.3.1 Profil d'expression des $\beta$ -globines en absence d'Ikaros .....	89
3.3.2 Expression d' $\epsilon$ , $\gamma$ et $\beta$ dans le foie fœtal à E12.5 .....	90
3.3.3 Expression d' $\epsilon$ , $\gamma$ et $\beta$ dans le foie fœtal à E13.5 .....	92
3.3.4 Expression des facteurs de transcription à E12.5 et E13.5 .....	93
3.3.4.1 Expression d'EKLF en absence d'Ikaros.....	93
3.3.4.2 Expression de BCL11A en absence d'Ikaros.....	94
3.3.4.3 Expression de SOX6 en absence d'Ikaros .....	95
3.4 Identification des sites de liaison de BP1 et d'Ikaros .....	96
3.4.1 Sites de liaison de BP1 dans EKLF, BCL11A et SOX6.....	97
3.4.2 Sites de liaison d'Ikaros dans EKLF, BCL11A et SOX6.....	97
Chapitre 4: Discussion .....	98
4.1 Rôle de BP1 dans l'érythropoïèse fœtale murine.....	98
4.1.1 Niveau d'expression de BP1 humain dans le foie fœtal .....	99
4.1.2 Impact de BP1 humain dans les cellules érythroïdes BP1 <sup>43</sup> .....	101
4.2 Régulation des gènes humains de $\beta$ -globine par BP1 .....	104
4.2.1 Répression du gène adulte humain $\beta$ au stade embryonnaire .....	104
4.2.2 Régulation des gènes $\epsilon$ et $\gamma$ par BP1 ? .....	105
4.3 Rôle de BP1 en absence d'Ikaros.....	106
4.3.1 Altération de l'expression d' $\epsilon$ , $\gamma$ et $\beta$ en absence d'Ikaros .....	106
4.3.2 Atténuation de la perte d'Ikaros en présence de BP1 .....	108
Conclusions et perspectives .....	110
Bibliographie.....	112
Annexe 1 .....	I

## Liste des figures

### 1. Introduction

<b>Figure 1.1.</b> Différenciation des précurseurs érythroïdes .....	16
<b>Figure 1.2.</b> Énucléation des cellules érythroïdes dans le foie fœtal .....	17
<b>Figure 1.3.</b> Protéines transmembranaires de l'érythrocyte.....	19
<b>Figure 1.4.</b> L'hémoglobine adulte humaine .....	21
<b>Figure 1.5.</b> Expression ontogénique des gènes du locus humain de $\beta$ -globine.....	23
<b>Figure 1.6.</b> Aspect des érythrocytes normaux et falciformes.....	26
<b>Figure 1.7.</b> Altération du flux sanguin par les érythrocytes falciformes.....	28
<b>Figure 1.8.</b> Corps de Heinz dans les cellules érythroïdes.....	30
<b>Figure 1.9.</b> Mutations et délétions responsables de l'HPFH.....	32
<b>Figure 1.10.</b> Distribution des hémoglobinopathies .....	33
<b>Figure 1.11.</b> Expression ontogénique des gènes du locus murin de $\beta$ -globine .....	35
<b>Figure 1.12.</b> Les modèles de régulation génique par le $\beta$ LCR.....	41
<b>Figure 1.13.</b> EKLF et la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte .....	52
<b>Figure 1.14.</b> Les isoformes d'Ikaros .....	56
<b>Figure 1.15.</b> Ikaros et la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte .....	59
<b>Figure 1.16.</b> BP1, une isoforme de DLX4 .....	61
<b>Figure 1.17.</b> Sites de liaison de BP1, BP2 et des protéines HMG .....	65

### 2. Matériels et méthodes

<b>Figure 2.1.</b> Construction $\beta$ BP1 $\beta$ .....	69
---	----

### 3. Résultats

<b>Figure 3.1.</b> Absence de phénotype chez les embryons transgéniques BP1 <sup>43</sup> .....	80
<b>Figure 3.2.</b> Expression de BP1 murin et humain dans le foie fœtal.....	81
<b>Figure 3.3.</b> Expression de la glycophorine A.....	82
<b>Figure 3.4.</b> Expression de la protéine BP1 murine et humaine dans le foie fœtal .....	83
<b>Figure 3.5.</b> Expression d'Ikaros dans les cellules érythroïdes fœtales.....	84
<b>Figure 3.6.</b> Expression d'EKLF dans les cellules érythroïdes fœtales.....	85
<b>Figure 3.7.</b> Expression de BCL11A dans cellules érythroïdes fœtales .....	85
<b>Figure 3.8.</b> Expression de SOX6 dans les cellules érythroïdes fœtales .....	86
<b>Figure 3.9.</b> Profil d'expression des $\beta$ -globines humaines en présence de BP1.....	87
<b>Figure 3.10.</b> Expression des gènes humains de $\beta$ -globine dans le foie fœtal.....	88
<b>Figure 3.11.</b> Phénotype des embryons Ik <sup>+/+</sup> et Ik <sup>-/-</sup> .....	89
<b>Figure 3.12.</b> Profil d'expression des $\beta$ -globines humaines en absence d'Ikaros .....	89
<b>Figure 3.13.</b> Expression des gènes humains de $\beta$ -globine à E12.5 .....	91
<b>Figure 3.14.</b> Expression des gènes humains de $\beta$ -globine à E13.5 .....	92
<b>Figure 3.15.</b> Expression relative d'EKLF en absence d'Ikaros.....	93
<b>Figure 3.16.</b> Expression relative de BCL11A en absence d'Ikaros .....	95
<b>Figure 3.17.</b> Expression relative de SOX6 en absence d'Ikaros .....	96

## Liste des tableaux

### 1. Introduction

<b>Tableau I-I.</b> Les hémoglobines humaines.....	25
<b>Tableau I-II.</b> BP1 et polymorphisme dans le site de liaison -530 .....	66

### 2. Matériels et méthodes

<b>Tableau II-I.</b> Amorces pour géotypage des souris $\beta$ -YAC et Ikaros.....	71
<b>Tableau II-II.</b> Amorces pour PCR quantitatif .....	76

### 3. Résultats

<b>Tableau III-I.</b> Sites de liaison potentiels de BP1 .....	97
<b>Tableau III-II.</b> Sites de liaison potentiels d'Ikaros .....	97

## Liste des abréviations et des symboles

$\alpha$	Alpha, $\alpha$ -globine
ACH	Active Chromatin Hub
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALA	Aminolevulinic acid synthase
ANOVA	Analysis Of Variance
ARN	Acide ribonucléique
$\beta$	Beta, $\beta$ -globine
BCL11A	B-cell lymphoma/leukemia 11A
BFU-e	Burst-forming unit-erythroid
$\beta$ LCR	$\beta$ -globine locus control region
BP1	$\beta$ -protein 1
BP2	$\beta$ -protein 2
BSA	Bovine serum albumine
CD	Cluster of differentiation
CFU-e	Cluster-forming unit-erythroid
ChIP	Chromatine Immunoprecipitation
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CTCF	CCCTC-binding factor
$\delta$	Delta, $\delta$ -globine
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DII	Distal-less
DTT	Dithiothreitol
$\epsilon$	Epsilon, $\epsilon$ -globine
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EKLF	Erythroid krüppel-like factor
EryP-CFC	Primitive erythroid colony-forming cells
FOG-1	Friend of GATA-1
$\gamma$	Gamma, $\gamma$ -globine
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GPA	Glycophorine A
GWAS	Genome-Wide Association Studies
Hb	Hémoglobine
HB	Homeobox
HbA	Hémoglobine adulte
HbF	Hémoglobine fœtale
HCL	Hydrochlorid acid
HMG	High-mobility group
HPFH	Hereditary persistance of fetal hemoglobin
HS	Hypersentitive site
HSC	Hematopoietic Stem Cells
IE	Ilots érythroblastiques
IgG	Immunoglobuline G
Ik	Ikaros
IKZF	Ikaros zing finger
kDa	KiloDalton

Kb	Kilobase
KCl	Potassium chloride
KLF	Krüppel-Like Factor
LKLF	Lung Krüppel-Like Factor
NaCl	Sodium Chloride
NK	Natural Killer
O <sub>2</sub>	Oxygène
pb	Paires de bases
PBGD	Porphobilinogen deaminase
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
QPCR	Quantitative PCR
RIPA	RadioImmunoPrecipitation Assay
SAA	Serum Amyloidosis A
SCA	Sickle Cell Anemia
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	Small interfering RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOX	Sry type HMG box
Sp1	Specificity protein 1
ssDNA	Salmon sperm DNA
SWI/SNF	SWItch/Sucrose NonFermentable
TBS	Tris-buffered saline
TE	Tris-EDTA
TSS	Transcription Start Site
UTR	Untranslated Region
YAC	Yeast Artificial Chromosome
ψ	Psi
WT	Wild Type
ζ	Zêta, ζ-globine

*À ma chère famille*

*À mes amis qui m'ont toujours soutenu et encouragé*

*À Bernard et Francine pour leur accueil et leur convivialité*

*À JL*

*«N'avance rien que tu ne sois capable de prouver»  
Wilfrid Derome*

## Remerciements

Je remercie ma directrice de recherche Marie Trudel pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'Institut de Recherche Clinique de Montréal et d'avoir pu bénéficier des connaissances approfondies dans la génétique et la biologie moléculaire. Je la remercie surtout de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans le domaine de recherche qui me tenait tant à cœur depuis de nombreuses années et qui serviront de base solide pour ma carrière professionnelle. Je la remercie de m'avoir enseigné la rigueur expérimentale et l'intégrité scientifique qui constituent des qualités primordiales.

Je remercie particulièrement les étudiants, anciens et actuels, du laboratoire de m'avoir intégré dans leur groupe et pour l'aide apporté à tous les niveaux : Olivier Coté, avec qui je pouvais partager mon intérêt pour les sciences judiciaires et médico-légales; Wafaa Lemsaddek et Almira Kubergovic pour leur patience et leur précieuse aide. Je remercie tout particulièrement les stagiaires qui ont été présents à mes côtés pour m'épauler dans mes différentes tâches notamment Amélie Sorel et Dasha Ravinesanthu. Je dois aussi mentionner les personnes que j'ai eu l'opportunité de connaître et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler: Alexandra Bungardean, Laura Brown, Anthony Scalia et Kathleen Shah. Je remercie également les membres du laboratoire du Dr Vacher (Marie, Monica, Maya, Sana, Murthy) qui m'ont soutenu de près ou de loin ainsi que le personnel de l'animalerie: Caroline Dubé, Mylène Cawthorn, Suzie Riverin et Édith Pelletier. Je voudrais remercier Mme Daniela Baggio ainsi que Carole Marcotte pour s'être occupées des affaires académiques notamment pour les demandes de bourses.

Finalement, je tiens à remercier ma famille sans qui je n'aurai pas pu avancer et affronter les tempêtes. Je tiens à remercier mes proches amis qui m'ont tant aidé à surmonter ces derniers mois difficiles et m'ont encouragé à aller jusqu'au bout: Meryem, Christian, Samer, Sarah, Nadège, Méganne, Anne sans oublier les amis de l'Institut Cédric, Lorelei, Francine, Ludivine, Jennifer, Antoine, Taby, Shiva et finalement Angéline.

# ***Chapitre 1: Introduction***

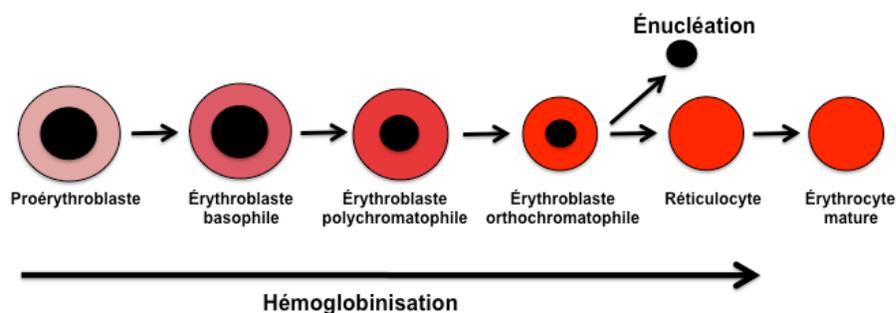
## **1.1 Érythropoïèse et développement**

L'hématopoïèse est le processus biologique responsable de la production des différents types cellulaires composant le sang. Pour cela, des cellules souches hématopoïétiques (*HSC, Hematopoietic Stem Cells*) prolifèrent et génèrent des progéniteurs qui s'engagent dans une voie de différenciation au cours de laquelle des précurseurs cellulaires sont produits et dirigés vers une seule destinée, soit la création de cellules matures circulant dans le système sanguin. L'érythropoïèse est la voie hématopoïétique qui conduit à la production des érythrocytes communément appelés globules rouges. La fonction principale de l'érythropoïèse consiste à générer continuellement des érythrocytes matures et fonctionnels dans la circulation sanguine afin de fournir l'oxygène (O<sub>2</sub>) au cours des stades du développement embryonnaire, fœtal et adulte. Deux types d'érythropoïèse peuvent être distinguées durant l'ontogénie. L'érythropoïèse dite primitive a lieu dans le sac vitellin en début de gestation et est caractérisée par la production de larges cellules nucléées qui circulent plusieurs jours dans le sang avant de subir l'énucléation. L'érythropoïèse dite définitive est quant à elle responsable de la production de cellules érythroïdes énucléées. Dès le début du 20<sup>e</sup> siècle, l'examen d'embryons de mammifères a en effet permis de mettre en évidence l'existence de cellules érythroïdes nucléées et énucléées dans la circulation sanguine (Maximow AA, 1909). La distinction entre érythropoïèse primitive et définitive a par ailleurs été facilitée par les études *in vivo* chez la souris.

### **1.1.1 Caractéristiques de l'érythropoïèse**

Durant l'érythropoïèse, les progéniteurs érythroïdes prolifèrent puis s'engagent dans un processus de différenciation au cours duquel des précurseurs érythroïdes nommés érythroblastes sont produits et entrent dans une phase de maturation caractérisée par la synthèse de molécules d'hémoglobines, la condensation nucléaire, la diminution de la taille cellulaire et finalement l'énucléation (Craig et al., 1964; Fantoni A et al., 1968&1969; Steiner & Vogel, 1973; Chui et al., 1974; Sangeorgi et al., 1990;

Morioka et al., 1998; Kingsley PD et al., 2004; Frazer et al., 2007). Les érythroblastes produits par mitoses successives peuvent être morphologiquement identifiables et apparaissent selon l'ordre ontogénique suivant: proérythroblaste, érythroblaste basophile, érythroblaste polychromatophile et érythroblaste orthochromatophile. Le dernier stade d'érythroblaste subit l'étape finale de maturation, l'énucléation et devient un réticulocyte. Celui-ci circule dans le sang périphérique pendant quelques jours avant de devenir un érythrocyte mature (Figure 1.1).



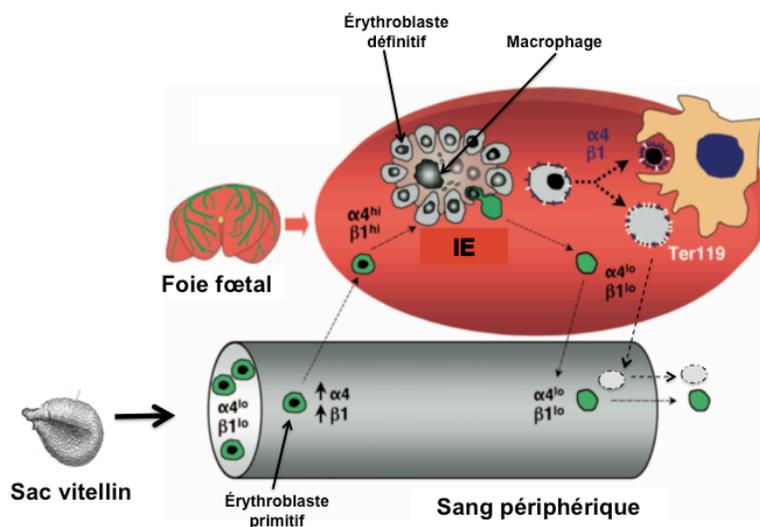
**Figure 1.1. Différenciation des précurseurs érythroïdes**

**Légende:** Les différents stades d'érythroblastes sont représentés selon l'ordre dans lequel ils apparaissent au cours de l'érythropoïèse. L'hémoglobinisaton et l'énucléation sont deux événements majeurs de la différenciation des précurseurs érythroïdes.

### 1.1.2 L'érythropoïèse primitive embryonnaire

Les cellules érythroïdes primitives dérivent toutes d'un seul type de progéniteur appelé EryP-CFC (*Primitive Erythroid Colony-forming Cells*) (Kennedy et al., 1997). *In vivo*, les premières cellules érythroïdes primitives au stade de proérythroblaste sont identifiables dans les îlots sanguins du sac vitellin dès le 18<sup>e</sup> jour de gestation chez l'humain (Takashina, 1987) et entre le 7<sup>e</sup> et 8<sup>e</sup> jour embryonnaire (E7.5) chez la souris (Haar JL et al., 1971; Wong et al., 1985; Silver et al., 1997; Ferkowicz & Yoder., 2005). Les études *in vivo* chez la souris à l'âge embryonnaire 8.25 (E8.25) ont démontré que les premières contractions cardiaques coïncident avec l'entrée des érythroblastes dans la circulation sanguine (McGrath et al., 2003; Ji RP et al., 2003). Ces larges cellules érythroïdes nucléées continuent leur processus de maturation dans le sang périphérique et les premières formes énucléées ne sont détectées que trois jours plus tard dans la circulation sanguine. L'énucléation des cellules primitives a longtemps été considérée comme un processus survenant dans la circulation sanguine mais les récentes données

ont montré que l'étape finale de leur maturation a lieu dans le foie fœtal. La production d'embryons transgéniques, dans lesquels la protéine fluorescente verte (*GFP: Green Fluorescent Protein*) est exprimée exclusivement dans les cellules érythroïdes primitives, a en effet permis de démontrer que les érythroblastes primitifs terminaient leur maturation dans des « niches » du foie fœtal appelées îlots érythroblastiques (Figure 1.2). Ces cellules érythroïdes primitives apparaissent dans le foie fœtal dès E10.5 et s'accumulent jusqu'à E14.5 (Fraser et al., 2007; Isern et al., 2008). L'énucléation des cellules érythroïdes primitives se poursuit pendant le stade fœtal pour être pratiquement complétée vers E15.5-E16.5 (Kingsley PD et al., 2004; Fraser et al., 2007). Lorsque les érythroblastes primitifs circulant dans le sang migrent vers le foie fœtal, l'expression des molécules d'adhésion à leur surface augmente (intégrines  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  et  $\beta$ ). Ces intégrines interagissent directement avec les molécules de surface des macrophages présents dans les îlots érythroblastiques du foie fœtal. Ces macrophages fœtaux facilitent l'énucléation des cellules érythroïdes primitives en phagocytant les noyaux. Les cellules érythroïdes primitives matures sont ensuite libérées de leur interaction avec les macrophages et rentrent dans la circulation sanguine (Isern et al., 2008) dans laquelle elles restent plusieurs jours après la naissance (Kingsley PD et al., 2004).



### Figure 1.2. Énucléation des cellules érythroïdes dans le foie fœtal

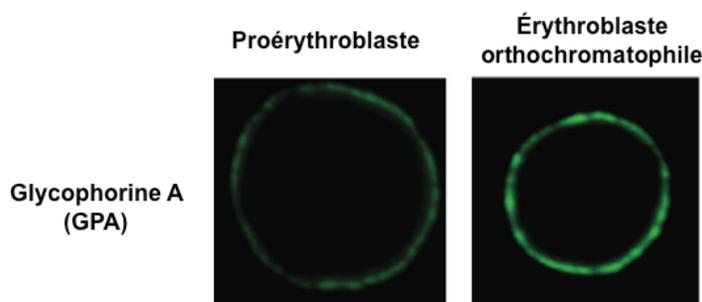
**Légende:** Les macrophages des îlots érythroblastiques (IE) permettent l'énucléation des érythroblastes primitifs et définitifs (cellules ayant l'antigène de surface Ter119) par l'interaction des molécules de surface des précurseurs érythroïdes (intégrines  $\alpha$  et  $\beta$ ) et celles des macrophages. Les cellules érythroïdes matures sont libérées dans le sang périphérique. **Référence:** Adaptée de Isern et al., 2008.

### 1.1.3 L'érythropoïèse définitive fœtale et adulte

Les érythrocytes issus de l'érythropoïèse primitive sont indispensables afin d'assurer l'apport de l'oxygène et la croissance de l'embryon au cours des premières semaines de gestation chez l'homme. Cependant, le fœtus requiert davantage de cellules érythroïdes afin de satisfaire les besoins de plus en plus importants au fur et à mesure que le développement progresse. Le foie devient le principal site de production et de maturation des cellules érythroïdes pendant le développement fœtal : on parle dès lors d'érythropoïèse définitive fœtale. Chez l'humain, la production des érythrocytes par le foie est assurée au cours du premier trimestre de gestation. Chez la souris, à l'âge embryonnaire 9.5 (E9.5), le foie nouvellement formé est colonisé par des progéniteurs hématopoïétiques provenant du sac vitellin (nommés BFU-E et CFU-E *in vitro*): ceux-ci augmentent considérablement leur nombre jusqu'à E14.5-E15.5 et s'engagent dans une différenciation menant à la production des cellules érythroïdes définitives (Gregory & Eaves, 1978; Rich et al., 1979; Kurata et al., 1998). Les érythroblastes définitifs sont présents dans le foie fœtal dès l'âge E11.5 chez la souris (Marks et al., 1972) et terminent leur maturation par le biais des macrophages des îlots érythroblastiques du foie fœtal (Figure 1.2) avant d'entrer dans la circulation sanguine (Palis, 2004; Chasis et al., 2006). Les premières cellules érythroïdes définitives énucléées font leur apparition dans la circulation vers E12.5 et leur nombre augmente exponentiellement durant les jours suivants (Rifkind et al., 1969; Brotherton et al., 1979; Kingsley PD et al., 2004). Ainsi, vers E14.5-E15.5, les cellules définitives fœtales constituent la population prédominante de cellules érythroïdes dans la circulation sanguine. Chez l'humain et la souris, la production hépatique de cellules érythroïdes diminue progressivement vers la fin de la gestation. L'érythropoïèse change alors de site et prend place progressivement dans la rate puis s'installe finalement dans la moelle osseuse au stade adulte: il s'agit de l'érythropoïèse définitive adulte.

### 1.1.4 Expression des marqueurs de surface des érythrocytes

Durant la différenciation érythroïde, des changements surviennent dans l'expression des marqueurs de surface des cellules érythroïdes. Les érythroblastes perdent leur antigène CD34, mais acquièrent entre autre à leur surface le récepteur de la transferrine (CD71) et la protéine membranaire glycophorine A (Chen et al., 2009; Sankaran et al., 2010). Les glycophorines sont synthétisées puis exprimées à la surface cellulaire (Fairbanks et al., 1971). La glycophorine A (GPA, Ter119 ou CD235a) est la glycophorine la plus abondante au niveau de la membrane des érythrocytes: on en compte 5 à  $9 \times 10^5$  copies par érythrocyte (Merry et al., 1984). Il s'agit par ailleurs de la première protéine membranaire à être séquencée (Tomita et al, 1975 & 1978). La glycophorine A est exprimée exclusivement dans la lignée érythroïde; celle-ci est détectée à la surface membranaire dès le stade de proérythroblaste (Gahmberg et al., 1978; Yurchenco et al., 1980; Fukuda, 1981; Robinson et al, 1981; Sieff et al., 1982). Son expression protéique et son exposition à la membrane augmentent progressivement au cours de l'érythropoïèse : elle est quatre fois plus abondante chez les érythroblastes orthochromatophiles que chez les proérythroblastes (Chen et al., 2009) (Figure 1.3). Sa fonction biologique n'est cependant pas clairement définie. Le récepteur de la transferrine (CD71) est exprimé à tous les stades d'érythroblastes mais est absent chez la cellule érythroïde mature (l'érythrocyte). Son expression protéique augmente de 3 à 4 fois entre le stade de proérythroblaste et celui d'érythroblaste polychromatophile mais diminue ensuite. Contrairement à GPA, le niveau de CD71 au stade d'érythroblaste orthochromatophile est équivalent à celui retrouvé chez des proérythroblastes (Chen et al., 2009).



**Figure 1.3. Expression de la glycophorine A chez les érythroblastes**

Légende: Photographies prises par immunofluorescence montrant l'expression de la glycophorine A à la surface des érythroblastes précoces (gauche) et tardif (droite) provenant de la moelle osseuse de souris. L'expression de la glycophrine A augmente au cours de l'érythropoïèse. Référence: Chen et al., 2009

## 1.2 L'hémoglobine

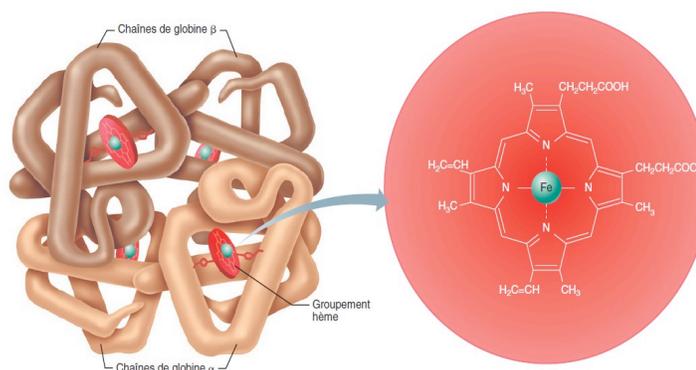
Les érythrocytes produits au cours de l'érythropoïèse primitive et définitive transportent l'oxygène par le biais d'une molécule tétramérique appelée hémoglobine (Hb). Celle-ci fut décrite pour la première fois au 19<sup>e</sup> siècle par Friedrich Ludwig Hünefeld (Hünefeld, 1840). Il fallut cependant attendre jusqu'en 1959 pour que la structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine soit déterminée par cristallographie à rayons X (Perutz MF et al., 1960). Pour cette découverte majeure, Max Ferdinand Perutz reçut le Prix Nobel de Chimie en 1962. Au cours des décennies suivantes et grâce aux avancées technologiques en génétique et en biologie moléculaire, de nombreuses études furent menées afin de comprendre les mécanismes régulant l'expression et la synthèse de l'hémoglobine dans les cellules érythroïdes aussi bien chez l'homme que chez les mammifères comme la souris.

### 1.2.1 Structure et rôle dans le sang

L'hémoglobine est la protéine la plus abondante chez les érythrocytes (Weed et al, 1963) et sa concentration chez l'humain est évaluée à 15g/dl (Silverman & Glick., 1969). Elle est composée de quatre sous-unités dont chacune d'elle consiste en une chaîne polypeptidique associée à un groupe hème. Les deux types de chaînes polypeptidiques retrouvés dans l'hémoglobine adulte humaine (HbA:  $\alpha_2\beta_2$ ) sont les chaînes de globine alpha ( $\alpha$ ) et beta ( $\beta$ ). Le groupe hème est constitué d'un anneau de carbone, d'hydrogène et d'azote qui porte le nom de protoporphyrine IX et qui entoure un atome de fer ( $Fe^{2+}$ ) (Figure 1.4). L'hémoglobine HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) est synthétisée dans les cellules érythroïdes de la moelle osseuse au stade adulte.

Le rôle de l'hémoglobine dans le sang a été suggéré en 1857 par le physiologiste français Claude Bernard (Bernard C, 1857) puis confirmé plus tard par Lawrence L.Henderson (Henderson, 1928). Cette protéine tétramérique a pour rôle de collecter l'oxygène ( $O_2$ ) inspiré dans les poumons et de le transporter vers les tissus. En contrepartie, l'hémoglobine récupère le dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) produit par les cellules et le retourne aux poumons. L'hémoglobine assure ainsi l'oxygénation de l'organisme et donc la survie de l'individu en apportant l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire. Au cours du processus de respiration, l'attachement de

l'oxygène se fait de manière réversible avec l'atome de fer des groupes hème de la molécule d'hémoglobine. Quatre molécules d'O<sub>2</sub> peuvent être transportées simultanément par une seule molécule d'hémoglobine. Lorsque l'hémoglobine est associée aux molécules d'oxygène, on parle d'oxyhémoglobine. Lorsque l'oxygène est relâché dans les tissus, l'hémoglobine est dite désoxygénée d'où le terme de désoxyhémoglobine.



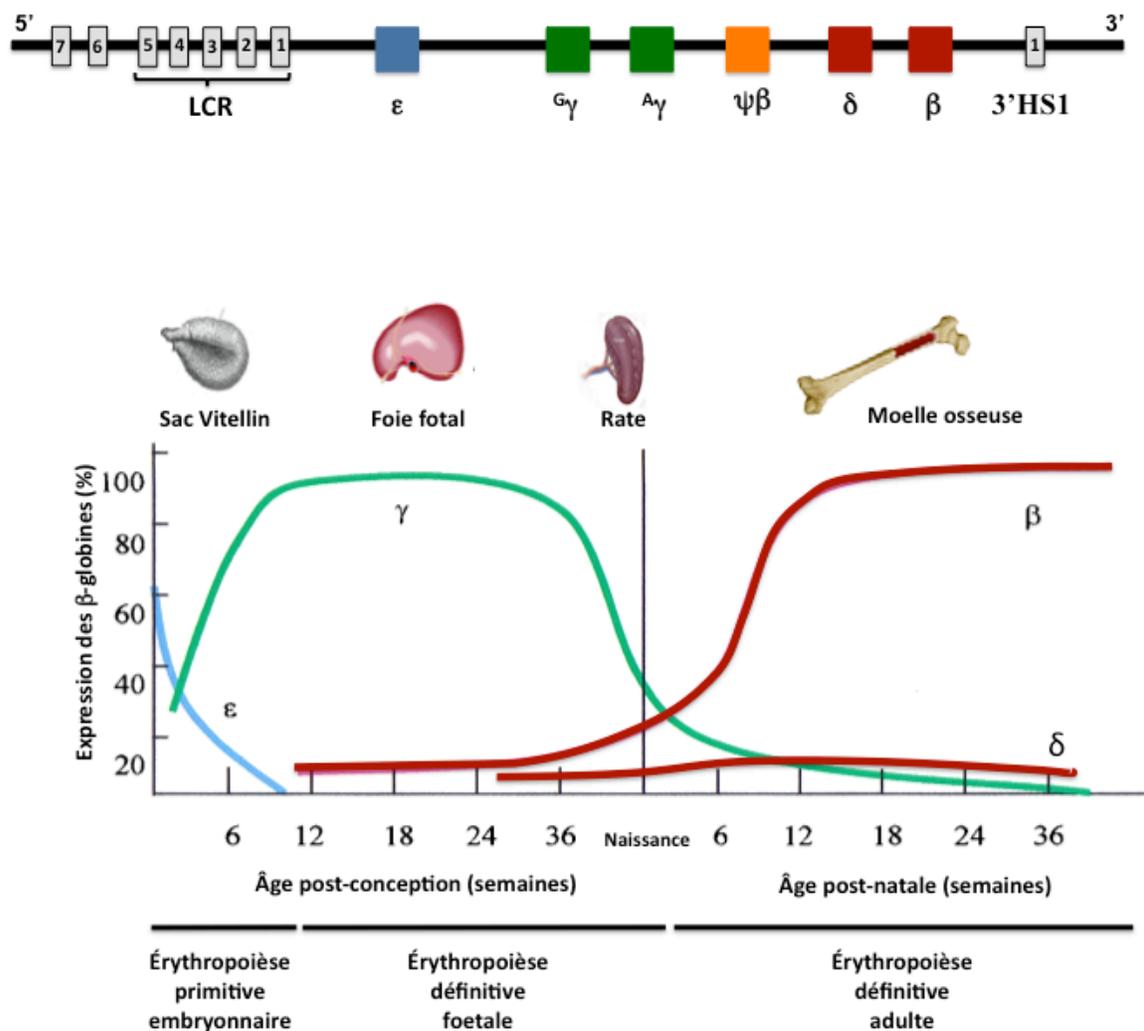
**Figure 1.4. L'hémoglobine adulte humaine**

### 1.2.2 Précurseurs érythroïdes et biosynthèse de l'hémoglobine

Les molécules d'hémoglobines contenues dans les érythrocytes matures sont le résultat de l'assemblage des chaînes de globine synthétisées par les érythroblastes et les réticulocytes. Au cours de l'érythropoïèse, les érythroblastes synthétisent et accumulent de l'hémoglobine, d'où le changement d'apparence de leur cytoplasme : ils deviennent moins basophile. La synthèse des chaînes de globines suivie de leur assemblage pour former la molécule d'hémoglobine commence dès le stade de proérythroblaste et se termine au stade de réticulocyte (Branick & Levere, 1964). Les deux types de chaînes de globine  $\alpha$  et  $\beta$  sont synthétisées dans un ratio équimolaire à l'intérieur des précurseurs érythroïdes et s'associent ensuite à un groupe hème avant de former des hétérodimères  $\alpha\beta$  qui à leur tour s'assemblent pour produire la molécule d'hémoglobine HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) (Tavill et al., 1967 & 1968; Baglioni & Campana., 1967).

### 1.2.3 Synthèse d'hémoglobine durant le développement humain

L'HbA est la principale hémoglobine retrouvée dans les érythrocytes matures au cours de la vie adulte mais d'autres types d'hémoglobine existent chez l'humain car la composition de l'hémoglobine dans les érythrocytes évolue pendant le développement de l'individu. En effet, différentes chaînes de type  $\alpha$ - et  $\beta$ -globine humaine sont synthétisées et se combinent pour former des hémoglobines stade-spécifiques. Ces chaînes de globine résultent de l'expression des gènes des loci  $\alpha$ - et  $\beta$ -globine humaines. Ces gènes sont disposés sur leur chromosome respectifs selon l'ordre dans lequel ils sont exprimés durant les différents stades de développement de l'individu (embryonnaire, fœtale et adulte). Le locus d' $\alpha$ -globine humaine, situé sur le chromosome 16, contient trois gènes fonctionnels: un gène embryonnaire ( $\zeta_2$ ) et deux gènes adultes ( $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ ). Le locus de  $\beta$ -globine humaine (~ 70 kb) est localisé sur le chromosome 11 et contient cinq gènes fonctionnels (5'- $\epsilon$ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\delta$ - $\beta$ -3') ainsi qu'un pseudogène  $\psi\beta$  non exprimé au cours du développement (Figure 1.5). Le gène embryonnaire epsilon ( $\epsilon$ ) est situé en 5' du locus, deux gènes gamma ( $G\gamma$  et  $A\gamma$ ) ainsi que deux gènes adultes nommés delta ( $\delta$ ) et beta ( $\beta$ ) situé en 3' du locus (Lawn et al, 1978; Deisseroth et al, 1978; Ramirez et al, 1979; Proudfoot & Baralle, 1979). Cinq sites d'hypersensibilité à la DNaseI (HS) sont localisés environ 6 à 22 kb en amont du gène  $\epsilon$  et constituent la région de contrôle du locus de  $\beta$ -globine ( $\beta$ LCR). Les quatre premiers HS (5'HS1-4) sont érythroïdes spécifiques alors que HS5 est ubiquitaire (Jarman & Higgs, 1988). Par ailleurs, deux sites additionnels (5'HS6-7) ont été découverts en amont de HS5 (Bulger et al., 1999). Environ 20 kb en aval du gène adulte  $\beta$ , on trouve un autre site d'hypersensibilité à la DNase appelé 3'HS1. Le rôle du LCR dans la régulation des gènes de globines est discuté en détail dans la section 1.5.



### Figure 1.5. Expression ontogénique des gènes du locus humain de $\beta$ -globine

**Légende:** En amont du gène  $\epsilon$  se trouve la région de contrôle du locus (LCR) composée de sites d'hypersensibilité à la DNaseI (HS). L'arrangement spatial des cinq gènes fonctionnels du locus humain de  $\beta$ -globine ( $5'$ - $\epsilon$ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\delta$ - $\beta$ - $3'$ ) sur le chromosome 11 reflète l'ordre d'expression au cours du développement. L'expression séquentielle de ces gènes engendre deux commutations de l'hémoglobine: 1) la commutation embryonnaire-fœtale et 2) la commutation fœtale-adulte. **Référence:** Adaptée de Harju et al., 2002.

L'érythropoïèse prend place dans le sac vitellin dès le début de la gestation: il s'agit de l'érythropoïèse primitive embryonnaire. Au cours des cinq premières semaines, les gènes  $\zeta$  et  $\epsilon$  sont exprimés et l'embryon produit exclusivement l'hémoglobine Gower-1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ) (Hecht et al., 1966). Au fur et à mesure que la gestation progresse, l'expression de  $\zeta$  est remplacée par celle des gènes  $\alpha$  et l'hémoglobine Gower-2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) est produite (Huehns et al., 1961; Huehns et al., 1964; Huehns et al., 1971; Ingram, 1972; Gale et al., 1979). L'expression du gène  $\epsilon$  est aussi graduellement réprimée alors que celle des gènes gamma ( $^G\gamma$  et  $^A\gamma$ ) est induite. Les chaînes  $^G\gamma$  et  $^A\gamma$  produites sont différentes du fait de la substitution d'un acide aminé en position 136 (Gly→Ala). Ces chaînes se comportent néanmoins de la même manière et s'apparient aux chaînes de type  $\alpha$ -globine. En effet, les chaînes  $^G\gamma$  et  $^A\gamma$  synthétisées s'associent autant avec les chaînes  $\zeta$  pour générer l'hémoglobine Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) (Capp et al., 1967) qu'avec les chaînes  $\alpha$  pour produire l'hémoglobine HbF ( $\alpha_2^G\gamma_2$  et  $\alpha_2^A\gamma_2$ ) (Beaven, 1960). Ainsi, vers la fin du stade embryonnaire (10<sup>e</sup> semaine), les érythrocytes primitifs contiennent un mélange d'hémoglobines (Gower-1, Gower-2, Portland et HbF). Ces érythrocytes primitifs sont progressivement remplacés par les érythrocytes énucléés générés par l'érythropoïèse qui se met en place dans le foie fœtal (Peschle et al, 1985). Il s'agit de la *commutation de l'hémoglobine embryonnaire à fœtale*. Les cellules érythroïdes définitives fœtales synthétisent uniquement l'hémoglobine fœtale HbF. Cette hémoglobine prédomine durant la vie utérine humaine mais sa proportion diminue progressivement vers la fin de la gestation pour être remplacée définitivement par l'hémoglobine HbA au cours de la première année suivant la naissance de l'individu (Bard et al, 1970; Bard, 1973&1975). En effet, l'expression des gènes fœtaux ( $^G\gamma$  et  $^A\gamma$ ) est réprimée alors que celle des gènes adultes ( $\delta$  et  $\beta$ ) est activée dans la rate puis dans la moelle osseuse : il s'agit de la *commutation de l'hémoglobine fœtale à adulte* (Figure 1.5). Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux gènes du locus de  $\beta$ -globine et à sa régulation (Section 1.3). Au cours du stade adulte, l'hémoglobine HbA<sub>1</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ ) devient la principale hémoglobine dans les globules rouges (>96%) alors que le deuxième type d'hémoglobine nommée HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) constitue seulement une faible fraction (<3%) (Neumeyer & Betke., 1987). L'hémoglobine fœtale ( $\alpha_2\gamma_2$ ) représente moins de 2% de l'hémoglobine totale. Chez l'humain, les combinaisons des chaînes de

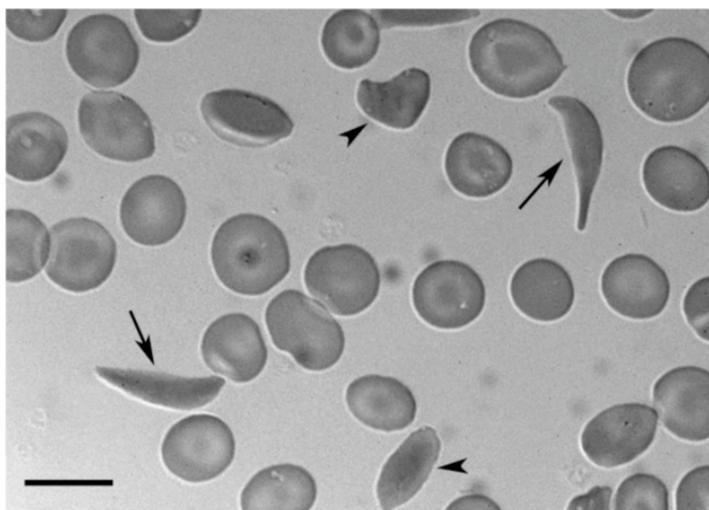
globines produisent ainsi au total six hémoglobines fonctionnelles au cours du développement (Tableau I-I).

**Tableau I-I. Les hémoglobines humaines**

	<b>Embryonnaire</b>	<b>Foetal</b>	<b>Adulte</b>
	<b>Hb Gower 1</b> ( $\zeta_2\varepsilon_2$ )		<b>HbA<sub>1</sub></b> ( $\alpha_2\beta_2$ )
<b>Hémoglobines</b>	<b>Hb Gower 2</b> ( $\alpha_2\varepsilon_2$ )	<b>HbF</b> ( $\alpha_2\gamma_2$ )	
	<b>Hb Portland</b> ( $\zeta_2\gamma_2$ )		<b>HbA<sub>2</sub></b> ( $\alpha_2\delta_2$ )

### 1.3 Les hémoglobinopathies

Les molécules d'hémoglobines contenues dans les érythrocytes doivent transporter l'oxygène vers les tissus et assurer ainsi la survie de l'individu au cours du développement. Cette fonction est cependant altérée lorsque des mutations génétiques surviennent dans les gènes codant pour les chaînes de globine et conduisent à la production de molécules d'hémoglobines anormales: on parle d'hémoglobinopathies. Ces maladies peuvent affecter la synthèse d'hémoglobine de manière qualitative ou quantitative. Chez les hémoglobinopathies qualitatives, la synthèse de l'hémoglobine n'est pas affectée mais les chaînes de globines produites présentent une séquence d'acides aminés altérée. Le changement dans la séquence protéique perturbe la structure de la molécule d'hémoglobine et donc sa fonction (défaut qualitatif). Chez les hémoglobinopathies quantitatives, la séquence d'acides aminés des chaînes des globines n'est pas affectée mais la synthèse de l'hémoglobine est réduite (défaut quantitatif). Des défauts qualitatifs ou quantitatifs de l'hémoglobine affectent directement la forme des érythrocytes : leur durée de vie est réduite, ce qui entraîne l'apparition de complications chez l'individu. L'anémie falciforme et les  $\beta$ -thalassémies sont les hémoglobinopathies les plus souvent rencontrées.



**Figure 1.6. Aspect des érythrocytes normaux et falciformes**

Légende: Le sang périphérique d'un patient atteint d'anémie falciforme a été examiné sous microscope et révèle des érythrocytes normaux et falciformes. Référence: Frenette & Atweh (2007).

### 1.3.1 L'anémie falciforme

L'anémie falciforme aussi appelé drépanocytose (SCA, *Sickle Cell Anemia*) est une maladie caractérisée par la présence d'érythrocytes anormaux en forme de faucille dans la circulation sanguine (Figure 1.6). Celle-ci fut observée pour la première fois en 1910 à Chicago chez un patient atteint de symptômes pulmonaires et d'anémie sévère (Herrick et al., 1910). Au cours des quatorze années suivantes, plusieurs cas furent décrits supportant l'hypothèse qu'il s'agissait d'une nouvelle maladie (Sydenstricker et al., 1924). En 1927, Hahn et Gillespie décrivent la base pathologique de l'anémie falciforme : ils démontrèrent que la déformation des globules rouges avait lieu lorsque ceux-ci étaient en hypoxie (déficiency en oxygène) mais que le phénomène était réversible dès que les érythrocytes étaient oxygénés à nouveau (Hahn & Gillespie, 1927). Par la suite, Linus Pauling posa l'hypothèse que la maladie provenait de l'anormalité de la molécule d'hémoglobine. Cette hypothèse fut validée en 1949 par Pauling lui-même et ses collègues en démontrant que l'hémoglobine adulte normale (HbA) et falciforme (HbS) migraient différemment lorsqu'elles étaient soumises à l'électrophorèse (Pauling et al, 1949). La même année, l'anémie falciforme fut identifiée comme maladie autosomale récessive (Neel, 1949).

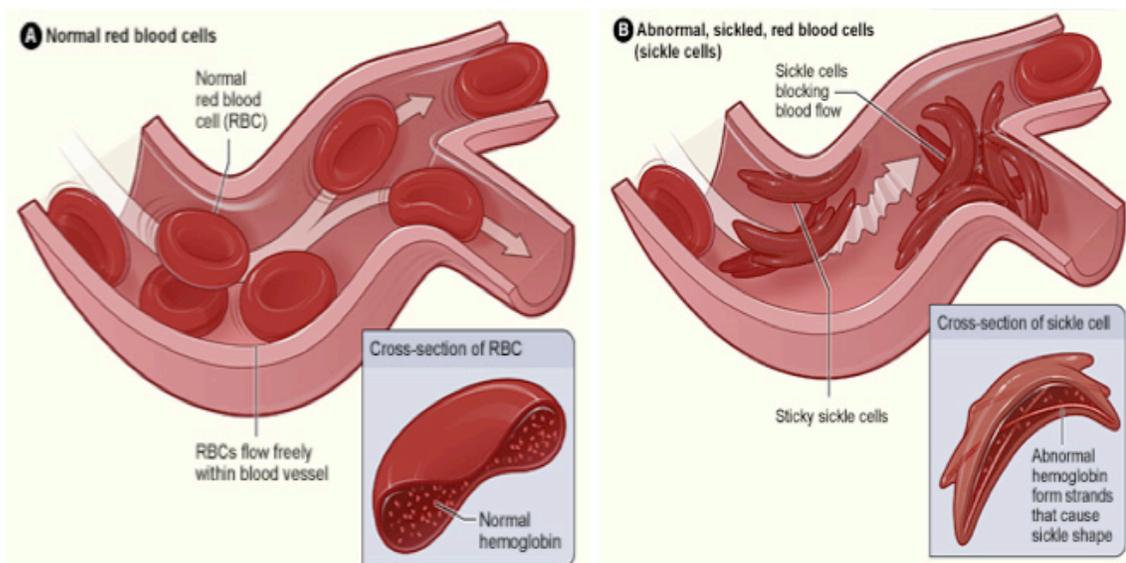
Cette hémoglobinopathie est causée par le remplacement nucléotidique de l'adénine (A) par la thymine (T) dans le gène adulte de  $\beta$ -globine humaine, ce qui résulte

en la substitution de l'acide glutamique (Glu) par la valine (Val) au sixième codon de la séquence protéique de la chaîne de  $\beta$ -globine (Ingram, 1956 & 1957). Il s'agit du premier défaut moléculaire décrit pour une maladie génétique. En condition de désoxygénation, les chaînes  $\beta$  mutées des molécules d'hémoglobine HbS ( $\alpha_2\beta_2^{6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}}$  ou  $\alpha_2\beta_2^S$ ) exposent leur résidu hydrophobe (valine) au milieu extérieur, ce qui permet l'établissement d'interactions avec les acides aminés hydrophobes des chaînes  $\beta$  des autres molécules d'hémoglobine. Ceci résulte en la formation de longs polymères d'HbS à l'intérieur de la cellule érythroïde. La fréquence d'oxygénation-désoxygénation de l'hémoglobine HbS conduit à une polymérisation répétée qui finit par altérer le cytosquelette de l'érythrocyte le rendant plus rigide et moins déformable dans la circulation des capillaires sanguins (Figure 1.7).

Les érythrocytes falciformes ralentissent et bloquent le flux sanguin diminuant l'apport d'oxygène aux tissus et organes, ce qui engendre des douleurs importantes appelées crises. À long terme, la diminution de l'apport en oxygène entraîne une destruction graduelle des organes chez l'individu. Les érythrocytes falciformes sont plus fragiles que les érythrocytes normaux et sont donc susceptibles à une hémolyse extravasculaire prématurée. Chez les individus sains, les érythrocytes normaux ont une durée de vie d'environ 120 jours et la rate est le principal site où ils subissent l'hémolyse lorsqu'ils sont en fin de vie. Dépourvues de noyau, les cellules érythroïdes sénescents ne peuvent plus générer de nouvelles protéines comme les enzymes et leurs fonctions cellulaires déclinent. Leur membrane devient plus perméable à l'eau rendant les cellules sphériques et rigides. Ces cellules érythroïdes se retrouvent alors séquestrées dans la rate et sont phagocytées par les macrophages spléniques. Dans le cas de l'anémie falciforme, les cellules érythroïdes contenant l'hémoglobine S bloquent le flux sanguin, ce qui entraîne une accumulation du sang et une augmentation de la taille de la rate (splénomégalie). La séquestration splénique conduit à une diminution significative de l'hématocrite. Les érythrocytes falciformes sont quant à eux éliminés par les macrophages spléniques, ce qui réduit leur durée de vie et conduit progressivement à une anémie chronique hémolytique. Étant donné que l'érythropoïèse dans la moelle osseuse ne suffit plus, une érythropoïèse extramédullaire se met en place dans la rate pour

compenser la réduction du nombre d'érythrocytes dans la circulation (Paszty et al., 1997; Beauchemin et al., 2004).

Les premiers symptômes de l'anémie falciforme apparaissent généralement chez l'enfant vers l'âge de 6 mois et correspond au remplacement de la synthèse des chaînes de  $\gamma$ -globine normales par celle des chaînes adultes mutées de  $\beta$ -globine (Watson, 1948). Dans la plupart des cas, les érythrocytes falciformes interagissent avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, ce qui conduit à des épisodes de vaso-occlusions et d'inflammation qui sont responsables des complications cliniques telles que les troubles cardiaques et visuels, les infections bactériennes répétées, l'insuffisance rénale ainsi que l'hypertension pulmonaire (Yale et al., 2000).



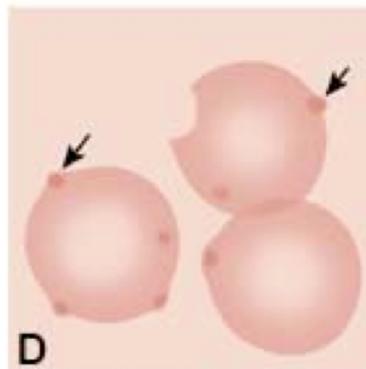
**Figure 1.7. Altération du flux sanguin par les érythrocytes falciformes**

Légende: Les érythrocytes normaux sont déformables et se déplacent aisément dans les capillaires sanguins (A) alors que les érythrocytes falciformes contiennent l'hémoglobine S et bloquent la circulation sanguine (B). Référence: <http://www.sickleanaemia.com>

### 1.3.2 Les $\beta$ -thalassémies

Thomas B. Cooley et Pearl Lee (1925) ont décrit pour la première fois les signes cliniques des  $\beta$ -thalassémies chez des jeunes enfants : ceux-ci présentaient une anémie sévère accompagnée d'une hépatosplénomégalie et des malformations faciales. Whipple et Bradford (1936) décrivent par la suite l'autopsie d'enfants décédés de  $\beta$ -thalassémies et ce fut à ce moment que le terme « thalassémie » fut donné en raison des origines méditerranéennes des enfants (en grec, *Thalassa* signifiant «mer» et *aima* «sang»).

Les  $\beta$ -thalassémies sont le résultat de mutations ou de délétions survenant dans le gène adulte de  $\beta$ -globine qui conduisent soit à une diminution ( $\beta^+$ ) soit à une absence ( $\beta^0$ ) de synthèse des chaînes de  $\beta$ -globine. Selon le degré de réduction de  $\beta$ -globine, on peut distinguer trois types de  $\beta$ -thalassémie : la  $\beta$ -thalassémie majeure aussi appelée anémie de Cooley, la  $\beta$ -thalassémie intermédiaire et la  $\beta$ -thalassémie mineure. Au niveau moléculaire, la déficience dans la synthèse des chaînes de  $\beta$ -globine altère le ratio équimolaire  $\alpha:\beta$  dans les cellules érythroïdes et compromet la production de molécules d'hémoglobines (Ingram, 1959; Weatherall et al., 1965; Nathan & Gunn, 1966). Les chaînes de globine  $\alpha$  en excès qui ne peuvent pas s'apparier précipitent dans les érythroblastes  $\beta$ -thalassémiques en formant des corps d'occlusion ou corps de Heinz (Figure 1.8) qui sont responsables des réactions oxydatives et des dommages survenant au niveau de la membrane des précurseurs érythroïdes (Rouyer-Fessard et al., 1990; Schrier, 1994&1997; Beauchemin et al., 2004). Une grande majorité (60-80%) des précurseurs érythroïdes thalassémiques meurent prématurément par apoptose et sont phagocytées par les macrophages de la moelle osseuse reflétant ainsi une érythropoïèse inefficace conduisant à une anémie sévère (Finch et al., 1970; Wickramasinghe & Hughes, 1978; Centis et al., 2000; Pootrakul et al., 2000; Angelucci et al., 2002). Les érythrocytes anormaux qui réussissent à entrer dans la circulation sanguine sont pris au piège dans la rate et sont éliminés par les macrophages spléniques. La rate devient aussi le site d'une érythropoïèse extramédullaire afin de compenser la destruction accélérée des cellules érythroïdes, ce qui résulte à une splénomégalie.



### **Figure 1.8. Corps de Heinz dans les cellules érythroïdes**

Légende: La précipitation des chaînes  $\alpha$  conduit à la formation de corps d'occlusion (indiqués par les flèches) qui endommagent la membranes des cellules érythroïdes. Référence: Irwin et al (2001)

Les individus  $\beta$ -thalassémiques présentent diverses anomalies systémiques incluant des dommages au niveau de la rate, le foie, le cœur, le rein et les poumons caractérisés notamment par l'accumulation de fer et de fibrose dans les tissus (Cunningham et al., 2004; Stoyanova et al., 2007&2012). L'anémie favorise par ailleurs l'hyperplasie de la moelle ce qui entraîne des déformations osseuses du crâne et du visage (Rioja et al., 1990). Dans les cas les plus sévères de  $\beta$ -thalassémie, les individus requièrent des transfusions sanguines. Tout comme pour l'anémie falciforme, les premiers signes cliniques des  $\beta$ -thalassémiques apparaissent entre 6 mois et 12 mois lorsque la synthèse des chaînes  $\beta$  remplace progressivement celle des chaînes  $\gamma$ -globine. L'électrophorèse de l'hémoglobine a d'ailleurs permis de confirmer l'anomalie de production d'hémoglobine chez les patients  $\beta$ -thalassémiques (Marengo-Rowe, 1965).

### **1.3.3 La persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale**

Au cours des mois suivants la naissance de l'individu, la production d'hémoglobine adulte (HbA) remplace progressivement celle de l'hémoglobine fœtale (HbF). Toutefois, l'HbF continue à être synthétisée de façon résiduelle pendant la vie adulte : sa proportion est évaluée entre 1 et 2 % de l'hémoglobine totale chez les individus sains (Kohn & Payne, 1972; Chudwin & Rucknagel, 1974). L'HbF est confinée dans quelques érythrocytes appelés cellules F dans lesquelles coexistent des

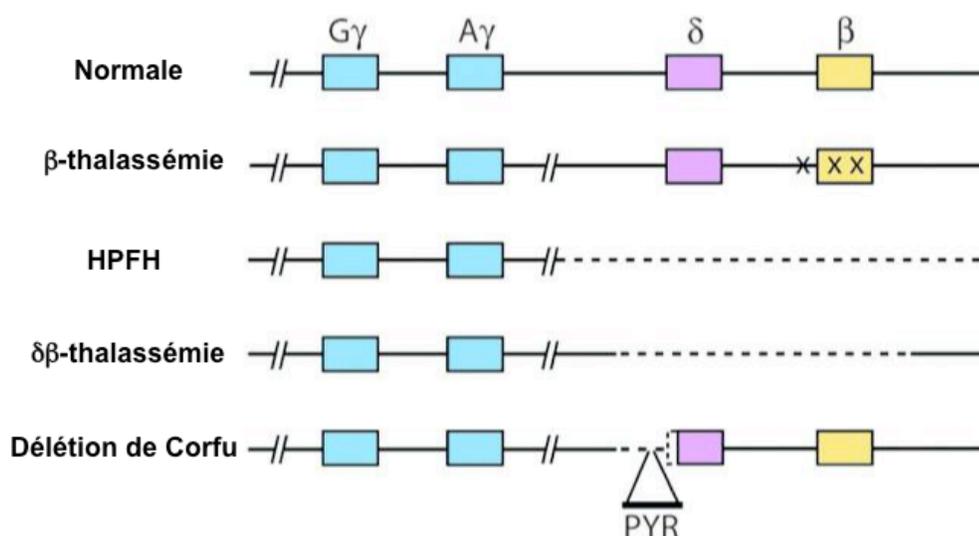
molécules d'hémoglobine adulte (HbA) (Tomoda et al., 1964; Hosoi et al., 1965; Dan & Hagiwara et al., 1967; Boyer et al., 1975; Wood et al., 1975).

Certains individus adultes peuvent néanmoins présenter des niveaux élevés d'HbF supérieurs à 5 % de l'hémoglobine totale (Steinberg et al., 1997; Thein & Craig, 1998). Cette anomalie génétique est surnommée persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale ou HPFH (pour *hereditary persistence of fetal hemoglobin*). Celle-ci peut être causée par des délétions dans la région des gènes adultes  $\delta$  et  $\beta$  ( $\delta\beta$  thalassémies) (Figure 1.9) ou par des mutations dans le promoteur des gènes  $G\gamma$  et  $A\gamma$  qui augmentent significativement le niveau de transcription des gènes fœtaux de l'ordre de 10 à 40% chez les hétérozygotes (Hoyer et al., 2002; Gibney et al., 2008; Grosso et al., 2008). De plus, il a été démontré qu'une délétion de 7.2 Kb dans la région intergénique  $\gamma$ - $\delta$ , appelée délétion de Corfu, est aussi associée à une augmentation de l'HbF. Cette délétion comprend une partie du gène  $\delta$  et la région flanquante de 6 kb située en amont de ce gène (Wainscoat et al., 1985). Les individus homozygotes pour la délétion de Corfu expriment fortement les gènes  $\gamma$  et montrent des niveaux significativement élevés d'HbF alors que la transcription du gène  $\beta$  est réduite (Chakalova et al., 2005). La transcription de  $\gamma$  est aussi élevée chez les hétérozygotes mais le niveau est moindre comparé à celui des homozygotes. Généralement, les niveaux élevés d'HbF sont attribués à une expression pancellulaire des gènes  $\gamma$  et non à une augmentation du nombre de cellules F (Thien et al., 2009).

Plusieurs observations démontrent que les niveaux élevés d'HbF peuvent réduire la sévérité des hémoglobinopathies. Chez les nouveaux-nés atteints d'anémie falciforme par exemple, l'absence de symptômes reliée à la maladie est attribuée à la présence de l'HbF qui a un effet protecteur avant l'apparition des premiers symptômes causés par l'augmentation de la production de l'HbA au cours des mois suivants. Certaines populations situées en Arabie Saoudite et en Inde présentent des niveaux anormalement élevés d'HbF associés à des symptômes moins sévères de la maladie (Perrine et al., 1972; Kar et al., 1986). L'HbF a en effet la capacité d'inhiber le processus de polymérisation de l'hémoglobine S (Blouin et al., 2000). Elle réduit non seulement la concentration d'HbS dans la cellule érythroïde mais a surtout la propriété d'interférer avec la polymérisation lorsqu'elle est désoxygénée au même titre que les hybrides  $\alpha_2\beta^S\gamma$

(Maier-Redelsperger et al., 1994). D'ailleurs, les cellules F vivent plus longtemps que les cellules exprimant uniquement les gènes adultes de  $\beta$ -globine (Akinsheye et al., 2011). Le niveau d'HbF dans l'anémie falciforme varie selon les individus et se situe entre 5% et 8 % de l'hémoglobine totale produite. Fait intéressant, une forte corrélation existe entre le nombre de cellules F et le pourcentage d'HbF (Steinberg et al., 1997).

Les bienfaits de l'HbF est aussi observable chez certains individus  $\beta$ -thalassémiques qui ont aussi une augmentation variable de la synthèse d'HbF (Ho et al., 1998; Weatherall, 2001; Stuart & Nagel, 2004; Thein, 2008). L'augmentation du niveau d'HbF permet de compenser la production insuffisante d'HbA chez les individus  $\beta$ -thalassémiques qui sont d'ailleurs asymptomatiques. De plus, les niveaux élevés d'HbF chez les patients homozygotes pour la délétion de Corfu font en sorte que ces individus ne sont pas atteints d'anémie sévère (mild anemia).

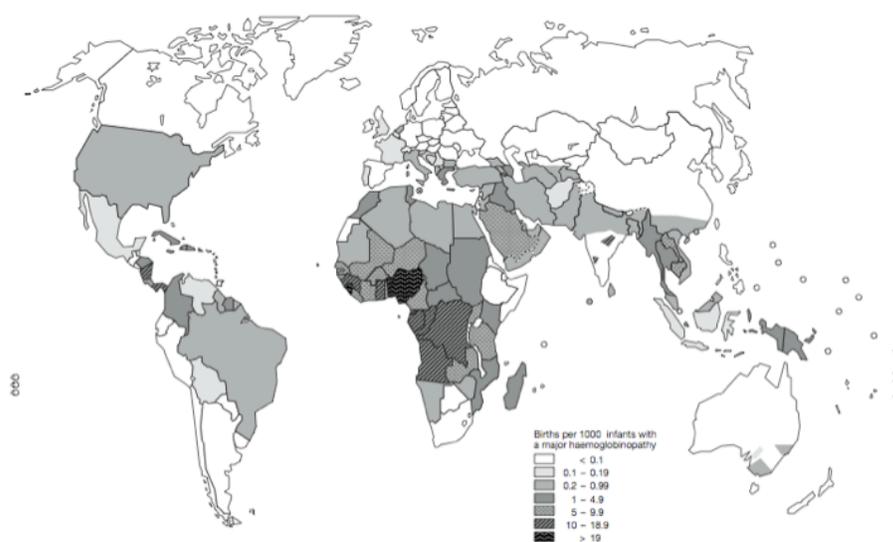


**Figure 1.9. Mutations et délétions responsables de l'HPFH**

Légende: Seuls les gènes fonctionnels  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\beta$  du locus humain de  $\beta$ -globine sont représentés. Les mutations sont indiquées par des croix alors que les délétions par des pointillés. Pyr : Région riche en pyrimidine et comprise dans la délétion de Corfu. Référence: Bank (2006).

### 1.3.4 Compréhension de la régulation des gènes de $\beta$ -globine

L'anémie falciforme et  $\beta$ -thalassémie sont les hémoglobinopathies les plus répandues dans le monde et sont responsables d'une importante mortalité notamment par le fait qu'elles affectent les individus dès le plus jeune âge (Figure 1.10). Ces maladies héréditaires sont communément répandues dans les populations africaines et méditerranéennes ainsi qu'au Moyen-Orient, en Asie du Sud-Est et dans le sous-continent indien. La migration des populations dans les différentes régions du monde a par ailleurs accentué la distribution géographique de ces hémoglobinopathies à un point où elles sont apparues dans les pays d'Amérique du Nord et en Europe. Étant donné l'importance de l'HbF dans l'amélioration de la sévérité clinique de ces anomalies génétiques, la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte est devenue un enjeu majeur. Les progrès technologiques en génétique et biologie moléculaire ont permis d'utiliser les souris comme modèle animal afin de pouvoir élucider *in vivo* les mécanismes impliqués dans la régulation des gènes de globines. Les études menées par transgénèse ont notamment permis d'introduire les gènes humains de  $\beta$ -globine chez la souris et produire ainsi des souris transgéniques. Diverses innovations scientifiques telles que l'ablation génique ont aussi permis de mettre en évidence les éléments *cis* et *trans* qui régulent la transcription des gènes du locus de  $\beta$ -globine.



**Figure 1.10. Distribution des hémoglobinopathies**

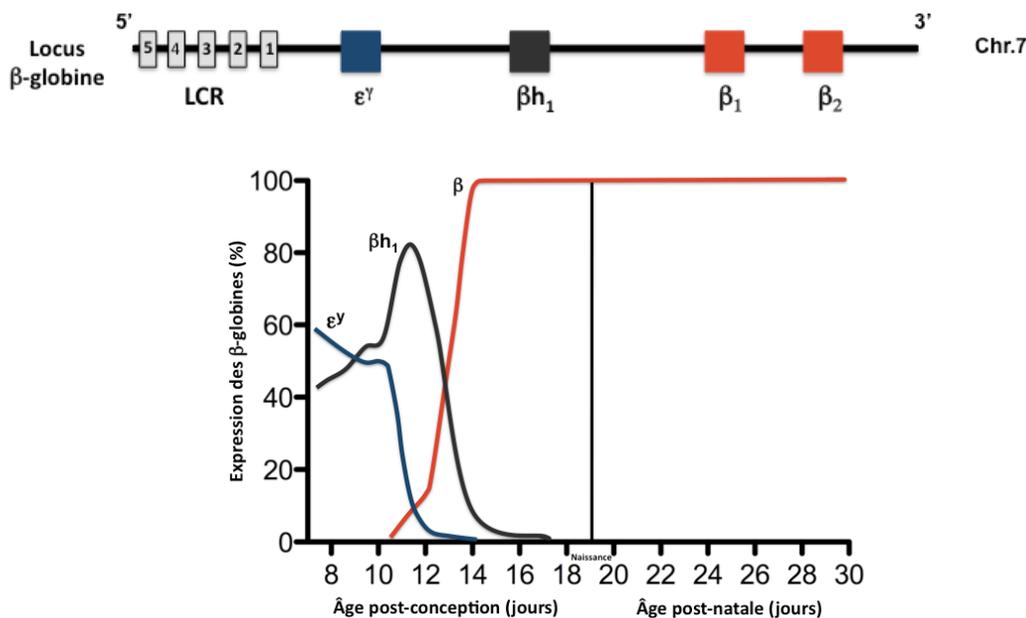
## 1.4 Étude des gènes humains de $\beta$ -globine chez la souris

### 1.4.1 Le locus de $\beta$ -globine chez la souris *Mus musculus*

Localisé sur le chromosome 7, le locus murin de  $\beta$ -globine est constitué de quatre gènes fonctionnels (Figure 1.11) : deux gènes embryonnaires  $\epsilon\gamma$  et  $\beta_{H1}$  ainsi que deux gènes adultes  $\beta_1$  et  $\beta_2$ . En amont du gène  $\epsilon\gamma$  se trouvent cinq sites d'hypersensibilité à la DNase I dont les quatre premiers constituent la région de contrôle du locus ( $\beta$ LCR) (Trimborn et al., 1999).

L'érythropoïèse primitive murine commence dans le sac vitellin vers E7.5 et conduit à la production de larges cellules érythroïdes exprimant les gènes embryonnaires  $\epsilon\gamma$  et  $\beta_{H1}$ . À E11.5, l'érythropoïèse s'établit dans le foie fœtal où les cellules érythroïdes définitives commencent à exprimer les gènes adultes de  $\beta$ -globine ( $\beta_1$  et  $\beta_2$ ). Ces dernières sont différentes selon les souches de souris et deux principaux haplotypes sont généralement retrouvés. L'haplotype *single* (*s/s*) présente chez la souche de souris C57BL/6J possède deux gènes adultes structurellement similaires codant pour une seule et même  $\beta$ -globine adulte appelée  $\beta$ -single ( $\beta^S$ ) (Hutton et al., 1962; Popp, 1973; Weaver et al., 1979&1981). L'haplotype *diffus* (*d/d*) retrouvé chez la souche de souris CBA/J (*d/d*) comprend deux gènes adultes de  $\beta$ -globine:  $\beta$ -majeure ( $\beta_1$ :  $\beta^{\text{maj}}$ ) et  $\beta$ -mineure ( $\beta_2$ :  $\beta^{\text{min}}$ ). Pendant le stade embryonnaire murin, ces gènes sont différenciellement exprimés:  $\beta^{\text{min}}$  est majoritairement synthétisé dans le foie fœtal jusqu'à E13.5-E14.5 mais son expression décroît pour laisser place à  $\beta^{\text{maj}}$  (Whitney, 1977; Porcu et al., 2005). Au stade adulte, la souris avec l'haplotype diffus synthétise environ 80% de chaînes  $\beta$ -majeure et 20 % de chaînes  $\beta$ -mineure (Gilman, 1976; Whitney, 1977; Wawrzyniak & Popp, 1987).

Contrairement à l'humain, une seule commutation de l'hémoglobine a lieu chez la souris (Figure 1.11). Vers E11.5, l'expression des gènes embryonnaire  $\epsilon\gamma$  et  $\beta_{H1}$  est progressivement remplacée par celle des gènes adultes  $\beta_1$  et  $\beta_2$  (Peterson et al., 1995; Trimborn et al., 1999). Les souris ne disposent pas de gènes fœtaux comme l'humain.



**Figure 1.11. Expression ontogénique des gènes du locus murin de β-globine**

**Légende:** L'arrangement spatial des quatre gènes fonctionnels du locus murin de β-globine (5'-εγ-βh<sub>1</sub>-β<sub>1</sub>-β<sub>2</sub>-3') sur le chromosome 7 reflète leur ordre dans lequel ils sont exprimés au cours du développement. Une seule commutation de l'hémoglobine a lieu vers l'âge embryonnaire 11.5 (E11.5) au cours de laquelle les gènes adultes β remplacent définitivement les gènes embryonnaires εγ et βh<sub>1</sub>. Ici, l'expression totale des gènes adultes β est représentée en rouge (β<sup>maj</sup> et β<sup>min</sup>). Chez la souris, la naissance a lieu après 19-20 jours de gestation. **Référence:** Adapté de Peterson et al., 1995.

## 1.4.2 Les souris transgéniques β-YAC

Bien que des différences existent entre l'humain et la souris au niveau de la composition génique du locus de β-globine, des similitudes dans la régulation des gènes de globines au cours du développement semblent être conservées entre les deux espèces. L'introduction des gènes du locus humain de β-globine chez la souris a permis de faciliter l'étude de leur régulation *in vivo*. Cette idée fut concrétisée par l'utilisation des chromosomes artificiels de levure (YAC) capables d'incorporer des inserts de grande taille. Des souris transgéniques contenant le locus entier de β-globine humaine ont finalement pu être générées par microinjection et il fut démontré que l'expression des gènes humains de β-globine suivait celle des gènes murins de β-globine au cours du développement (Gaensler et al., 1991&1993). La commutation de l'hémoglobine embryonnaire/fœtal-adulte a lieu vers E11.5 chez les souris β-YAC. À noter que les gènes fœtaux γ humain se comportent comme les gènes embryonnaires (εγ et βh<sub>1</sub>) chez les embryons β-YAC, ce qui démontre des différences au niveau de la *trans*-régulation

entre la souris et l'humain (Sankaran et al., 2009). Malgré cela, la mise en place de la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte chez la souris démontre la conservation des mécanismes contrôlant la régulation des gènes de globines au cours du développement entre les deux espèces. Cette observation a conduit à l'étude des éléments *cis*- et *trans*- impliqués dans la régulation des gènes de  $\beta$ -globine chez la souris.

## 1.5 Le $\beta$ LCR

Diverses études menées *in vivo* ont permis de mettre en évidence des régions proximales et distales qui sont responsables de la régulation des gènes de  $\beta$ -globine aux différents stades de développement. Des régions telles que des enhancers ont été identifiées dans le locus. De plus, les régions promotrices des gènes constituent elles aussi des éléments *cis*-régulateurs; ce sont en effet des séquences d'ADN où l'ARN polymérase II et divers autres facteurs viennent se lier pour initier la transcription. Situé en amont du gène embryonnaire  $\epsilon$ , un autre élément est cependant connu comme parmi un des plus importants *cis*-régulateurs du locus de  $\beta$ -globine : il s'agit de la région de contrôle du locus ( $\beta$ LCR).

### 1.5.1 Structure et rôle du $\beta$ LCR

Le  $\beta$ LCR est une région du locus de  $\beta$ -globine identifiée non seulement chez l'humain mais aussi chez d'autres mammifères tels que la souris, le lapin ainsi que la chèvre. Sa structure et son organisation restent conservées entre les espèces. La région de contrôle du locus est définie par la présence de régions d'ADN appelées sites d'hypersensibilités (HS) qui sont susceptibles d'être digérées par la DNaseI, rendant ces zones plus accessibles à la transcription et au remodelage de la chromatine. Dans les cellules érythroïdes, le locus de  $\beta$ -globine est plus sensible à la DNaseI facilitant l'accessibilité de la chromatine pour l'expression des gènes de globine (Bulger & Groudine, 1999). Les études chez les souris transgéniques possédant le locus humain de  $\beta$ -globine ont aussi permis de montrer que la sensibilité à la DNaseI varie selon les régions du locus et dépend aussi du stade de développement. En effet, alors que le  $\beta$ LCR

reste sensible à la digestion par la DNaseI pendant l'érythropoïèse primitive et définitive, les régions contenant les gènes humains  $\epsilon$  et  $\gamma$  sont plus sensibles à la DNaseI dans les cellules primitives embryonnaires alors que les gènes humains  $\delta$  et  $\beta$  le sont davantage chez les cellules définitives murines (Gribnau et al., 2000).

Le LCR du locus humain de  $\beta$ -globine s'étend sur une distance d'environ 15 Kb et est constitué de cinq sites d'hypersensibilités à la DNaseI (HS1 à HS5). Les quatre premiers sites d'hypersensibilité (HS1 à HS4) sont érythroïde-spécifiques alors que le site le plus distal, HS5, est ubiquitaire (Jarman & Higgs, 1988). Chaque HS (sauf HS1) possède une région centrale appelée *core* (200-300 bp) importante pour son rôle d'activateur dans le  $\beta$ LCR. En effet, ce *core* confère aux HS la fonction d'*enhancer* comme c'est le cas pour les deux plus importants éléments du LCR, HS2 et HS3 (Cavallesco & Tuan, 1997; Jia et al., 2003). Les analyses menées chez les souris transgéniques contenant le locus entier de  $\beta$ -globine humaine suggèrent que la délétion du *core* dans HS2, HS3 ou HS4 perturbe l'intégrité du HS et l'hypersensibilité à la DNaseI des sites ainsi que l'expression des gènes humains de  $\beta$ -globine (Milot et al., 1996; Peterson et al., 1996; Bungert et al., 1999). Le *core* n'est cependant pas suffisant à lui seul pour assurer la fonction globale du  $\beta$ LCR car les séquences flanquantes des *cores* sont toutes aussi importantes pour permettre au LCR d'activer les gènes de  $\beta$ -globine (Molette et al., 2001).

Les études *in vivo* chez les souris transgéniques indiquent que le  $\beta$ LCR permet l'expression élevée des transgènes indépendamment du site d'intégration et de manière tissu spécifique (Grosveld et al., 1987; Townes & Behringer, 1990). Par ailleurs, le  $\beta$ LCR est un élément requis pour l'expression de tous les gènes de  $\beta$ -globine et ce à tous les stades de développement (Tuan et al., 1985; Forrester et al., 1986; Grosveld et al., 1987; Higgs, 1998). Cette fonction a été mise en évidence chez des patients humains  $\gamma\delta\beta$ -thalassémiques dans lesquels les gènes humains de  $\beta$ -globine n'étaient pas exprimés. L'examen des chromosomes mutants de ces patients a révélé que la portion du  $\beta$ LCR contenant les sites HS2-4 était absente alors que les gènes humains de  $\beta$ -globine demeuraient structurellement intacts (Driscoll et al., 1989). Cette délétion partielle du  $\beta$ LCR plaçait la chromatine dans une conformation «fermée» compromettant ainsi la transcription des gènes humains de  $\beta$ -globine (Forrester et al., 1990). Bien que les

données semblent affirmer que le  $\beta$ LCR permet l'ouverture de la chromatine du locus de  $\beta$ -globine (Li et al., 1998), d'autres études ont suggéré toutefois que la délétion entière de cette région dans le locus murin ou humain de  $\beta$ -globine ne change pas la sensibilité du locus à la DNaseI laissant penser que le  $\beta$ LCR n'est pas nécessaire au maintien de la chromatine dans sa configuration «ouverte» (Epner et al., 1998; Reik et al., 1998). À noter aussi que la fonction du  $\beta$ LCR est dépendante de son orientation (Tanimoto et al., 1999 & 2003). Tanimoto et al (1999) ont en effet montré que l'inversion du LCR réduit l'expression des gènes de  $\beta$ -globine et que le gène embryonnaire  $\epsilon$  n'est pas exprimé lorsque celui-ci est placé en amont du  $\beta$ LCR.

Certains HS du  $\beta$ LCR tels que HS1 et HS5 peuvent exercer un rôle de protection au locus de  $\beta$ -globine contre les effets néfastes de la chromatine environnante. La délétion spécifique de HS1 chez les souris transgéniques contenant le locus entier de  $\beta$ -globine humaine a montré que ce site est un composant du  $\beta$ LCR servant à protéger le locus contre la variéation due à l'effet de position du transgène (Milot et al., 1996). HS5 est aussi considéré comme étant un insulateur : il possède d'ailleurs des sites de liaison pour un facteur de transcription nommé CTCF qui est impliqué dans des mécanismes de répression transcriptionnelle (Li & Stamatoyannopoulos, 1994; Bell et al., 1999; Ohlsson et al., 2001; Li et al., 2002; Tanimoto et al., 2003). Les insulateurs ont la capacité de protéger un locus : 1) soit en fonctionnant comme une barrière entre l'euchromatine et l'hétérochromatine empêchant ainsi l'effet de position ou 2) soit comme étant des éléments bloquant les effets d'*enhancers* lorsqu'ils sont placés entre les *enhancers* et les régions promotrices des gènes. L'insulateur qui possède ces deux propriétés et qui a été le mieux caractérisé fut identifié à l'intérieur du LCR du locus de  $\beta$ -globine chez le poulet : il s'agit du HS4 lié par divers facteurs tel que CTCF (Chung et al., 1993 & 1997; Burgess-Beusse et al., 2002).

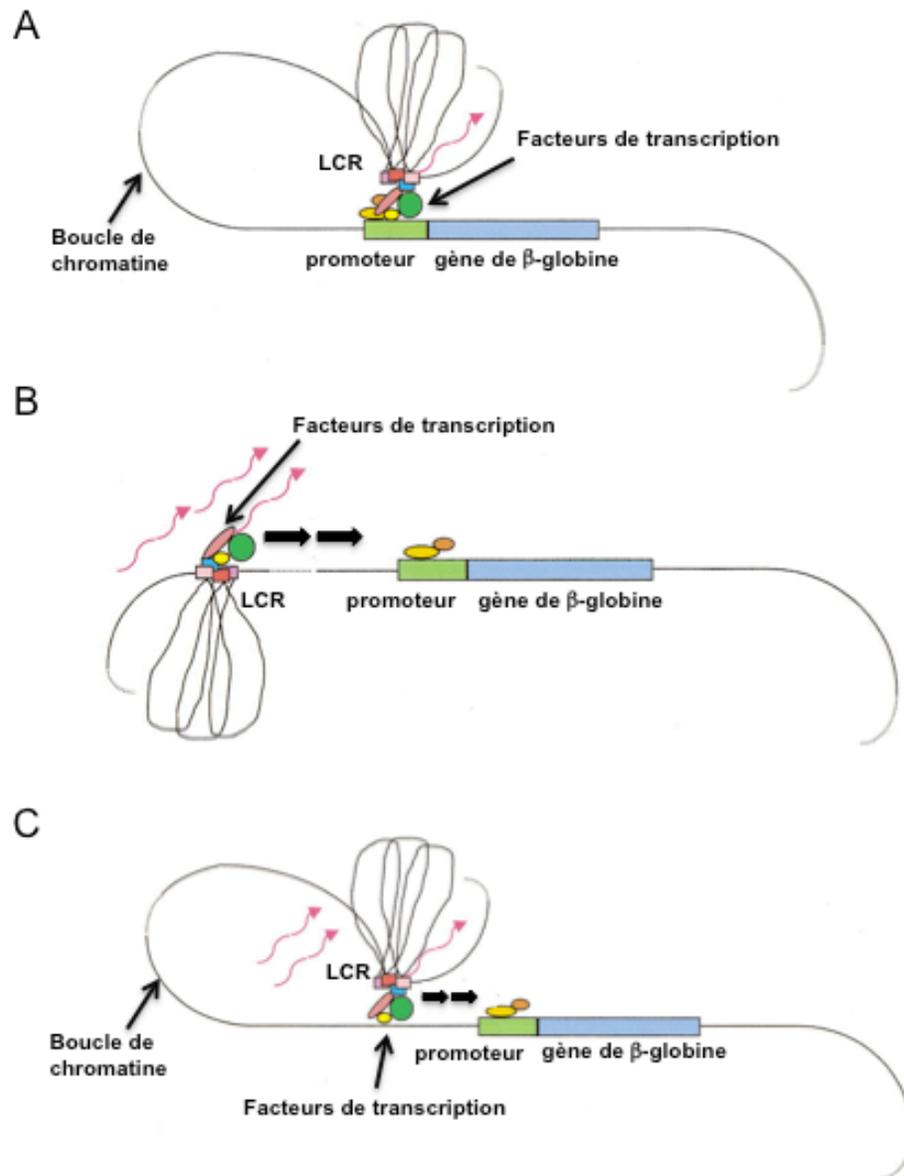
### 1.5.2 Modèles de régulation des gènes par le $\beta$ LCR

Des études ont démontré que le gène adulte  $\beta$  n'est pas correctement exprimé durant le développement lorsqu'il est lié directement au  $\beta$ LCR ( $\beta$ LCR- $\beta$ ). Par contre, son expression stade-spécifique est rétablie lorsque le gène  $\gamma$  est inséré dans la construction ( $\beta$ LCR- $\gamma$  $\beta$ ). Il existe une compétition entre les promoteurs des gènes  $\gamma$  et  $\beta$  globine pour l'activation par le  $\beta$ LCR (Behringer et al., 1990; Townes et al., 1990; Enver et al., 1990; Stamatoyannopoulos, 1991). D'autre part, Dillon et al (1991) ont démontré que l'expression stade-spécifique du gène  $\gamma$  chez les souris transgéniques LCR- $\gamma$  était conservée même s'il n'est pas lié au gène  $\beta$  indiquant que la compétition avec le gène  $\beta$  n'est pas requis pour la répression des gènes  $\gamma$ . Le gène embryonnaire  $\epsilon$  quant à lui requiert le  $\beta$ LCR pour pouvoir être activé spécifiquement dans les cellules érythroïdes primitives et les études chez les souris transgéniques contenant uniquement le gène  $\epsilon$  sous le contrôle du  $\beta$ LCR rapportent que ce gène conserve son expression stade spécifique suggérant un mécanisme de répression autonome (Shih et al., 1990; Raich et al., 1990&1992).

Le  $\beta$ LCR n'est cependant pas le seul élément dans la régulation génique. Dans les sites d'hypersensibilité HS1 à HS5, on trouve des sites de liaison pour des facteurs de transcription. Ces derniers sont connus pour participer à la transcription des gènes par l'ARN polymérase II. Les sites érythroïde-spécifiques HS1 à 4 possèdent en effet des sites de liaison pour des facteurs de transcription tels que GATA-1 et EKLF (Horack et al., 2002; Zhou et al., 2006). Ces facteurs de transcription ont d'ailleurs un rôle important dans la régulation des commutations de l'hémoglobine au cours du développement et dans l'érythropoïèse primitive et définitive mais ils ne sont pas les seuls acteurs impliqués. Le facteur de transcription NF-E2 par exemple possède des sites de liaison dans différents HS (Talbot & Grosveld, 1991; Stamatoyannopoulos et al., 1995). Un autre facteur de transcription, nommé Sp1, se lie aussi au niveau du  $\beta$ LCR; il possède notamment six sites de liaison fonctionnels dans le 5'HS3 qui sont essentiels pour l'activité du  $\beta$ LCR (Philipsen et al., 1990 & 1993; Ellis et al., 1996). La présence de ces sites de liaison n'est pas le fruit du hasard car elle suggère l'implication des facteurs de transcription dans la régulation des gènes du locus de  $\beta$ -globine par le  $\beta$ LCR.

Il a été en effet suggéré que des facteurs de transcription participent à un mécanisme de régulation dans lequel les promoteurs fœtaux et adultes compétitionnent pour le  $\beta$ LCR pendant le développement, ce qui expliquerait que le gène  $\beta$  est réprimé pendant le stade fœtal alors que le gène  $\gamma$  l'est durant le stade adulte (Choi & Engel, 1999).

Trois principaux modèles de régulation ont été proposés pour pouvoir expliquer de quelle manière ces gènes de globines sont régulés à un stade développement spécifique et comment le  $\beta$ LCR active leur expression (Figure 1.12). L'un des modèles suggère la formation d'une boucle de chromatine qui favorise le rapprochement du  $\beta$ LCR auprès des gènes de  $\beta$ -globine pour activer leur expression. Les facteurs de transcription lient leurs sites respectifs dans les HS et les promoteurs et participent à la régulation génique par le  $\beta$ LCR. Dans le modèle du balayage, la machinerie transcriptionnelle lie d'abord le  $\beta$ LCR puis longe l'ADN pour trouver le promoteur d'un gène actif; l'inactivation du gène proximal permet l'activation des gènes distaux. Le modèle du balayage facilité regroupe les aspects des deux modèles précédents : la machinerie transcriptionnelle se lie d'abord au  $\beta$ LCR et la formation d'une boucle de chromatine permet le rapprochement de ce complexe auprès des gènes actifs. Le complexe  $\beta$ LCR-facteurs de transcription longe ensuite l'ADN pour chercher d'autres gènes actifs. Des techniques comme celui du 3C (pour *Chromosome Conformation Capture*) ont permis de confirmer le rapprochement du  $\beta$ LCR auprès des gènes de  $\beta$ -globine pour l'activation stade-spécifique (Carter et al., 2002; Tolhuis et al., 2002; Palstra et al., 2003).



### Figure 1.12. Les modèles de régulation génique par le $\beta$ LCR

**Légende:** Les sites d'hypersensibilité HS1 à HS4 du LCR sont représentés par des boîtes de couleurs différentes et les facteurs de transcription par des cercles et ovales colorés. Le gène de globine est montré par un rectangle bleu alors que sa région promotrice par un rectangle vert. Les flèches roses représentent l'expression des gènes. Les deux flèches noires consécutives indiquent le balayage effectué par la machinerie transcriptionnelle liée au LCR. (A) Modèle de la boucle de chromatine, (B) Modèle du balayage et (C) Modèle du balayage facilité. **Références:** Harju et al., 2002; Choi & Engel, 1988; Tuan et al., 1992; Engel & Tanimoto, 2000).

## 1.6 Les facteurs de transcription

Différents facteurs de transcription régulent l'expression des gènes du locus de  $\beta$ -globine. Ils participent à la machinerie transcriptionnelle en formant des complexes dans lesquels des interactions protéine-protéine et/ou protéine-ADN ont lieu et impliquent les éléments *cis*-régulateurs, promoteurs et le  $\beta$ LCR. Dans cette section, nous allons décrire l'importance de certains facteurs de transcription érythroïde-spécifiques et ubiquitaires dans la régulation des gènes de  $\beta$ -globine. Ces facteurs trans-régulateurs ont été caractérisés chez la souris et les découvertes à leur sujet ont apporté et apporte actuellement de nouvelles perspectives quant à la compréhension des mécanismes régulant les commutations de l'hémoglobine pendant le développement.

### 1.6.1 La famille GATA

#### 1.6.1.1 Caractéristiques de la famille GATA

La famille GATA comprend six facteurs de transcription (GATA1 à 6) qui lient une séquence consensus (A/T)GATA(A/G) à l'aide de leur deux motifs doigts de zinc C<sub>4</sub> (Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>17</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys) qui sont caractéristiques de cette famille (Martin & Orkin, 1990; Yanamoto et al., 1990; Ko & Engel, 1993; Merika & Orkin, 1993 ; Whyatt et al 1993 ). La famille GATA est divisée en deux sous-familles : les facteurs de transcription GATA1 à 3 appartiennent à la sous-famille hématopoïétique (Weiss & Orkin, 1995) alors que GATA4 à GATA6 appartient à la sous-famille non hématopoïétique car ils sont exprimés et impliqués dans d'autres tissus tels que l'intestin, le poumon et le cœur (Laverriere et al., 1994; Charron & Nemer, 1999; Molkentin, 2000).

#### 1.6.1.2 GATA1

Connu sous le nom de NF-E1, NF-1, Ery-1 ou GF-1, GATA1 est le premier membre de la famille GATA à être identifié et probablement celui qui a été le plus étudié (Evans et al., 1988; Wall et al., 1988). Cette protéine possède trois domaines fonctionnels : un domaine d'activation en position N-terminal suivi de deux régions en doigt de zinc. Le domaine en doigt de zinc situé en position C-terminale de GATA1 est important pour la liaison à l'ADN (Martin et al., 1990; Yang & Evans, 1992). Chez

l'humain et la souris, le gène GATA1 est localisé sur le chromosome X (Zon et al., 1990). GATA1 est fortement exprimé non seulement dans les cellules érythroïdes primitives et définitives (Leonard et al., 1993; Fujiwara et al., 1996) mais aussi dans d'autres cellules hématopoïétiques tels que les mégacaryocytes (Martin et al., 1990; Romeo et al., 1990). Au cours du développement *in utero* chez la souris, le gène GATA1 est exprimé dès le début de l'érythropoïèse primitive dans le sac vitellin vers l'âge E8.5. Son niveau d'expression dans le sac vitellin entre E8.5 et E11.5 reste faible comparé à celui du foie fœtal. En effet, GATA1 est fortement exprimé au cours de l'érythropoïèse définitive dans le foie fœtal. Le niveau de GATA1 reste élevé dans le foie jusqu'à E15.5 mais chute à E16.5 au moment où l'érythropoïèse prend place dans la rate et la moelle osseuse (Whitelaw et al., 1990).

### **1.6.1.3 Rôle de GATA1 dans l'érythropoïèse**

L'importance du facteur GATA1 dans l'érythropoïèse a été établie dans un premier temps par des études dans les cellules souches embryonnaires murines (cellules ES). Le gène GATA1, situé sur le chromosome X, a été délété par recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires murines mâles afin de produire des souris chimériques et d'observer si les cellules déficientes en GATA1 (GATA1<sup>-</sup>) pouvaient générer tous les tissus *in vivo* (Pevny et al., 1991). Il a été constaté que les cellules ES GATA1<sup>-</sup> pouvaient contribuer à tous les tissus non hématopoïétiques mais échouaient dans la production de cellules érythroïdes matures. De plus, au cours de la différenciation érythroïde *in vitro* des cellules ES GATA1<sup>-</sup>, les précurseurs érythroïdes primitifs et définitifs sont produits mais restent bloqués au stade de proérythroblaste et ne peuvent pas continuer leur processus de maturation (Weiss et al., 1994; Pevny et al., 1995). Ces précurseurs érythroïdes meurent ensuite par apoptose (Weiss et al., 1995). En l'absence de GATA1 au cours du développement, les embryons murins démontrent à l'âge embryonnaire 9.5 (E9.5) une pâleur extrême et meurent entre E10.5 et E11.5 d'une anémie sévère (Fujiwara et al., 1996). GATA1 apparaît comme un facteur indispensable dans la maturation des précurseurs érythroïdes ainsi qu'à leur survie au cours de l'érythropoïèse primitive et définitive. D'autres évidences suggèrent le rôle de GATA1 dans l'érythropoïèse : des sites de liaison de GATA1 ont en effet été retrouvés dans les

régions promotrices de gènes exprimés spécifiquement dans les cellules érythroïdes. Parmi les gènes cibles de GATA1, on retrouve ceux codant pour certains enzymes impliqués dans la biosynthèse de l'hème tels que l'ALA synthase (*ALA-S*), l'ALA déshydratase (*ALA-D*) et la PBG déaminase (*PBGD*) (Mignotte et al., 1989; Orkin, 1992; Rylski et al., 2003). De plus, GATA1 possède plusieurs sites de liaison dans le locus de  $\beta$ -globine.

La protéine GATA1 lie quatre sites dans l'*enhancer* situé en 3' du gène humain de  $\beta$ -globine (Wall et al., 1988). Il possède d'ailleurs des sites de liaison dans le promoteur du gène humain  $\gamma$  (Martin et al., 1989; Nicolis et al., 1989). De plus, comme il a été mentionné précédemment, GATA1 se lie aux *cores* des sites d'hypersensibilité à la DNaseI du LCR (HS1 à 5). GATA1 peut agir comme activateur ou répresseur dans la régulation des gènes de  $\beta$ -globine dépendamment des séquences qu'il lie ainsi que des interactions avec d'autres protéines. GATA1 est capable d'activer l'expression du gène humain  $\epsilon$  (Li et al., 1998) mais peut aussi le réprimer en présence du facteur de transcription ubiquitaire YY1 (Raich et al., 1995). GATA1 agit comme activateur lorsqu'il est lié au promoteur du gène  $\gamma$  ou aux sites HS1 à 5 (Jane & Cunningham, 1996). De plus, l'augmentation de la transcription de GATA1 murin au début de l'érythropoïèse définitive (E11.5-E12.5) dans le foie fœtal semble coïncider avec la transcription des gènes adultes de globine suggérant l'implication de GATA1 dans la commutation de l'hémoglobine (Whitelaw et al., 1990). Néanmoins, il a été proposé qu'en absence de GATA1, la transcription des gènes murins de globines soit activée laissant penser que GATA1 n'est pas un facteur essentiel dans l'expression des gènes de globines (Fujiwara et al., 1996).

#### **1.6.1.4 Régulation de l'érythropoïèse par GATA1 et GATA2**

Le second membre de la famille GATA, GATA2, est exprimé dans les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques ainsi que dans les cellules endothéliales. On le retrouve aussi dans d'autres tissus tels que le placenta, le foie fœtal et le cœur fœtale (Tsai et al., 1994 ; Orlic et al., 1995 ; Tsai & Orkin, 1997; Minegishi et al., 1998).

GATA2 joue un rôle essentiel dans les premières étapes de l'hématopoïèse notamment dans la prolifération cellulaire et représente un important régulateur pour

l'érythropoïèse (Tsai et al., 1994). Son expression diminue à mesure que l'érythropoïèse progresse (Cantor & Orkin, 2002). Il a été démontré que la surexpression de GATA2 bloque l'érythropoïèse et affecte la différenciation des précurseurs érythroïdes (Briegel et al., 1993; Persons et al., 1999). Les embryons murins GATA2<sup>-/-</sup> sont sévèrement anémiques et meurent vers E10.5 mais sont capables de produire des érythroblastes primitifs (Tsai et al., 1994). Ces derniers sont cependant absents chez les embryons GATA1<sup>-/-</sup> GATA2<sup>-/-</sup> indiquant la fonction redondante de GATA1 et GATA2 dans la production et/ou la survie des érythroblastes primitifs (Fujiwara et al., 2004).

En outre, il s'avère que l'expression de GATA2 est influencée par GATA1. Des données ont en effet montré que l'expression de GATA2 est augmentée en absence de GATA1 (Weiss et al., 1994). De plus, lorsque l'expression de GATA1 est activée et que ses niveaux augmentent, GATA2 est parallèlement réprimé, laissant la possibilité d'une régulation de GATA2 par GATA1. Ceci fut confirmé par l'identification d'un site de liaison de GATA1 dans le promoteur de GATA2 et par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) (Grass et al., 2003).

#### **1.6.1.5 Friend of GATA**

Friend of GATA (FOG, FOG1 ou ZFPM1) est une protéine contenant neuf doigts de zinc et agit en tant que cofacteur de GATA1 en se liant spécifiquement au doigt de zinc situé en N-terminal de GATA1 (Tsang et al., 1997 ; Fox et al., 1998). FOG1 est coexprimé avec GATA1 au cours du développement (Tsang et al., 1997). Le phénotype des souris FOG<sup>-/-</sup> ressemble au celui des souris GATA1<sup>-/-</sup>. En effet, les souris FOG<sup>-/-</sup> meurent pendant le développement embryonnaire entre E10.5 et E11.5 d'une anémie sévère résultant d'un arrêt dans l'érythropoïèse primitive et définitive suggérant un rôle essentiel de FOG1 pendant l'érythropoïèse (Tsang et al., 1998). L'interaction entre GATA1 et FOG1 dans les cellules érythroïdes a été démontré: les précurseurs érythroïdes exprimant des protéines GATA1 mutantes sont incapables de lier FOG1 et ne peuvent pas poursuivre leur maturation mais le phénotype est rétablie lorsque des protéines FOG1 mutantes capables de lier les GATA1 mutants sont exprimés (Crispino et al., 1999). De plus, un modèle a été proposé dans lequel le gène FOG1 est tout d'abord activé par GATA1 dans les cellules érythroïdes puis que les deux facteurs

coopèrent dans la régulation (activation ou répression) des gènes du locus de  $\beta$ -globine (Welch et al., 2004).

#### **1.6.1.6 Interactions protéiques de GATA1**

GATA1 peut aussi interagir avec d'autres protéines pour moduler son activité. Parmi elles, on retrouve les facteurs de transcription LMO-2 (Osada et al., 1995&1997), PU.1 (Zhang et al., 1999 ; Rektman et al., 1999 ; Nerlov et al., 2000) et ceux de la famille SP/KLF (Gregory et al., 1996 ; Merika & Orkin, 1995).

#### **1.6.2 Sp1**

Sp1 appartient à la grande famille Sp/KLF. Toutes les protéines de cette famille possèdent en C-terminal un domaine de liaison à l'ADN de 81 acides aminés qui consiste en trois doigts de zinc de type  $C_2H_2$  arrangés de façon similaire à ceux retrouvés dans la protéine Krüppel de la drosophile *Drosophila melanogaster* (Philipsen & Suske, 1999). C'est ainsi que certaines protéines ont été nommées facteurs de type-Krüppel (KLF). Les protéines appartenant à cette famille ont de plus la caractéristique de reconnaître et lier les motifs GC, GT et/ou CACC (Hagen et al., 1992; Kingsley & Winoto, 1992; Miller & Bieker, 1993).

Sp1 est le membre fondateur de la famille Sp/KLF et l'un des premiers facteurs de transcription à être découvert chez les eucaryotes (Dyran & Tijan, 1983). Il possède trois doigts de zinc  $C_2H_2$  et lie le site consensus GGG GCG GGG (Letovsky & Dyran, 1989). SP1 est ubiquitaire mais son expression change selon le type cellulaire et au cours du développement (Saffer et al., 1991). Les embryons murins  $Sp1^{-/-}$  présentent un important retard de croissance ainsi que diverses anomalies morphologiques qui font en sorte qu'ils survivent jusqu'à E9.5 confirmant l'importance de Sp1 dès le début de l'embryogénèse (Marin et al., 1997). Fait intéressant, l'érythropoïèse primitive n'est pas complètement affectée chez les embryons  $Sp1^{-/-}$ . En effet, bien que la transcription des gènes embryonnaires murins de type  $\alpha$ - ( $\zeta$ ) et  $\beta$ -globine ( $\epsilon\gamma$  et  $\beta h_1$ ) est perturbée, leur niveau reste élevé suggérant que Sp1 n'est pas un facteur clé dans l'activation de ces gènes au stade précoce du développement embryonnaire, du moins pas à l'âge embryonnaire murin E8.5.

### 1.6.3 KLF1/EKLF

KLF1 communément appelé EKLF (Krüppel-Like Factor 1/ Erythroid Krüppel-Like Factor) a été découvert en 1993 et a été identifié comme étant un facteur de transcription appartenant à la famille Sp/KLF capable de lier spécifiquement les motifs CACC de l'ADN à l'aide de ses doigts de zinc  $C_2H_2$  (Miller & Bieker, 1993). Ces boîtes CACC sont retrouvés dans les promoteurs de nombreux gènes érythroïdes tels que ceux codant pour les globines, les enzymes de synthèse de l'hème, les protéines transmembranaires et d'autres facteurs de transcription (Raich & Romeo, 1993; Drissen et al., 2005). KLF1 est le premier membre identifié de la famille KLF qui compte 17 autres facteurs de transcription exprimés dans différents tissus et impliqués dans divers processus biologiques tels que la prolifération, l'apoptose, la différenciation et le développement (Pearson et al., 2008). De plus, plusieurs de ces membres incluant KLF2 sont exprimés dans les cellules érythroïdes (Crossley et al., 1996; Basu et al., 2004 & 2005; Matsumoto et al., 2006).

#### 1.6.3.1 EKLF, cible de GATA1

Trois sites de liaison du facteur de transcription GATA1 ont été identifiés dans le promoteur d'EKLF murin dont un est critique pour la transcription (Crossley et al., 1994; Anderson et al., 2000). Les analyses menées *in vitro* puis *in vivo* chez la souris ont proposé que l'expression du gène EKLF soit régulée par le facteur de transcription GATA1. Il semble que l'expression forcée de GATA1 active le promoteur d'EKLF dans les cellules non-érythroïdes (Crossley et al., 1994). De plus, l'expression d'EKLF est réduite en absence de GATA1 mais elle est restaurée lorsque l'expression de GATA1 est réintroduite dans les cellules (Shirihai et al., 2000; Whyatt et al., 2000). Les données semblent indiquer que l'expression d'EKLF est dépendante de GATA1, ce qui suggère la participation de ces deux facteurs de transcription dans le processus érythropoïétique.

#### 1.6.3.2 Rôle d'EKLF dans l'érythropoïèse définitive

Au cours du développement humain et murin, EKLF est exprimé exclusivement dans les cellules érythroïdes. Les études d'hybridation *in-situ* chez la souris ont par ailleurs permis de retracer l'expression d'EKLF dans les différents organes où a lieu

l'érythropoïèse (Southwood et al., 1996). En effet, EKLF est détecté dès l'âge E7.5 dans les îlots sanguins du sac vitellin puis son expression prend place dans le foie durant le stade fœtal et a finalement lieu dans la rate et la moelle osseuse au stade adulte.

Diverses études chez la souris ont proposé la présence d'EKLF dans les cellules érythroïdes primitives et définitives (Guy et al., 1998; Tewari et al., 1998; Hodge et al., 2006). Son rôle essentiel au cours de l'érythropoïèse a d'ailleurs été identifié *in vivo* par ablation génique chez la souris. Dès 1995, deux groupes de chercheurs (Nuez et al., 1995; Perkins et al., 1995) ont démontré que les embryons murins EKLF nulle ( $EKLF^{-/-}$ ) ont une apparence «normale» durant l'érythropoïèse primitive dans le sac vitellin mais deviennent anémiques à mesure que le développement embryonnaire progresse notamment lorsque l'érythropoïèse prend place dans le foie. En effet, les embryons  $EKLF^{-/-}$  présentent un phénotype de type  $\beta$ -thalassémique indiquant la présence de défauts dans l'érythropoïèse définitive fœtal. L'absence d'EKLF n'affecte ni l'expression du gène  $\alpha$  murin ni l'expression des gènes embryonnaires  $\beta_{H1}$  et  $\epsilon\gamma$  mais en revanche diminue de manière significative l'expression du gène adulte murin ( $\beta^{maj}$ ), ce qui cause un débalancement dans la production de l'hémoglobine adulte murine (Nuez et al., 1995; Perkins et al., 1995). Une diminution significative de l'expression de  $\beta$ -globine est connue pour altérer le ratio équimolaire  $\alpha/\beta$  et entraîner la précipitation des chaînes de globine  $\alpha$  dans les érythroblastes conduisant ainsi à la formation des corps de Heinz qui déforment et rendent instable la membrane des cellules érythroïdes (Perkins et al., 1995; Drissen et al., 2005). Ces cellules sont éliminées par hémolyse et conduit à une anémie sévère. D'ailleurs, l'absence d'EKLF ne permet pas aux embryons murins d'atteindre le stade adulte : ils meurent *in utero* vers E14.5-E15.5 au moment où l'embryon requiert les cellules érythroïdes définitives fœtales pour poursuivre son développement (Nuez et al., 1995). Pour déterminer si le déficit de l'expression de  $\beta$ -globine murine était le seul responsable du phénotype létal observé, les chercheurs ont surexprimé le gène  $\gamma$  humain chez les embryons murins  $EKLF^{-/-}$  (Lim et al., 1997; Perkins et al., 2000). Ils ont pu constater une correction du débalancement des chaînes de globine à l'intérieur des cellules érythroïdes  $EKLF^{-/-}$  qui était attribuée à la production d'hémoglobine hybride ( $m\alpha_2-h\gamma_2$ ). En revanche, l'hémolyse cellulaire persistait et la survie des embryons n'était pas prolongée, ce qui semblait indiquer que l'expression

d'autres gènes érythroïdes était affectée et contribuait à la mort intra-utérine des embryons  $EKLF^{-/-}$ . Dans les érythroblastes, la synthèse des globines est liée à celle de la synthèse de l'hème afin de produire des molécules d'hémoglobines fonctionnelles. Il s'avère que l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'hème est significativement réduite lorsque  $EKLF$  est absent (Drissen et al., 2005). De plus, de nombreux autres gènes érythroïdes sont aussi régulés significativement à la baisse. Cela inclut les gènes codant pour les protéines du cytosquelette (Azim et al., 1999) et d'importantes protéines membranaires tels que la glycophorine A (GPA;  $Ter119^+$ ) et le récepteur de la transferrine (CD71) (Hodge et al., 2006). La dépendance de plusieurs gènes érythroïdes pour le facteur  $EKLF$  dans le foie fœtal semble expliquer en parti pourquoi l'expression du gène humain  $\gamma$  ne rétablit pas le phénotype des embryons murins  $EKLF^{-/-}$ .

### 1.6.3.3 Rôle d' $EKLF$ dans l'érythropoïèse primitive

Bien qu'il ait été rapporté précédemment que les embryons murins  $EKLF^{-/-}$  apparaissent normaux durant l'érythropoïèse primitive du sac vitellin, des études récentes indiquent que les cellules érythroïdes primitives  $EKLF^{-/-}$  présentent une membrane instable et déformée due à la précipitation des chaînes de globine  $\alpha$  (Drissen et al., 2005; Hodge et al., 2006). La survie de ces cellules ne semble cependant pas être affectée comparativement à celles des cellules définitives fœtales  $EKLF^{-/-}$ . Les embryons  $EKLF^{-/-}$  possédant le locus humain de  $\beta$ -globine ont un niveau d' $\epsilon$  réduit (Tanimoto et al., 2000) et des analyses de ChIP dans les cellules érythroïdes primitives murines ont démontré qu' $EKLF$  lie les boîtes CACC dans les promoteurs des gènes  $\epsilon\gamma$  et  $\beta h_1$  (Zhou et al., 2006) suggérant le rôle de  $EKLF$  dans l'érythropoïèse primitive. D'ailleurs,  $EKLF$  est impliqué avec  $KLF2$  et  $c-myc$  dans l'expansion et la maturation des cellules érythroïdes primitives (Pang et al., 2012). Le lien entre  $KLF1$ ,  $KLF2$  et  $c-myc$  est abordé dans la section 1.6.3.7.

### 1.6.3.4 Importance d' $EKLF$ dans la commutation fœtale-adulte

Le facteur de transcription  $EKLF$  est impliqué dans la régulation des gènes érythroïdes par le biais de sa liaison aux régions promotrices contenant les motifs

CACC. Une boîte CACC est d'ailleurs retrouvée dans le promoteur du gène adulte de  $\beta$ -globine environ 90 pb en amont du site de transcription (Miller & Bieker, 1993). Des études ont en plus montré que des mutations ponctuelles dans cette boîte CACC étaient associés au phénotype  $\beta$ -thalassémique (Orkin et al., 1982&1984) et inhibaient la liaison de KLF1 pour cette région (Feng et al., 1994). Bien que les boîtes CACC soient retrouvées dans plusieurs promoteurs des gènes érythroïdes, EKLF ne les lie pas avec la même affinité. EKLF a par exemple huit fois plus d'affinité pour la boîte CACC du promoteur du gène adulte de  $\beta$ -globine humaine que celle présente dans le promoteur du gène humain de  $\gamma$ -globine confirmant le rôle préférentiel d'EKLF dans l'activation du gène de  $\beta$ -globine (Donze et al., 1995). Cependant, l'ablation de la boîte CACC du promoteur du gène  $\gamma$  altère la régulation développementale du gène adulte  $\beta$ -globine dans les souris transgéniques suggérant que cet élément est essentiel pour la mise en place de la commutation fœtale à adulte (Ryan et al., 2000; Sargent et al., 2001).

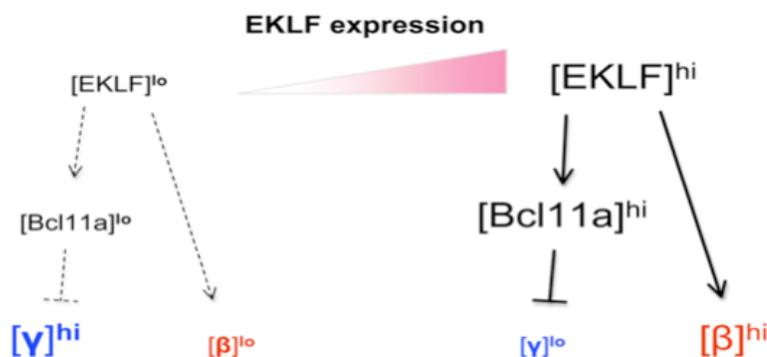
Des études chez les souris transgéniques ont confirmé l'importance de KLF1 dans la commutation de l'hémoglobine fœtale à adulte. Les embryons EKLF<sup>-/-</sup> possédant le locus entier de  $\beta$ -globine humain montrent une expression élevée du gène  $\gamma$  (5 fois plus abondante) alors que celle du gène humain  $\beta$  est significativement réduite; ces souris meurent cependant au cours de l'érythropoïèse fœtale à cause de leur phénotype  $\beta$ -thalassémique (Wijgerde et al., 1996; Perkins et al., 1996). De plus, lorsqu'on surexprime EKLF dans les souris transgéniques, la commutation fœtale-adulte est prématurée (Tewari et al., 1998). Pris ensemble, ces études ont suggéré fortement le rôle de KLF1 dans la commutation de l'hémoglobine fœtale à adulte.

#### **1.6.3.5 Régulation des gènes fœtaux par EKLF et BCL11A**

Bien que plusieurs données aient été en faveur de l'implication d'EKLF dans la régulation des gènes fœtaux et adultes, le mécanisme par lequel a lieu la répression des gènes  $\gamma$  restait méconnu. Des études d'association génétique (*GWAS: Genome-Wide Association Studies*) ont été entreprises chez l'humain et ont permis de mettre en évidence d'autres facteurs pouvant être impliqués dans la régulation des gènes fœtaux. Ainsi, il semble que certains polymorphismes (*SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms*) dans le génome humain soient associés à la variation de l'HbF (Thein et

al., 2007; Menzel et al., 2007; Uda et al., 2008). Un des SNPs a été localisé sur le chromosome 2 et plus précisément dans l'intron 2 du gène codant pour le facteur de transcription à doigt de zinc BCL11A exprimé dans les cellules érythroïdes. Le polymorphisme dans le gène BCL11A semble être associé à des niveaux élevés d'HbF au stade adulte; il est d'ailleurs fréquent chez des patients avec une HPFH et ceux qui ont des symptômes moins sévères de la  $\beta$ -thalassémie (Uda et al., 2008). À noter que le SNP BCL11A compte à lui seul pour 15 % de la variation totale d'HbF estimée à 44 % (Menzel et al., 2007).

Sankaran et al (2008) ont ensuite proposé que la production d'HbF soit augmentée dans les érythroblastes humains après que l'expression de BCL11A ait été significativement réduite par shRNA. De plus, lorsque BCL11A est absent, une dérégulation de l'expression du transgène  $\gamma$  et du gène embryonnaire murin est observée (Sankaran et al., 2009). D'autres études ont ensuite suggéré un lien entre KLF1 et BCL11A dans le mécanisme de régulation de l'hémoglobine (Zhou et al., 2010). En effet, il semble que lors de la transition fœtale-adulte, l'augmentation de l'expression de KLF1 dans les cellules érythroïdes entraîne non seulement l'activation du gène  $\beta$  mais aussi une augmentation de l'expression du facteur de transcription BCL11A qui à son tour réprime les gènes  $\gamma$  (Figure 1.13) (Lettre et al., 2008; Zhou et al., 2010). La régulation de BCL11A par KLF1 fut par ailleurs confirmée par ChIP: EKLF semble se lier *in vivo* à la région promotrice de BCL11A chez la souris et l'humain (Zhou et al., 2010; Borg et al., 2010). Le mécanisme de régulation impliquant KLF1 et BCL11A a été mis en avant par une autre étude chez l'humain impliquant des individus d'une même famille atteints de persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale (HPHF) et porteurs d'une mutation non sens dans l'une des deux copies (gènes) codant pour KLF1 (Borg et al., 2010). La mutation hétérozygote avait pour conséquence une ablation du site de liaison à l'ADN de la protéine et entraînait une haploinsuffisance de l'expression de KLF1. Les études d'expression menées à partir de progéniteurs érythroïdes provenant de ces patients ont montré que l'expression de BCL11A était significativement réduite et que le niveau d'expression des gènes fœtaux était élevé.



### Figure 1.13. EKLf et la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte

**Légende:** Durant le stade embryonnaire et fœtal humain, les faibles niveaux d'EKLf empêchent l'expression de  $\beta$  et celle de BCL11A, ce qui résulte en une expression élevée des gènes fœtaux  $\gamma$ . Au stade adulte, les niveaux élevés d'EKLf permettent l'activation du gène adulte  $\beta$  et l'augmentation des niveaux de BCL11A ce qui entraîne la répression des gènes fœtaux  $\gamma$ . **Référence:** Siatecka & Bieker, 2011.

#### 1.6.3.6 EKLf, BCL11A et SOX6

Sox6 appartient à la famille des facteurs de transcription SOX (Sry-type HMG box) caractérisée par la présence d'un domaine HMG qui permet la liaison au sillon mineure de l'ADN et engendre une distortion significative de la molécule (75°-85°) ainsi que des changements conformationnels de la chromatine (Ferrari et al., 1992; Connor et al., 1994). SOX6 est impliqué dans le développement du système nerveux, du cartilage, du muscle squelettique et du cœur (Connor et al., 1995; Hagiwara et al., 2000; Cohen-Barak et al., 2003; Ikeda et al., 2004; Hagiwara et al., 2007). L'ablation de ce facteur de transcription résulte en un retard de croissance, une myopathie et des problèmes cardiaques. Les souris SOX6-déficientes meurent environ 2 semaines après leur naissance (Hagiwara et al., 2000; Dumitriu et al., 2006).

Différentes études ont récemment révélé le rôle de SOX6 dans l'érythropoïèse. Dumitriu et al (2006) ont montré que l'absence de SOX6 conduit d'une part à l'augmentation du nombre de cellules érythroïdes primitives nucléées dans la circulation fœtale et d'autre part à la déformabilité des cellules érythroïdes définitives qui compromet leur survie et entraîne une anémie au cours du développement embryonnaire. Ces observations ont suggéré que SOX6 était cruciale pour l'érythropoïèse définitive chez la souris. D'ailleurs, l'absence de SOX6 est associée à une persistance de

l'expression du gène embryonnaire  $\epsilon y$  durant le stade embryonnaire/fœtal de la souris. Il a été démontré que SOX6 lie le promoteur du gène  $\epsilon y$  *in vitro* et *in vivo* indiquant son rôle de répresseur dans la régulation du gène  $\epsilon y$  au cours de l'érythropoïèse définitive (Dumitriu et al., 2006; Yi et al., 2006; Cohen-Barak et al., 2007). Par ailleurs, les données indiquent que SOX6 murin et humain sont identiques à 94% au niveau de leur séquence d'acides aminés suggérant le possible rôle de SOX6 dans la répression du gène embryonnaire humain  $\epsilon$  au moment où l'érythropoïèse définitive se met en place (Cohen-Barak et al., 2001). Cantu et al (2011) ont proposé que SOX6 réprime les gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$  en se liant à leur promoteur dans les cellules érythroleucémiques K562.

En plus de réguler les gènes embryonnaires, SOX6 semble coopérer avec BCL11A pour réprimer les gènes fœtaux  $\gamma$ . Xu et al (2010) ont en effet montré que BCL11A ne lie pas les régions promotrices des gènes  $\gamma$  mais semble plutôt agir à longue distance par des interactions avec des facteurs comme Mi-2/NurD, GATA-1, FOG-1 et SOX6. Les auteurs ont ainsi proposé que SOX6 agirait comme un cofacteur de BCL11A lors de la répression de  $\gamma$ . À ce jour, les données semblent favoriser la voie KLF1-BCL11A-SOX6 pour expliquer la répression de  $\gamma$  lors de la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte (Sankaran et al., 2011). Néanmoins d'autres membres de la famille KLF et d'autres facteurs impliqués dans la prolifération participent au mécanisme complexe de régulation des gènes de  $\beta$ -globines.

### 1.6.3.7 KLF1, KLF2 et *c-myc*

KLF2 ou LKLF (Lung Krüppel-like factor) est un autre membre de la famille KLF exprimé au cours du développement dans les cellules érythroïdes primitives et définitives (Basu et al., 2004; Zhang et al., 2005). Les souris KLF2<sup>-/-</sup> sont normales avant l'âge embryonnaire E12.5 mais meurent ensuite de problèmes cardiaques et d'hémorragies internes entre E12.5 et E14.5; des défauts dans l'angiogénèse et la vasculogénèse en sont la cause (Kuo et al., 1997; Wani et al., 1998). Ces embryons présentent un retard de croissance et sont anémiques. Basu et al (2005) ont montré qu'une réduction significative des gènes embryonnaires murins ( $\epsilon y$  et  $\beta h_1$ ) était observée chez les embryons KLF2<sup>-/-</sup> mais que l'expression de  $\beta^{\text{maj}}$  et  $\beta^{\text{min}}$  dans le foie fœtal n'était pas affectée à E12.5. Chez les embryons transgéniques KLF2<sup>-/-</sup> possédant le locus

humain de  $\beta$ -globine, le niveau d'expression du gène humain  $\epsilon$  était réduit mais pas celle du gène adulte de  $\beta$ -globine humain, ce qui semblait confirmer le rôle de KLF2 dans la régulation des gènes embryonnaires.

Basu et al (2007) ont par ailleurs mis en évidence les fonctions redondantes et compensatoires entre KLF1 et KLF2. Chez les embryons doubles KLF1<sup>-/-</sup> KLF2<sup>-/-</sup>, l'expression d' $\epsilon$ y et  $\beta$ h<sub>1</sub> était davantage réduite comparée à celle des embryons KLF1<sup>-/-</sup> ou KLF2<sup>-/-</sup>. De plus, les embryons KLF1<sup>-/-</sup> KLF2<sup>-/-</sup> étaient sévèrement anémiques à E10.5 et mouraient avant E11.5 alors que les embryons simples KLF1<sup>-/-</sup> ou KLF2<sup>-/-</sup> apparaissent normaux à E10.5 et meurent plus tard dans le développement. À noter que les cellules érythroïdes KLF1<sup>-/-</sup> KLF2<sup>-/-</sup> étaient particulièrement déformées suggérant un lien entre KLF1 et KLF2 dans les cellules érythroïdes primitives embryonnaires.

Les rôles combinés de KLF1 et KLF2 dans l'érythropoïèse primitive ont récemment été investigués afin d'identifier notamment les gènes contrôlés par ces deux facteurs de transcription. Pang et al (2012) ont ainsi procédé à l'analyse d'expression de plusieurs gènes dans les cellules érythroïdes primitives d'embryons sauvages (WT), d'embryons simples KLF1<sup>-/-</sup> et doubles KLF1<sup>-/-</sup> KLF2<sup>-/-</sup> à l'âge E9.5. Les résultats de l'étude semblaient montrer que l'expression du gène *c-myc* était davantage réduite dans les cellules érythroïdes primitives KLF1<sup>-/-</sup> KLF2<sup>-/-</sup> comparativement à celle mesurée dans les cellules érythroïdes primitives simples KLF1<sup>-/-</sup> ou KLF2<sup>-/-</sup>, suggérant le synergisme de ces facteurs dans la régulation de *c-myc*. D'ailleurs, Pang et al (2012) ont montré que KLF1 et KLF2 sont impliqués dans la transactivation du facteur de transcription *c-myc*. La même étude a ensuite proposé que l'ablation conditionnelle du gène *c-myc* spécifiquement dès le stade proérythroblaste engendrait d'une part la diminution de cellules érythroïdes primitives dans la circulation et d'autre part une accélération dans la maturation des cellules primitives entre E9.5 et E11.5. De plus, les cellules érythroïdes n'ayant pas de *c-myc* n'ont pas l'augmentation normale de l'expression des gènes de globines murins ( $\epsilon$ y,  $\beta$ h<sub>1</sub>,  $\zeta$ ,  $\beta$ ) au cours de la maturation suggérant que *c-myc* a un rôle dans la régulation de l'hémoglobine durant le développement embryonnaire.

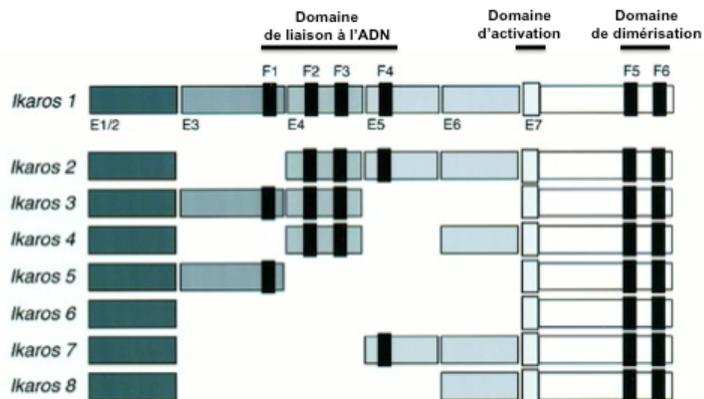
### 1.6.3.7 Interactions protéine-protéine impliquant EKLF

EKLF participe aussi aux changements de structure de la chromatine du locus de  $\beta$ -globine. L'absence de EKLF empêche la formation de site d'hypersensibilité au promoteur de  $\beta$ -globine et diminue la sensibilité de HS3 à la DNaseI (Wijgerde et al., 1996). Les facteurs EKLF, GATA-1 et FOG-1 sont essentiels pour l'interaction avec les gènes adultes de  $\beta$ -globine dans les cellules érythroïdes définitives (Drissen et al., 2004; Vakoc et al., 2005).

## 1.6.4 Ikaros

### 1.6.4.1 La famille Ikaros

Ikaros (Lylf-1, Zfpmla1 ou IKZF1) est un facteur de transcription à doigts de zinc qui a été découvert lors de recherches sur la régulation de la lymphopoïèse T murin (Georgopoulos et al., 1992). Le gène qui code pour ce facteur de transcription contient 7 exons et présente une forte homologie entre les espèces notamment entre la souris et l'homme (Molnar et al., 1996; Haire et al., 2000). Le facteur de transcription Ikaros est le membre fondateur de la famille Ikaros qui comprend quatre autres membres : Helios, Aiolos, Eos et Pegasus (Morgan et al., 1997; Hahm et al., 1998; Kelley et al., 1998; Perdomo et al., 2000). Cette famille est caractérisée par la présence de six doigts de zinc répartis en deux domaines distincts. Le domaine en N-terminal de la protéine possède quatre doigts de zinc qui permettent la liaison aux motifs GGGAA de l'ADN alors que le domaine situé en C-terminal contient deux doigts de zinc et permet l'homo- et/ou l'hétéro-dimérisation (Sun et al., 1997) (Figure 1.14). De plus, les épissages alternatifs du transcrit *Ikaros* entre les exons 2 et 7 produisent plusieurs isoformes (8 au total) qui ont différentes fonctions au cours de l'hématopoïèse (Hahm et al., 1994; Klug et al., 1998; Payne KJ et al., 2001). Les isoformes sont caractérisés par un nombre différent de doigts de zinc dans leur domaine de liaison à l'ADN (Figure 1.14) et sont soit fonctionnelles soit dominant négatifs. IK1, IK2, IK3 et IK4 sont des isoformes fonctionnels (Molnar & Georgopoulos, 1994) alors que IK5, IK6, IK7 et IK8 sont des isoformes dits dominant-négatifs (DN) et ont la propriété de lier les isoformes fonctionnels empêchant leur liaison à l'ADN (Sun et al., 1996). Ik1 et Ik2 sont exprimés abondamment durant le développement (Georgopoulos, 2002).



**Figure 1.14. Les isoformes d'Ikaros**

Légende: Ikaros 1 possède un domaine de liaison à l'ADN, un domaine d'activation et un domaine de dimérisation. Les huit isoformes d'Ikaros résultent de l'épissage alternatif d'Ikaros. E1 à E7 indiquent les régions codées par les exons. F1 à F6 représentent les différents doigts de zinc de la protéine. Références: Adapté de Sun et al (1999).

#### 1.6.4.2 Expression d'Ikaros dans l'hématopoïèse

Ikaros est exprimé à plusieurs étapes de l'hématopoïèse. Il est impliqué non seulement dans les cellules souches hématopoïétique (Nichgiannopoulou et al., 1999) mais aussi au cours de la différenciation lymphocytaire T et B (Georgopoulos et al., 1994; Wang et al., 1996; Kirstetter et al., 2002), dans les cellules dendritiques (Wu et al., 1997), les cellules Natural killer (NK) (Boggs et al., 1998), les neutrophiles (Dumortier et al., 2003) ainsi que chez les cellules érythroïdes (O'Neill et al., 2000; Lopez et al., 2002).

#### 1.6.4.3 Rôle d'Ikaros dans l'érythropoïèse

Différentes sortes de mutations ponctuelles ont été causées dans le gène Ikaros murin afin de produire des protéines mutées et déterminer la fonction de ce facteur de transcription dans l'érythropoïèse. Dans une étude publiée par Papatthasiou et al (2003), une mutation dans le troisième doigt de zinc de Ikaros empêche la liaison de la protéine à l'ADN mais préserve sa capacité à se dimériser avec les isoformes et les autres membres de la famille Ikaros. Les embryons homozygotes pour la mutation (Ikaros<sup>Plastic/Plastic</sup>) présentent *in utero* une anémie sévère et meurent tous entre E15.5 et E17.5 pendant le développement fœtal. Ils ont un taux d'hémoglobine dans le sang périphérique et une hématoците quatre fois plus bas que chez les souris Ikaros sauvages

(Ik<sup>+/+</sup>). La plupart des cellules érythroïdes retrouvées dans le sang périphérique de ces embryons mutants proviennent de l'érythropoïèse primitive du sac vitellin et ont une apparence normale. Par contre, on retrouve cinq fois moins de cellules érythroïdes définitives provenant du foie fœtale comparé aux contrôles. Le déficit en Ikaros cause en effet une diminution significative de la prolifération des progéniteurs (BFU-E et CFU-E) dans le foie des embryons mutants, ce qui altère le nombre de précurseurs érythroïdes précoces et tardifs (érythroblastes) qui présentent en plus des défauts dans leur maturation. Ikaros joue ainsi un rôle important dans la prolifération et la différenciation des érythroblastes pendant le développement fœtale. L'étude chez les embryons Ik<sup>Plastic/Plastic</sup> a cependant montré que la transcription de  $\beta^{\text{maj}}$  et d' $\alpha$ -globine n'est pas affectée indiquant qu'il n'y a pas de défauts dans la production des globines et écarte par la même occasion la cause de la  $\beta$ -thalassémie dans la mort de ces embryons homozygotes mutants. Ces derniers présentent effectivement d'autres défauts dans l'hématopoïèse notamment dans la différenciation des granulocytes et des lymphocytes T et B.

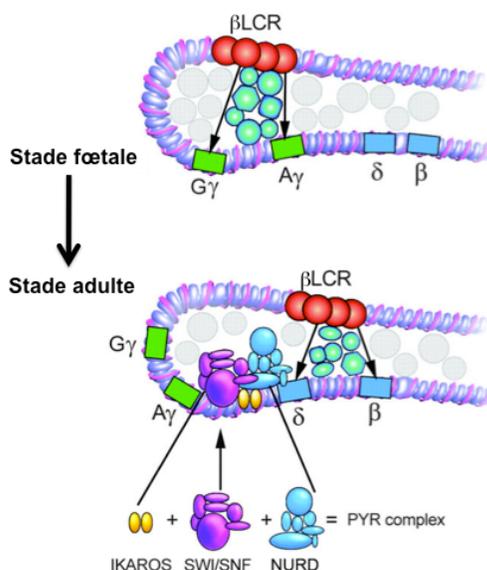
Des études ont été menées chez les souris Ikaros-nulles (Ik<sup>-/-</sup>) qui présentent un phénotype moins drastique que les souris Ik<sup>Plastic/Plastic</sup>. Bien que les souris Ik<sup>-/-</sup> ne meurent pas *in utero* et atteignent le stade adulte, leur durée de vie ne dépasse pas quatre mois en raison de leur système immunitaire défaillant causé par des défauts survenant dans la lymphopoïèse murine (Wang et al., 1996). Les souris Ik<sup>-/-</sup> sont aussi anémiques puisqu'une baisse significative de l'hématocrite et une diminution du taux d'hémoglobine dans leur sang périphérique sont constatées comparativement aux souris sauvages Ik<sup>+/+</sup> (Lopez et al., 2002). Par ailleurs, l'anémie observée chez les souris Ik<sup>-/-</sup> est accompagnée d'une augmentation du nombre de réticulocytes dans leur sang, un phénomène appelé réticulocytose. Des analyses d'expression ont été effectuées à partir du foie fœtal des souris Ik<sup>-/-</sup> au stade embryonnaire E14.5 : les résultats semblent indiquer une diminution de l'expression de certains gènes érythroïdes comme celle du récepteur de la transferrine (CD71) et du facteur de transcription EKLF suggérant le rôle d'Ikaros dans la régulation de l'érythropoïèse (Lopez et al., 2002). La même étude indique que l'expression d'autres gènes érythroïdes comme celle des gènes GATA-1 et GPA semble être inchangée à E14.5 en l'absence d'Ikaros.

#### 1.6.4.4 Ikaros dans la régulation des gènes de $\beta$ -globine

Les embryons  $Ik^{-/-}$  présentent un retard dans la mise en place de la commutation de l'hémoglobine embryonnaire à adulte. De plus, lorsque les souris  $Ik^{-/-}$  sont croisées avec des souris transgéniques possédant un minilocus contenant les gènes fœtaux et adultes de  $\beta$ -globine humaine (32 kb), un retard semble être observé lors de la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte humaine (Lopez et al., 2002). Chez les souris  $Ik^{Plastic/Plastic}$  croisées avec les souris  $\beta$ -YAC contenant le locus entier de  $\beta$ -globine humaine, un délai dans la mise en place de la commutation fœtale-adulte semble aussi être observé (Keys et al., 2008). Toutes ces observations ont suggéré le rôle d'Ikaros au niveau de la régulation de l'expression des gènes de  $\beta$ -globine et donc son implication dans la mise en place de la commutation de l'hémoglobine embryonnaire/fœtale à adulte.

#### 1.6.4.5 Le complexe Pyr et la commutation fœtale-adulte

L'implication d'Ikaros dans la transcription des gènes de globine avait déjà été suggérée dans les études antérieures. En 1991, O'Neill et al ont proposé que Ikaros se liait à une région spécifique riche en pyrimidine qu'ils ont surnommé région Pyr qui est située environ 1Kb en amont du site d'initiation de la transcription du gène  $\delta$  (O'Neill et al., 1991). À noter que la région Pyr fait partie de la délétion de Corfu (Chakalova et al., 2005; Bank, 2006). O'Neill et al (1999) ont indiqué que la délétion de cette région Pyr dans un minilocus de  $\beta$ -globine contenant la séquence allant de  $\gamma^A$  à  $\beta$  retarde la commutation de l'hémoglobine fœtale à adulte chez les souris transgéniques. L'année suivante, O'Neill et al (2000) ont montré que, dans les cellules érythroïdes définitives, Ikaros faisait partie d'un large complexe protéique nommé complexe Pyr qui comprenait aussi les complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF et NuRD (Nucleosome-remodeling deacetylase). Ainsi, au moment de la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte, il a été proposé que le complexe Ikaros-SWI/SNF-NuRD soit assemblé puis recruté à cette région Pyr pour faciliter la répression de  $\gamma$  et/ou l'activation de  $\beta$  (Figure 1.15). Ceci reste cependant à être vérifié notamment par le fait qu'il a été démontré que l'excision de la région Pyr dans le locus entier de  $\beta$ -globine humaine n'affecte pas l'expression des gènes fœtaux et adultes (Gaensler et al., 2003).



### Figure 1.15. Ikaros et la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte

**Légende:** Dans les cellules érythroïdes fœtales, le  $\beta$ LCR coopère avec des facteurs *trans*-régulateurs pour activer les gènes  $\gamma$ . Au stade adulte, le complexe  $\beta$ LCR active préférentiellement le gène  $\beta$ ; Ikaros est recruté pour former le complexe Pyr et faciliter la répression de  $\gamma$ -globine et l'activation de  $\beta$ .

**Références:** Adapté de Bank (2006).

#### 1.6.4.6 Mécanisme de la commutation de l'hémoglobine par Ikaros

Des données recueillies par la technique de capture de la conformation de la chromatine (3C) semblent montrer qu'Ikaros participe à la formation de la boucle de chromatine active (*ACH*: *Active Chromatin Hub*), ce qui facilite le rapprochement du LCR avec la région intergénique  $\gamma$ - $\delta$  où est localisée la région Pyr (Keys et al., 2008). De plus, l'étude suggère qu'Ikaros se lie *in vitro* et *in vivo* proche du *core* du HS3 du LCR et propose sa présence dans un complexe multiprotéique comprenant GATA-1, EKLf et Eos qui serait impliqué dans la formation de l'ACH.

Eos, un autre membre de la famille Ikaros, peut lui aussi lier les régions d'Ikaros suggérant leur coopération dans la régulation des gènes de  $\beta$ -globine sous une forme hétérodimère (Eos-Ikaros) et/ou homodimère (Eos-Eos). L'implication d'Eos dans la répression du gène  $\gamma$  dans les cellules érythroïdes a d'ailleurs été analysée. Les cellules érythroleucémiques K562 ont été prises comme modèle étant donné qu'elles maintiennent des hauts niveaux d'expression des gènes fœtaux (Benz et al., 1980; Rutherford et al., 1981). En effet, Yu et al (2011) ont indiqué que la surexpression d'Eos dans les cellules K562 a pour effet de réprimer significativement l'expression du gène  $\gamma$

alors que l'expression des autres gènes de  $\beta$ -globine n'est pas influencée. L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a d'ailleurs montré qu'Eos se lie au HS3 et dans les promoteurs des gènes  $G\gamma$  et  $A\gamma$  alors que la technique de 3C a indiqué qu'Eos peut réduire l'interaction entre le LCR et les promoteurs des gènes  $\gamma$  (Yu et al., 2011).

Bottardi et al (2009) ont révélé que la liaison d'Ikaros aux différentes régions du locus humain de  $\beta$ -globine est associée au recrutement des cofacteurs Mi-2 et HDAC1 impliqués dans le remodelage de la chromatine et la modification des histones. Leur étude montre aussi que l'interaction entre Ikaros et GATA1 dans les cellules érythroïdes fœtales perturbe le rapprochement entre LCR et promoteurs des gènes  $\gamma$ -globine, ce qui aurait pour conséquence la répression des gènes fœtaux au moment de la commutation fœtal-adulte.

### 1.6.5 BP1

Bien que d'importants activateurs de  $\beta$  tels que EKLF aient été identifiés à ce jour, les facteurs de transcription impliqués dans la répression de ce gène n'ont pas été encore découverts et caractérisés. En 1989, Berg et al ont démontré l'existence d'une protéine dans les extraits nucléaires des cellules K562 humaines qui avait la propriété de lier *in vitro* des régions régulatrices du promoteur du gène adulte  $\beta$ . Cette protéine fut nommée Beta protein 1 (BP1). Au cours des deux décennies suivantes, des études *in vitro* ont fortement suggéré le rôle du facteur de transcription BP1 dans la répression du gène adulte de  $\beta$ -globine.

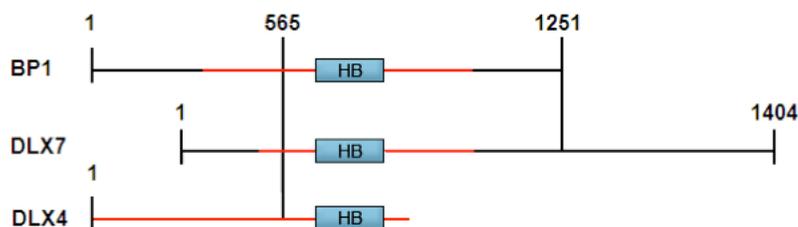
#### 1.6.5.1 BP1, un membre de la famille DLX

BP1 est un facteur de transcription faisant parti de la grande famille des gènes à homéoboîte (HB) qui code pour des protéines à homéodomaine aussi appelées homéoprotéines. Les gènes HB ont la particularité de posséder une séquence conservée de 180 pb appelée homéoboîte (HB) qui code pour un homéodomaine de 60 acides aminés responsable de la liaison de la protéine à l'ADN (Levine & Hoey, 1988). Les gènes à homéoboîte ont été découverts chez la drosophile (Lewis, 1978) et ont ensuite été retrouvés chez plusieurs autres espèces incluant l'humain (Levine et al., 1984). La plus grande famille de gènes à homéoboîte chez l'humain est la famille des gènes HOX

(39 membres) qui jouent un rôle crucial au cours du développement des membres ainsi que dans l'hématopoïèse (van Oostveen et al., 1999).

BP1 appartient plus particulièrement à la famille des gènes DLX humain qui est apparentée à la famille des gènes *distal-less* (*Dll*) retrouvée chez la drosophile (Cohen et al., 1989). Chez l'humain (DLX) et la souris (*Dlx*), on compte 6 gènes qui sont organisés en loci bigéniques (Sumiyama et al., 2003) et chaque paire de gènes DLX est associée à un locus de gènes HOX sur leur chromosome respectif (Nakamura et al., 1996; Simeone et al., 1994). Les gènes DLX sont exprimés durant la morphogénèse dans les arcs branchiaux, le prosencéphale, les membres, les yeux, les dents, les os et le mésenchyme facial (Dolle et al., 1992; Robinson & Mahon, 1994). Chez la souris, l'absence d'expression des gènes *Dlx* conduit à la mort embryonnaire (Morasso et al., 1999; Morasso & Radoja, 2005). De plus, il a démontré que l'altération des gènes DLX chez l'humain semble être impliquée dans les leucémies (Shimamoto et al., 1997&2000; Ferrari et al., 2003).

Chez l'humain, le facteur de transcription BP1 est codé par le gène DLX4 localisé sur le chromosome 17q21-22 (Fu et al., 2001; Chase et al., 2002). Il est important de noter que plusieurs études au sujet des gènes DLX créent une confusion dans la nomenclature de cette famille car le gène DLX4 est souvent référé par le nom de DLX7 dans certains articles. Suite aux comparaisons des séquences ADNc, Chase et al (2002) ont «clarifié» la situation et ont suggéré qu'au moins trois isoformes (DLX4, DLX7 et BP1) sont générés par un seul et même gène qu'ils ont nommé DLX4 (Nakamura et al., 1996; Quinn et al., 1997; Price et al., 1998; Chase et al., 2002) (Figure 1.16).



### Figure 1.16. BP1, une isoforme de DLX4

**Légende:** Le gène DLX4 code pour trois protéines différentes : BP1, DLX7 et DLX4. Les lignes rouges correspondent aux cadres de lectures prédits. HB représente la région de l'homéoboîte identique entre les trois isoformes. En amont du nucléotide 565, la séquence diffère entre les isoformes. Les régions entre les lignes verticales indiquent la similarité de séquence. **Références:** Fu et al., 2001; Chase et al., 2002.

### 1.6.5.2 Expression de BP1

Les analyses d'expression dans différents tissus humains ont révélé que BP1 est fortement exprimé dans le placenta, les reins et à des niveaux plus bas dans le foie fœtal suggérant son implication dans la régulation génique au cours du développement. De plus, BP1 est aussi exprimé dans les cellules hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> de la moelle osseuse mais son expression diminue à des niveaux indétectables au cours de la phase de différenciation de l'érythropoïèse (Haga et al., 2000; Chase et al., 2002).

BP1 est fortement exprimé dans les cellules érythroleucémiques K562 humaines dans lesquelles les gènes embryonnaires/fœtaux sont exprimés mais pas le gène adulte de  $\beta$ -globine (Rutherford et al., 1979&1981; Benz et al., 1980; Dean et al., 1983). Par ailleurs, Haga et al (2000) a démontré que la surexpression de BP1 dans ces cellules entraîne une augmentation significative de leur prolifération supportant l'idée que BP1 est impliqué dans la leucémogénèse.

### 1.6.5.3 Rôle de BP1 dans l'érythropoïèse

Le rôle de BP1 dans l'érythropoïèse a émergé dès sa découverte chez les cellules K562. Berg et al (1989) ont démontré que la protéine BP1 liait *in vitro* deux régions négatives (silencers) dans le promoteur du gène adulte de  $\beta$ -globine. Le site consensus de BP1 a été déterminé et correspond à la séquence (A/T)T(A/C)(A/T)ATATG. Le premier site de liaison de BP1 est localisée 530 pb en amont du site d'initiation de la transcription du gène  $\beta$  (-530 pb) : il s'agit du silencer I (SI). Le second site de liaison de BP1 (silencer II; SII) est quant à lui situé à -300 pb. Les deux silencers n'ont cependant pas la même force. En effet, des expériences *in vitro* de transfection avec soit le silencer I soit le silencer II en amont d'une séquence CAT ont montré que le silencer II a un effet de répression plus prononcé que le silencer I. D'ailleurs, il a été mentionné que BP1 lie 2.5 fois plus fort le silencer II que le silencer I. La liaison de BP1 ne semble pas se limiter uniquement à la région promotrice du gène humain de  $\beta$ -globine. *In vitro*, BP1 peut lier un site situé à -530 pb dans une région négative du promoteur du gène adulte  $\delta$  humain (Berg et al., 1994; Tang et al., 1997; Chase et al., 2002) et aussi dans la région promotrice du gène adulte murin  $\beta$ -majeur (Berg et al., 1989).

À ce jour, BP1 est le seul membre de la famille DLX qui peut réguler l'expression du gène de  $\beta$ -globine. Une étude *in vitro* a montré qu'une des isoformes de BP1, DLX7, était aussi exprimée dans les cellules K562 mais ne pouvait pas réprimer le gène  $\beta$  même s'il était capable de lier les silenciers I et II (Fu et al., 2001). Bien que BP1 et DLX7 soient co-exprimés dans le même type cellulaire, l'isoforme DLX7 semble avoir des fonctions distinctes. En effet, Shimamoto et al (1997) a montré que l'inhibition de DLX7 dans les cellules K562 cause une diminution de l'expression des facteurs de transcription GATA-1 et *c-myc* ainsi que la mort apoptotique. DLX7, tout comme BP1, est par ailleurs exprimé dans les cellules hématopoïétiques malignes et chez les patients atteints de leucémies (Haga et al., 2000). Le rôle de DLX4, seconde isoforme de BP1, n'a pas été étudié dans le cadre de la régulation des gènes de globine jusqu'à maintenant.

Différentes approches menées *in vitro* ont pu affirmer que le facteur de transcription BP1 joue bien un rôle dans la répression du gène  $\beta$ . Zoueva et Rodgers (2004) ont montré qu'une diminution de 75 % de l'expression de BP1 par siRNA (small interfering RNA) engendrait parallèlement une augmentation d'environ 40 % de l'expression du gène humain  $\beta$  dans les cellules humaines K562. Eiyomo Mwa Mpollo et al (2006) ont choisi de surexprimer BP1 (LCRBP1) *in vitro* dans les cellules ES murines et les analyses d'expression par PCR quantitatif ont révélé que la surexpression de BP1 humain réduisait significativement la transcription du gène adulte de  $\beta$ -globine ( $\beta^{\text{maj}}$ ) et inhibait la différenciation érythroïde définitive. Le rôle de BP1 a aussi été investiguée *in vivo* en surexprimant BP1 mais une seule souris possédant le transgène LCRBP1 a été obtenue (Eiyomo Mwa Mpollo et al., 2006). La survie de cette souris transgénique fondatrice était attribuée au mosaïsme du transgène car le transgène ne pouvait pas être transmis à la descendance. L'étude a aussi montrée que les embryons murins surexprimant BP1 humain mouraient *in utero* vers E15.5-E16.5 au moment où l'expression du gène adulte  $\beta^{\text{maj}}$  devenait essentielle à la poursuite du développement confirmant le rôle de BP1 dans l'érythropoïèse définitive. Fait intéressant, l'analyse pathologique de la seule souris transgénique LCRBP1 obtenue a révélé une stimulation de l'érythropoïèse définitive dans la moelle osseuse, une splénomégalie ainsi que des dépôts importants d'amyloïdes A dans le rein (SAA : serum amyloidosis A), des

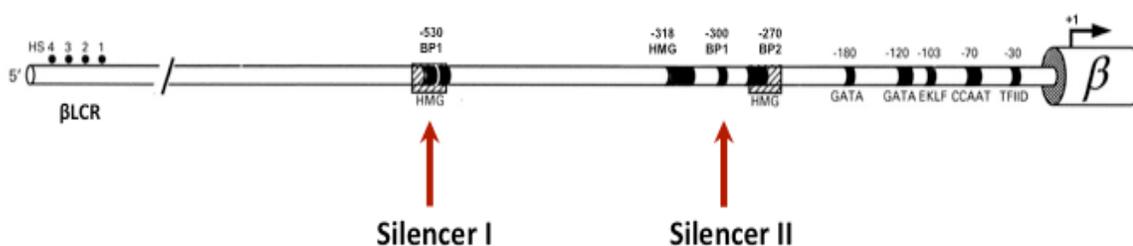
caractéristiques retrouvées chez des individus avec un phénotype de type thalassémique (Ugucioni et al., 1992; Beauchemin et al., 2004).

#### 1.6.5.4 BP1, BP2 et les protéines de type HMG

En plus de BP1, une seconde protéine appelée BP2 lie le promoteur de  $\beta$ -globine à -270 pb (Berg et al., 1989). La région promotrice du gène adulte  $\beta$  contient ainsi trois motifs pouvant être liés par BP1 et BP2. Lorsque l'un de ces éléments est muté individuellement, l'activité du promoteur de  $\beta$  dans les cellules K562 augmente entre 4 à 6 fois suggérant l'importance de ces sites de liaison dans la répression du gène adulte de  $\beta$ -globine (Ebb et al., 1998; Drew et al., 2000). Cependant, il a été démontré que la mutation simultanée de ces trois sites conduit à une activité transcriptionnelle de  $\beta$  plus basse que celle constitutivement observée dans les cellules K562 indiquant le possible rôle dans une configuration spatiale de la chromatine nécessaire au recrutement des facteurs *trans*-régulateurs tels que BP1, BP2 et des protéines HMG (Drew et al., 2000).

Des études ont proposé l'implication des protéines de type HMG (High Mobility Group) dans la régulation du gène  $\beta$  par BP1. Les protéines HMG sont connues pour leur fonction de remodelage de la chromatine : elles peuvent lier l'ADN au niveau du sillon mineur et «plier» la structure génomique pour rapprocher les éléments distaux changeant ainsi la conformation de l'ADN et facilitant l'assemblage de complexes nucléoprotéiques (Thomas & Travers, 2001). Chase et al (1999) ont identifié des protéines isoformes HMG-I et HMG-Y qui ont la capacité de lier *in vitro* le silencer I de BP1 (-530 bp) et de créer une torsion de l'ADN dans cette région. Les protéines HMG-I et HMG-Y sont exprimées de manière ubiquitaire dans plusieurs tissus où le gène  $\beta$ -globine n'est pas exprimé et sont d'ailleurs fortement exprimées dans le foie fœtal, site de l'érythropoïèse définitive fœtale ainsi que dans les cellules érythroleucémiques K562 humaines. De plus, l'expression de HMG-I et HMG-Y diminue dans les cellules érythroïdes au cours de la progression du développement embryonnaire (Friedmann et al., 1993; Chase et al., 1999). Il a été proposé que ces protéines HMG joueraient un rôle dans la répression du gène  $\beta$  par l'intermédiaire du silencer I et faciliteraient la liaison de répresseurs tels que BP1.

D'autres protéines de type HMG, HMG 1 et 2, possèdent des sites de liaison qui chevauchent les sites de liaison de BP1 et même celui de BP2 (Qian et al., 1993; Drew et al., 2000) (Figure 1.17). Ces protéines ont la propriété d'engendrer une torsion de l'ADN ( $54^\circ$ ) qui permet le rapprochement des sites de liaison de BP1 et BP2 pouvant faciliter des possibles interactions protéine-protéine dans la répression du gène adulte de  $\beta$ -globine pendant le stade embryonnaire/fœtal. Bien que les données *in vitro* suggèrent une coopération entre BP1, BP2 et les protéines HMG, le mécanisme de répression du gène  $\beta$  demeure inconnu à ce jour.



**Figure 1.17. Sites de liaison de BP1, BP2 et des protéines HMG**

Légende: Les sites de liaison de BP1 (silencers I et II), BP2 et ceux des protéines HMG sont indiqués par rapport au site d'initiation de la transcription (+1) du gène humain de  $\beta$ -globine. Les sites de liaison pour les facteurs GATA-1, EKLF et TFIIID ainsi que les sites HS du  $\beta$ LCR sont mis à titre indicatif.  
Références: Adapté de Drew et al., 2000.

Le facteur de transcription de type HMG SOX6 est impliqué dans l'érythropoïèse notamment par la régulation des gènes de  $\beta$ -globine. SOX6 et les autres membres de la même famille possèdent un domaine HMG qui leur permet de lier le sillon mineure de l'ADN et engendrer un pli important ( $75^\circ$ ). La distorsion de l'ADN par les protéines SOX est connu pour provoquer des changements conformationnels (Ferrari et al., 1992; Connor et al., 1994). Les protéines SOX possèdent par ailleurs des sites de liaison à proximité des sites d'autres facteurs de transcription suggérant qu'elles pourraient agir comme protéines «architecturales». Yi et al (2006) ont proposé que le facteur de transcription SOX6 pourrait être responsable de changements structuraux au niveau de la chromatine et serait responsable d'assembler d'autres facteurs de transcription dans des

complexes multiprotéiques. Comme il a été mentionné précédemment, SOX6 réprime les gènes embryonnaires de  $\beta$ -globine mais le mécanisme exact dans la commutation de l'hémoglobine n'a pas encore été déterminé. De plus, aucun lien n'a été établi à ce jour entre BP1 et SOX6.

### 1.6.5.5 BP1 et l'anémie falciforme

Cinq différents haplotypes sont associés au gène mutant  $\beta^s$  dans l'anémie falciforme (Pagnier et al., 1984; Kulozik et al., 1986; Berg et al., 1991; Lapoumeroulie et al., 1992) (Tableau I-II). Les individus avec l'haplotype Indien présentent des symptômes moins sévère de l'anémie falciforme comparativement aux individus avec l'haplotype Bantu qui sont plus sévèrement affectés (Ali, 1970; Perrine et al., 1978; Labie et al., 1984). Par ailleurs, il s'avère que le site de liaison de BP1 situé à -530 pb (silencer I) est sujet à un polymorphisme qui diffère selon les haplotypes (Chebloune et al., 1988). Ces variations de séquence en amont du gène  $\beta^s$  affecte la liaison de BP1 *in vitro* (Berg et al., 1989). En effet, une corrélation inverse existe entre l'affinité de BP1 pour le silencer I et la sévérité de l'anémie falciforme. Comparativement à la séquence de référence, BP1 lie cinq à six fois plus fort la séquence d'ADN contenant l'haplotype Indien et deux à trois fois moins fort que la séquence correspondant à l'haplotype Bantu (Berg et al., 1991; Elion et al., 1992; Zeng et al., 1994). Les études ont ainsi suggéré que BP1 pourrait être modulé dans la sévérité de l'anémie falciforme.

**Tableau I-II. BP1 et polymorphisme dans le site de liaison -530**

	-551	-543	-530	-526	-521	
Reference	TGTA <u>T</u> ATATACA <u>C</u> ATATATATATAT <u>AT</u> . . . . <u>TTT</u> <u>TTTT</u> <u>C</u> <u>TTTT</u>					(AT)7 T7
Senegal	TGTA <u>T</u> ATATACA <u>C</u> ATATATATATAT <u>ATAT</u> . . . . <u>TTTT</u> <u>T</u> <u>TTTT</u>					(AT)8 T4
Benin	TGTA <u>T</u> ATATACA <u>T</u> ATATATATATAT <u>ATAT</u> . . . . <u>TTTT</u> <u>C</u> <u>TTTT</u>					(AT)8 T4
Bantu	TGTA <u>C</u> ATATACA <u>C</u> ATATATATATAT . . . . <u>TTTTT</u> <u>TTTT</u> <u>C</u> <u>TTTT</u>					(AT)6 T9
Cameroon	TGTA <u>T</u> ATATACA <u>C</u> ATATATATATAT <u>ATAT</u> . . . . <u>T</u> <u>TTTT</u> <u>C</u> <u>TTTT</u>					(AT)8 T5
India	TGTA <u>C</u> ATATACA <u>C</u> ATATATATATAT <u>ATATAT</u> . . <u>T</u> <u>TTTT</u> <u>C</u> <u>TTTT</u>					(AT)9 T5

Légende: Le motif (AT) $x$ (T) $y$  situé environ 0.5 Kb en amont du gène  $\beta$  (nucléotides en caractère gras) correspond au site de liaison de BP1 et varie selon les haplotypes. Les variations impliquant un seul nucléotide sont soulignés. Référence: Berg et al., 1991.

## Objectif de maîtrise

Il a été démontré que le facteur de transcription BP1 peut réprimer *in vitro* l'expression du gène adulte de  $\beta$ -globine mais aucune étude à ce jour ne fait état du rôle de BP1 dans la régulation des gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$ . Il se pourrait que BP1 puisse réguler les gènes embryonnaire et fœtaux au moment de la répression de  $\beta$ . Par ailleurs, on ne sait pas si BP1 peut moduler l'expression des facteurs de transcription (Ikaros, EKLF, BCL11A et SOX6) connus pour être impliqués dans la régulation stade-spécifique des gènes de  $\beta$ -globine au cours du développement. Mon objectif de maîtrise consistait à déterminer *in vivo* le rôle de BP1 dans la régulation des gènes humains de  $\beta$ -globine.

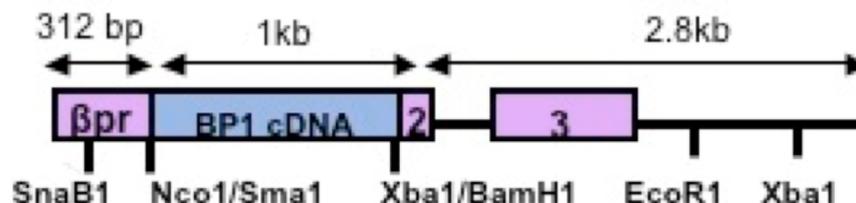
## ***Chapitre 2 : Matériels et méthodes***

### **2.1 Les souris**

#### **2.1.1 Les souris transgéniques BP1<sup>43</sup>**

L'expression de BP1 humain a été ciblée dans les cellules érythroïdes définitives murines. Pour cela, l'ADN complémentaire (ADNc) de BP1 humain a été placé sous le contrôle du promoteur du gène adulte de  $\beta$ -globine humaine dont les sites de liaison de BP1 (silencers I et II) ont été préalablement enlevés pour éviter une auto-inhibition du transgène. Pour compléter la construction plasmidique, la région 3' (18 pb de l'exon 2, l'intron 2, l'exon 3) et le 3'UTR comprenant une queue polyA du gène adulte de  $\beta$ -globine humaine ont été ajoutés en aval de l'ADNc de BP1. Les détails concernant la construction  $\beta$ BP1 $\beta$ , le séquençage, la purification du fragment pour la micro-injection ainsi que les étapes subséquentes pour obtenir les différentes lignées de souris transgéniques exprimant BP1 humain (BP1<sup>43</sup>, BP1<sup>80</sup>, BP1<sup>83</sup>, BP1<sup>59</sup> et BP1<sup>81</sup>) sont décrites de manière exhaustive dans le mémoire de Mélissa Beaudoin (2003). Les souris transgéniques BP1 ont été générées sur fond génétique mixte (C57Bl/6J et CBA/J) puis sélectionnées pour l'haplotype *diffus* (*d/d*). Les analyses d'expression du transgène BP1 dans les différentes lignées de souris au stade adulte sont mentionnées dans le mémoire de Marthe-Sandrine Eiyimo Mwa Pollo (2007).

Mon étude de BP1 humain s'est concentrée au cours du stade embryonnaire et plus particulièrement durant l'érythropoïèse définitive fœtale. Les expériences ont été effectuées uniquement à partir de la lignée transgénique BP1<sup>43</sup> qui possède un niveau d'expression significativement plus élevée dans les cellules érythroïdes comparativement au niveau retrouvé dans la moelle osseuse totale. Étant donné que les cellules érythroïdes représentent  $\sim 1/3$  des cellules totales présentes dans la moelle osseuse, l'expression de BP1 humain est principalement érythroïde spécifique dans la lignée BP1<sup>43</sup> (Eiyimo Mwa Pollo, 2007).



### Figure 2.1. Construction $\beta$ BP1 $\beta$

**Légende:** Représentation schématique des éléments régulateurs présents dans la construction plasmidique utilisée pour obtenir les lignées de souris transgéniques exprimant BP1 humain. La taille du fragment microinjecté est d'environ 4 Kb. Référence: Tiré de Eiyimo Mwa Pollo, 2007.

#### 2.1.2 La souris transgénique $\beta$ -YAC

La souris  $\beta$ -YAC possède le locus entier de  $\beta$ -globine humaine (Gaensler et al., 1993; Bungert et al., 1995). Les souris ont été croisées sur fond génétique mixte (C57BL/6J et CBA/J) et sélectionnées pour l'haplotype murin *diffus* (*d/d*). Le génotypage des souris  $\beta$ -YAC a été effectué par électrophorèse de l'hémoglobine sur cellulose acétate (section 2.2.4) et/ou par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La séquence des amorces utilisées, les conditions de PCR ainsi que la taille de la bande attendue sont indiquées dans le tableau II-I.

#### 2.1.3 La souris Ikaros-nulle

La souris Ikaros-nulle ( $Ik^{-/-}$ ) a été générée par l'ablation génique du dernier exon (exon 7) du gène murin Ikaros, ce qui entraîne la perte de toutes les isoformes d'Ikaros (Wang et al., 1996). Les souris ont été croisées sur fond génétique mixte (C57BL/6J et CBA/J) et sélectionnées pour l'haplotype murin *diffus* (*d/d*). Les progénitures provenant du croisement entre souris hétérozygotes Ikaros ( $Ik^{+/-}$ ) ont été analysés par PCR à partir d'ADN de queue afin de déterminer le génotype des souris ( $Ik^{+/+}$ ,  $Ik^{+/-}$  ou  $Ik^{-/-}$ ). La séquence des amorces utilisées, les conditions de PCR ainsi que la taille des bandes attendues sont inscrites dans le tableau II-I.

## 2.2 Génotypage des souris

### 2.2.1 Extraction de l'ADN génomique des souris

Un bout de queue des souris est coupé et mis en présence d'un tampon de lyse cellulaire [Tris-HCl (50 mM, pH 8), EDTA (100 mM), SDS (0,5%)] et de pronase (20 mg/mL, Roche) pendant toute la nuit à 55°C sous agitation. L'ADN est extrait par précipitation avec du NaCl (5M) et de l'éthanol 100 %. Le culot est lavé avec de l'éthanol 70 % et séché sous-vide durant quelques minutes. L'ADN génomique est ensuite resuspendu dans un tampon TE [Tris-HCl (10 mM, pH 8), EDTA (1mM)].

### 2.2.2 SouthernBlot

Environ 10 µg d'ADN génomique provenant de la queue des souris transgéniques BP1<sup>43</sup> sont digérés par l'enzyme de restriction BamHI (Invitrogen) pendant 3 h à 37°C puis sont migrés sur un gel d'agarose 1% pendant 3 h à 150 V. Ce dernier est incubé dans une solution de dénaturation [NaCl (1 M), NaOH (0,5 M)] pendant 30 min et ensuite dans une solution de neutralisation [Tris-HCl (0,5 M, pH 7.4), NaCl (3 M)] pendant 1h. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane de nylon (Fisher) durant toute la nuit.

La membrane est ensuite séchée à 55°C pendant quelques minutes puis l'ADN est lié de manière permanente à la membrane par une exposition aux UV (1200 µJ) en utilisant l'appareil *UV Stratalinker 2400* (Stratagene). La membrane est mise dans une bouteille en présence d'une solution d'hybridation [Ficoll (2%), polyvinylpyrrolidone (2%), BSA (2%), NaCl (0,75 M), citrate de sodium (75 mM), ADN de sperme de saumon (ssDNA)] et est incubé au moins 3 h à 65°C avant que la sonde radioactive ne soit rajoutée. Pour produire une sonde capable de reconnaître le transgène BP1 dans le génome murin, une portion de la construction plasmidique (Figure 2.1) comprenant le promoteur β et BP1 a été excisée avec les enzymes SphI et XhoI. 100 ng de ce fragment d'ADN ont été mis en présence de 600 ng d'amorces hexamériques pdN6 (Roche) et portés à ébullition pendant 3 min pour permettre à l'ADN double brin de se dénaturer et aux amorces pdN6 de lier de manière aléatoire l'ADN. Par la suite sont ajoutés 2 µl du tampon Nick Mix [Tris (500 mM, pH 7.5), MgCl<sub>2</sub> (50 mM), β-mercaptoéthanol (100

mM)], 3 µl de 200 mM dATG et 0,5 µl (3U) de Klenow (Large fragment of DNA Polymerase I) avant d'introduire 25 µCi dCTP<sup>32</sup>. La réaction de polymérisation est effectuée à 37°C pendant au moins 30 minutes puis est interrompue en ajoutant 5 volumes de solution d'arrêt [Tris (10 mM, pH 7,5), EDTA (12,5 mM), SDS (0,5 %)]. La sonde radioactive spécifique au transgène BP1 est ensuite dénaturée par ébullition durant 5 minutes puis déposée sur glace et est rajoutée à la solution d'hybridation pour appariement avec la séquence d'ADN complémentaire située sur la membrane. L'hybridation se fait à 65°C durant toute la nuit. La membrane subit une série de trois lavages successifs avec les solutions suivantes : solution I [SDS (0,1%), NaCl (0,3 M), citrate de sodium (30 mM)] pendant 30 min, solution II [SDS (0,1%, NaCl (0,15 M), citrate de sodium (15 mM)] pendant 15 min et solution III [SDS (0,1%), NaCl (15 mM), citrate de sodium (1,5 mM)] pendant 8 min. La membrane est ensuite exposée avec un film pour autoradiographie *X-Ray blue film* (Fujifilm) qui est développé le jour suivant grâce à l'appareil Kodak. La détection d'une bande d'environ 4 Kb indique la présence du transgène BP1 dans le génome de la souris BP1<sup>43</sup>.

### 2.2.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'ADN génomique de souris provenant du croisement β-YAC et Ikaros est isolé tel que décrit à la section 2.2.1. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est effectuée pour déterminer la présence du transgène β-YAC et dans les cas de Ikaros, évaluer l'homozygotie (+/+ ou -/-) et l'hétérozygotie (+/-). Les amorces utilisées et les conditions de réaction pour chaque PCR sont inscrites dans le tableau II-I.

**Tableau II-I. Amorces pour génotypage des souris β-YAC et Ikaros**

Amorces	Séquence	Description	Conditions de PCR	Produit(s)
00-52 FR-φ3	5'-AAGATTCCTGAGAAGTGAACCTAGC-3' 5'-AGAGGCTTGATAGTAGCCTTGTC-3'	5' promoteur γ- sens Exon 1 γ- antisens	94°C/45 s; 62°C/45 s; 72°C/1,5 min (30 cycles)	1000 bp
06-41 06-42 06-43	5'-GGGCCTTTGGGGACATCGAAGGTC-3' 5'-CATAGGGCATGTCTGACAGGCACTTGT-3' 5'-CCAGCCTCTGAGCCAGAAAGCGA-3'	Ikaros murin Ikaros murin Cassette Neo	94°C/45 s; 65°C/45 s; 68°C/1 min (35 cycles)	+/+ : 650 bp -/- : 450 bp +/- : 650 bp et 450 bp

## 2.2.4 Électrophorèse de l'hémoglobine

Le sang périphérique des souris est récupéré dans un capillaire hépariné (Fisher). Les érythrocytes sont séparés par centrifugation pendant 3 minutes et sont ensuite lysés par une solution contenant de la cystamine diHCl (0,33 M), DTT (6,7 mM), NH<sub>4</sub>OH (0,5 M). Le lysat est déposé sur une membrane de cellulose acétate TITAN III-H (Helena Laboratory) qui a été préalablement trempée dans le TBE 1X [Tris (84,2 mM), EDTA (1,6 mM), acide borique (51,7mM)]. La migration de l'hémoglobine est effectuée à 300V pendant 40 min. La membrane est ensuite colorée au rouge de Ponceau [Ponceau S (5 g/L), acide trichloroacétique (0,3 M)] puis lavée avec une solution d'acide acétique (5%). La membrane est mise en présence d'éthanol (100%) puis trempée dans une solution de méthanol (70%)/acide acétique (30%) et finalement séchée à 55°C. L'haplotype *single* ou *diffus* des souris est identifié par rapport à une souris contrôle F1 (C57Bl/6J x CBA/J ; s/d) ; seules les souris avec un haplotype *diffus* (d/d) ont été sélectionnées pour les croisements et les expériences ultérieures.

## 2.3 Les embryons transgéniques

### 2.3.1 BP1<sup>43</sup>

Les embryons BP1<sup>43</sup> sont obtenus par croisement entre les souris transgéniques adultes BP1<sup>43</sup> (d/d). Les embryons non transgéniques issus du croisement entre souris F1 (C57Bl/6J x CBA/J) ont été utilisés comme contrôles lors des analyses d'expression par PCR quantitatif en temps réel (qPCR). Des embryons non transgéniques (BP1 humain négatifs) ont aussi été utilisés comme contrôle lors du buvardage de type Western pour déterminer l'expression protéique de BP1 humain chez les embryons BP1<sup>43</sup>.

### 2.3.2 $\beta$ -YAC et BP1<sup>43</sup>; $\beta$ -YAC

Les embryons  $\beta$ -YAC ont été obtenus par croisement entre les souris transgéniques adultes  $\beta$ -YAC (*d/d*). Les embryons BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC ont été obtenus par croisement entre les souris transgéniques BP1<sup>43</sup> (*d/d*) et  $\beta$ -YAC (*d/d*). Les embryons  $\beta$ -YAC sont utilisés comme souris contrôles pour les analyses d'expression des gènes de  $\beta$ -globine humaine ( $\epsilon$ ,  $\gamma^G$  et  $\gamma^A$ ,  $\beta$ ).

### 2.3.3 $Ik^{-/-}$ ; $\beta$ -YAC et BP1<sup>43</sup>; $Ik^{-/-}$ ; $\beta$ -YAC

Les embryons  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC ont été obtenus par croisement entre les souris Ikaros hétérozygotes  $Ik^{+/-}$  et  $\beta$ -YAC. Les embryons BP1<sup>43</sup>;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC ont été produits par croisements entre les souris BP1<sup>43</sup>;  $Ik^{+/-}$  et  $Ik^{+/-}$ ;  $\beta$ -YAC.

### 2.3.4 Prélèvement des tissus et organes érythroïdes

Lors de la copulation, le mâle laisse un bouchon vaginale qui indique le moment de la fécondation. L'observation de ce bouchon correspond au jour embryonnaire E0.5. Les embryons sont ensuite récupérés aux jours embryonnaires (E10.5, E12.5, E13.5, E14.5 et E16.5) en procédant à une césarienne de la femelle gestante euthanasiée par dislocation cervicale. Les embryons aux âges E10.5 à E16.5 sont retirés de la femelle et lavés avec du PBS 1X [NaCl (137 mM), KCl (2.7 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (4.3 mM), 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]. Les cellules érythroïdes des îlots sanguins du sac vitellin des embryons à E10.5 sont récupérés par centrifugation (3min, 2000 rpm) alors que le foie foetal à E12.5 à E16.5 est prélevé à l'aide de pinces sous le microscope. Les organes sont mis individuellement dans des tubes puis conservés à -80°C. Un bout de queue de l'embryon est prélevé pour extraire l'ADN génomique tel que décrit dans la section 2.2.1. Le génotypage des embryons se fait par buvardage de type Southern pour détecter la présence du transgène BP1 et par PCR pour Ikaros et  $\beta$ -YAC (Tableau II-I).

## **2.4 Extraction de l'ARN et transcription inverse**

### **2.4.1 Extraction et vérification de l'intégrité de l'ARN**

L'extraction des ARNs présents dans les organes prélevés des embryons est effectuée avec du Trizol en suivant les instructions du manufacturier (Invitrogen, Life technologies). Les ARNs sont resuspendus dans de l'eau ddH<sub>2</sub>O traitée au diethylpyrocarbonate ou DEPC (Sigma) et la concentration est mesurée avec l'instrument de quantification Nanodrop. Des dilutions à 250 ng/μl sont effectuées dans l'eau ddH<sub>2</sub>O traitée au diethylpyrocarbonate ou DEPC. 250 ng totaux d'ARN sont migrés sur gel d'agarose 0.8 %/formaldéhyde 2.2 M afin de vérifier l'intégrité des ARNs par la présence des bandes de 28S et 18S.

### **2.4.2 Traitement à la DNase**

1 μg d'ARN est digéré à la DNase I (Invitrogen) en présence d'inhibiteurs de RNases RNAGuard (Amersham Biosciences) à 37°C pendant 15 min. Afin d'arrêter la réaction, 25mM EDTA (Invitrogen) est ajoutée. L'incubation a lieu à 65°C pendant 15 min et les échantillons sont conservés à -80°C.

### **2.4.3 Transcription inverse**

Les ARNs sont mis en présence d'amorces hexamériques pdN6 (Roche) et incubés à 65°C pendant 5 min puis conservés sur la glace. Afin de produire des ADNc complémentaires (ADNc), les ARN messagers sont ensuite mis en présence de dNTP (2.5 mM), 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 0.1 M DTT (Invitrogen), d'inhibiteurs de RNases RNAGuard (Amersham Biosciences) et de la transcriptase inverse Moloney Murine Leukemia Virus (Invitrogen). La réaction a lieu à 37°C pendant 45 min et est arrêtée à 65°C pendant 15 min. Les dilutions des ADNc ont été effectuées à l'aide de l'eau ddH<sub>2</sub>O traitée au DEPC.

## **2.5 PCR quantitatif en temps réel (qPCR)**

### **2.5.1 Conditions d'amplification**

Les ADNs complémentaires sont quantifiés en présence de 5 µL de Perfecta SYBR Green SuperMix, UNG, Low Rox (Quanta Biosciences) et de 7 µM de chaque amorce (Tableau II-II) pour un volume total de réaction de 10 µl. Les conditions d'amplification pour toutes les paires d'amorces utilisées sont: une étape de dénaturation à 95°C pendant 3 min suivie de 40 à 50 cycles d'amplification (95°C-15 s, 60°C-30 s). La fluorescence émise par le SYBRGreen est détectée par l'appareil *Mx3005P* (Stratagene).

### **2.5.2 Analyse des résultats**

Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel *MxPro*. Les valeurs ont été ensuite compilées sous forme de graphiques à l'aide du logiciel *Prism 5.0* et soumises à des tests statistiques (t-test et ANOVA) afin d'interpréter les résultats. Le test statistique *t-test* permet de montrer la variance dans un même groupe (même âge) entre les différents génotypes. L'analyse de variance (ANOVA) permet de déterminer le niveau de variance entre les différents âges embryonnaires.

Tableau II-II. Amorces utilisés pour PCR quantitatif

Amorces	Séquence	Description
09-15	5'-CTTCTCCCATTGTCCTACTC-3'	BP1 (murin) - sens
09-16	5'-GTTGCTGGCGGGCAGGTAG-3'	BP1 (murin) - antisens
05-39	5'-CCTCCCCCAATTGTCCTACTC-3'	BP1 (humain) - sens
05-40	5'-GGTTGCTGGCAGGACAGGTA-3'	BP1 (humain) - antisens
08-15	5'-AGCAATGTCGCCAACGTAAGAGC-3'	Ikaro (murin) - sens
08-16	5'-TTGATGGCATTGTTGATGGCCTGG-3'	Ikaro (murin) - antisens
12-01	5'-CCTCCATCAGTACACTACC-3'	EKLF (murin) - sens
12-02	5'-CCTCCGATTCAGACTCACG-3'	EKLF (murin) - antisens
12-03	5'-AATTT GGACCCCTCTGAACA-3'	SOX6 (murin) - sens
12-04	5'-AGCTGAGCGGCATAGAGC-3'	SOX6 (murin) - antisens
12-05	5'-GCACTTAAGCAAACGGGAAT-3'	BCL11A (murin) - sens
12-06	5'-CAGGTGAGAAGGTCGTGGTC-3'	BCL11A (murin) - antisens
05-22	5'-GCCTTTGCTAAGCTGAGTGAG-3'	$\epsilon$ -globine (humain) - sens
05-23	5'-TTGCCAAAGTGAGTAGCCAGAA-3'	$\epsilon$ -globine (humain) - antisens
05-08	5'-AATAAGCTCCTAGTCCAGACGC-3'	$\gamma$ -globine (humain) - sens*
05-07	5'-TAGACAACCAGGAGCCTTCC-3'	$\text{A}\gamma$ - et $\text{G}\gamma$ - globine - antisens
05-05	5'-GCAAGGTGAACGTGGATGAAGT-3'	$\delta$ et $\beta$ -globine (humain) - sens
05-06	5'-TAACAGCATCAGGAGTGGACAGA-3'	$\delta$ et $\beta$ -globine (humain) - antisens
05-01	5'-GCTACCAGGGCCTTTGAGATG-3'	S16 (murin) - sens
05-02	5'-AGGAGCGATTGCTGGTGTGG-3'	S16 (murin) - antisens
05-20	5'-CAGCCGAATGACAAAGAAAAGTTCA-3'	Glycophorine A (murin) - sens
05-21	5'-CAAACATTGGAGGACTCTTCATTAGGA-3'	Glycophorine A (murin) - antisens

## **2.6 WesternBlot**

### **2.6.1 Lyse cellulaire**

Les foies fœtaux des embryons WT et BP1<sup>43</sup> (E12.5-E16.5) ainsi que les cellules K562 (utilisées comme contrôles positifs pour BP1) sont homogénéisés avec 200 µl de tampon de lyse cellulaire (RIPA buffer) [Tris (20 mM pH8), NaCl (150 mM), EDTA (2 mM), Triton (0,5 %)] en présence de 2 µl PMSF 100mM et 2 µl cocktail inhibiteurs de protéases (Sigma). Les homogénats sont incubés sur glace 60 minutes pour une lyse cellulaire complète. Les lysats sont ensuite centrifugés à 4°C pendant 10 minutes jusqu'à ce que cela soit translucide. Les extraits protéiques sont conservés à -80°C.

### **2.6.2 Quantification et préparation des échantillons**

La concentration des protéines (µg/µl) est obtenue à partir de la courbe d'absorbance des concentrations croissantes de BSA (Bovine Serum Albumin) effectuée avec le spectrophotomètre Ultrospect 2100 à la longueur d'onde de 595 nm. 20 µg de protéines de chaque échantillon sont utilisées pour la migration sur un gel d'acrylamide 12%. Le volume de protéines à prélever des extraits protéiques est complété à 20 µl avec ddH<sub>2</sub>O et 10 µl de 3X Sample Buffer [Tris-HCL 2M pH 6.8 (0,1875 M), SDS (6%), glycérol 30%, Bleu de Bromophenol (0,2 %), β-mercaptoethanol (5 %)] y sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite bouillis à 100°C et mis sur glace avant le dépôt des échantillons.

### **2.6.3 Migration et transfert des protéines**

7 µl de marqueur moléculaire Kaleidoscope Precision Plus Protein Standard (BioRad) est utilisé comme référence pour identifier ultérieurement la taille des bandes. La migration des échantillons se fait avec du tampon 1X [Tris 3,0 g, Glycine 14,4 g, SDS 1 g] à 150 V pendant 1h. Le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (GE) se fait dans du tampon 1X [Tris (3,03 g), Glycine (14,4 g), 200 ml Méthanol, 800 ml ddH<sub>2</sub>O] pendant 1h30 à 100V et à 4°C.

### 2.6.4 Hybridation et détection

La membrane est préhybridée avec du TBST 1X [Tris (25 mM), NaCl (0,9%), Tween20 (0,1%)] + 5 % lait pendant au moins 1h à 4°C sous agitation. L'hybridation se fait toute la nuit sous agitation avec le premier anticorps polyclonale BP1 (provenant de Dr Berg, Université de Washington) dilué 1:4000 dans du TBST 1X/ 5 % Lait. Les membranes sont lavées avec du TBST 1X (3x 5min) à température ambiante. La membrane est ensuite incubée pendant 1h à 4°C sous agitation avec le second anticorps polyclonal Anti Rabbit IgG (Sigma) dilué à 1:10000 dans du TBST 1X/ 5% Lait. Elle est ensuite lavée à température ambiante (3x5min) avec du TBST 1X avant de procéder ensuite à la détection avec la trousse ECL Prime Western Blotting Detection Reagent selon les directions du manufacturier (Amersham). Les films autoradiographiques Hyblot CL (Denville) sont utilisés pour l'exposition des membranes. La membrane est ensuite déshybridée avec le tampon ERASURE [SDS (2 %), Tris (62,5 mM pH 6,8),  $\beta$ -mercaptoethanol (100 mM)] pendant 30 minutes à 65°C sous agitation. La membrane est lavée (3x5min) une nouvelle fois avec du TBST 1X puis incubée durant 1h à 4°C sous agitation avec du TBST 1X/ 5 % Lait pour empêcher une hybridation non spécifique. L'anticorps monoclonal Anti-GAPDH (Abcam) est dilué à 1: 10 000 dans du TBST 1X/ 5 % Lait et est ajouté pour hybridation pour 1h à 4°C. La membrane est lavée (3x5min) puis incubée avec le second anticorps polyclonal anti-mouse IgG (Sigma) dilué aussi à 1:10000 dans du TBST 1X / 5% Lait. La détection et l'exposition sont effectuées telles que mentionnées précédemment.

### 2.6.5 Analyse des résultats

Les bandes protéiques de BP1 (murin et humain) et GAPDH (murin) ont été numérisées et quantifiées à l'aide du logiciel *Image Quant 5.2*. Le niveau de surexpression de BP1 humain chez les embryons BP1<sup>43</sup> est mesuré par rapport au niveau d'expression de la protéine BP1 endogène murin chez les embryons murins sauvages.

## **2.7 Analyses de séquences**

### **2.7.1 Obtention des régions régulatrices**

Les régions régulatrices situées à proximité des gènes murins codant pour les facteurs de transcription Ikaros, EKLF, BCL11A et SOX6 ont été obtenues à partir de la base de données d'éléments régulateurs de transcription (*TRED : Transcriptional Regulatory Element Database*) mise en place par le laboratoire du Dr Michael Zhang (Cold Spring Harbor). La région d'ADN allant de -700 pb à +499 pb et relative au site d'initiation de la transcription (*TSS : Transcription Start Site*) de chacun des gènes cités précédemment, a été sélectionnée lors des analyses de séquences.

### **2.7.2 Identification des sites de liaison potentiels de BP1**

Les sites de liaison potentiels de BP1 humain dans les régions régulatrices à proximité des gènes Ikaros, EKLF, BCL11A et SOX6 ont été recherchés à partir de la séquence consensus de liaison de BP1 (A/T)T(A/C)(A/T)ATATG et en identifiant les régions d'ADN riches en AT (Berg et al., 1989; van Oostveen et al., 1999; Chase et al., 2002). Le logiciel MatInspector (Genomatix) a aussi été utilisé lors des analyses de séquences.

### **2.7.3 Identification des sites de liaison potentiels d'Ikaros**

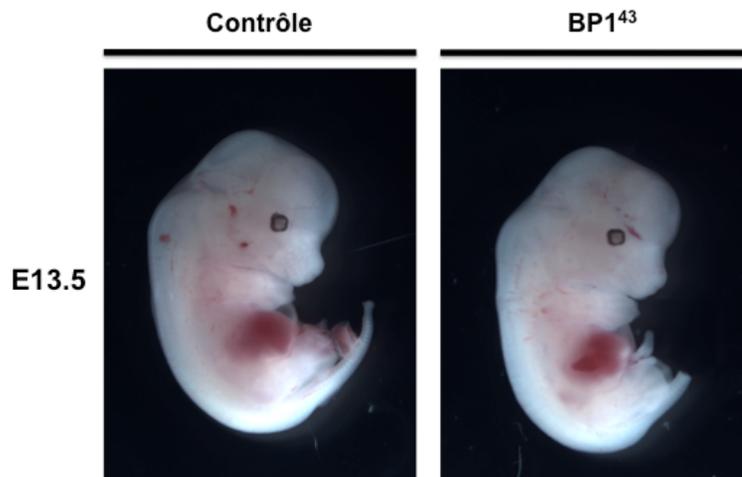
Les sites de liaison potentiels du facteur de transcription Ikaros murin dans les régions régulatrices à proximité des gènes EKLF, BCL11A et SOX6 ont été identifiés en recherchant la présence de motifs GGGAA (Cobbs et al., 2000; Hu et al., 2001).

## Chapitre 3: Résultats

### 3.1 Surexpression de BP1 humain au stade embryonnaire

#### 3.1.1 Les embryons BP1<sup>43</sup>

Avant d'analyser le rôle de BP1 dans la régulation des gènes humains de  $\beta$ -globines au stade embryonnaire, nous avons tout d'abord vérifié si la surexpression de BP1 humain affectait l'érythropoïèse fœtale des embryons simples transgéniques BP1<sup>43</sup>. Pour cela, nous avons obtenu les embryons transgéniques à partir de l'âge E12.5 jusqu'à E16.5. Puisque BP1 humain inhibe l'érythropoïèse définitive, sa présence dans les cellules érythroïdes fœtales devrait avoir un impact sur la survie des embryons *in utero*. À première vue, l'examen des embryons sauvages et transgéniques BP1<sup>43</sup> à l'âge E13.5 (Figure 3.1) ainsi qu'aux autres âges embryonnaires (non montré ici) n'a révélé aucune différence majeure : les souris transgéniques BP1<sup>43</sup> n'ont pas d'anomalies morphologiques apparentes et ne présentent pas de pâleur suggérant l'absence d'anémie.

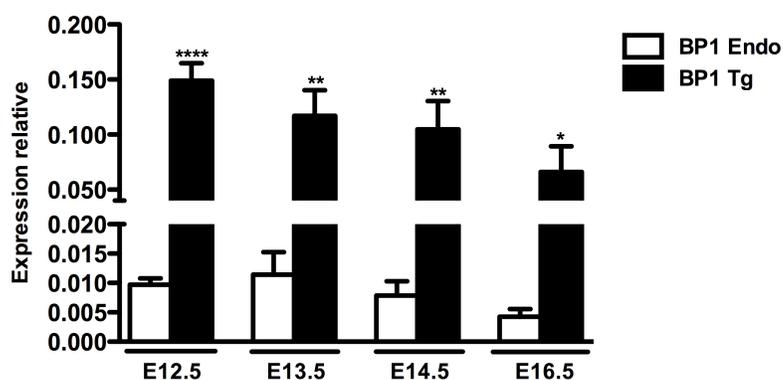


**Figure 3.1. Absence de phénotype chez les embryons transgéniques BP1<sup>43</sup>**

Les embryons sauvages (à gauche) et transgéniques BP1<sup>43</sup> (à droite) ont été prélevés à l'âge embryonnaire E13.5 puis photographiés avec un microscope Leica MZ12 (X2,5).

### 3.1.2 Expression de BP1 humain (ARN)

Puisque les embryons BP1<sup>43</sup> n'ont pas de phénotype apparent, nous avons décidé de mesurer l'expression de BP1 humain dans les cellules érythroïdes fœtales. Pour cela, nous avons prélevé le foie fœtal d'embryons BP1<sup>43</sup> à différents âges embryonnaires soit de E12.5 à E16.5. Le niveau d'expression de BP1 humain au niveau ARN a été mesuré puis comparé à celui de BP1 murin dans les cellules érythroïdes fœtales des embryons BP1<sup>43</sup> (Figure 3.2). Les niveaux d'expression du gène érythroïde glycophorine A (GPA) ont été utilisés pour normaliser les données de BP1 durant le développement embryonnaire. Dans les cellules érythroïdes du foie fœtal entre E12.5 et E16.5, BP1 humain est clairement surexprimée par rapport à l'endogène : les niveaux du transgène sont 12 à 15 fois supérieurs à ceux de l'endogène. Le ratio BP1 Endo/BP1 Tg indique que BP1 murin est significativement moins abondant que BP1 humain. Les données semblent montrées que l'expression de BP1 humain diminue entre le début (~E12.5) et la fin (E16.5) de l'érythropoïèse définitive dans le foie fœtal.

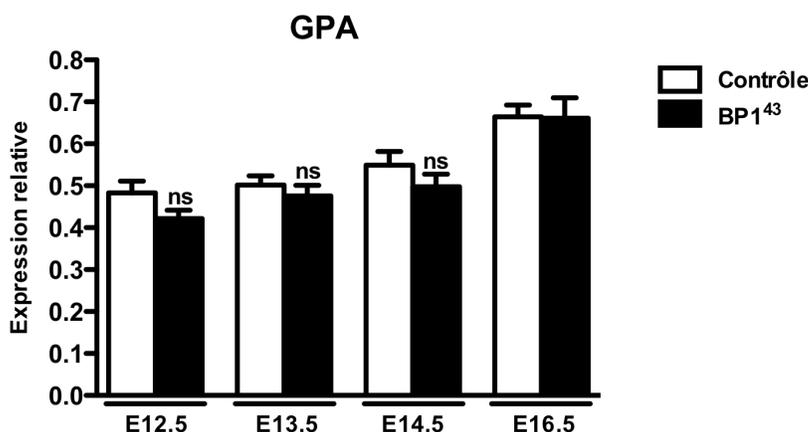


**Figure 3.2. Expression de BP1 murin et humain dans le foie fœtal**

L'expression relative de l'endogène (BP1 Endo) et du transgène (BP1 Tg) a été déterminée par PCR quantitatif à partir de foies fœtaux prélevés à différents âges embryonnaires chez les souris BP1<sup>43</sup>. N $\geq$ 5 foies fœtaux ont été utilisés pour chaque âge indiqué. L'expression a été normalisée par rapport à celle du gène érythroïde glycophorine A (GPA) et est représentée en unités relatives. La variation des données est évaluée par rapport à l'écart à la moyenne ( $\pm$ SEM). La différence entre le niveau d'expression du gène endogène et du transgène est déterminée par le test de Student (t-test): \*, p $\leq$  0.05; \*\*, p $\leq$  0.01; \*\*\*\*, p $\leq$  0.0001 (par rapport à l'endogène).

### 3.1.3 Expression de la glycophorine A (GPA)

Nous nous sommes demandés si la réduction d'expression de BP1 humain observée était attribuée à l'augmentation de l'expression de GPA ou encore à une diminution du nombre de cellules érythroïdes chez les embryons BP1<sup>43</sup>. Pour cela, nous avons mesuré l'expression du gène érythroïde Glycophorine A (GPA) murin et les valeurs obtenues ont été normalisées à celles de l'expression du gène ribosomale S16 (Figure 3.3). Chez les souris sauvages et transgéniques BP1<sup>43</sup>, nous pouvons constater que l'expression de GPA est relativement stable entre E12.5 et E14.5 mais augmente significativement entre E14.5 et E16.5 ( $p < 0.01$ , test ANOVA). Par ailleurs, nos données montrent que l'expression de GPA n'est pas réduite significativement chez les embryons transgéniques BP1<sup>43</sup>.

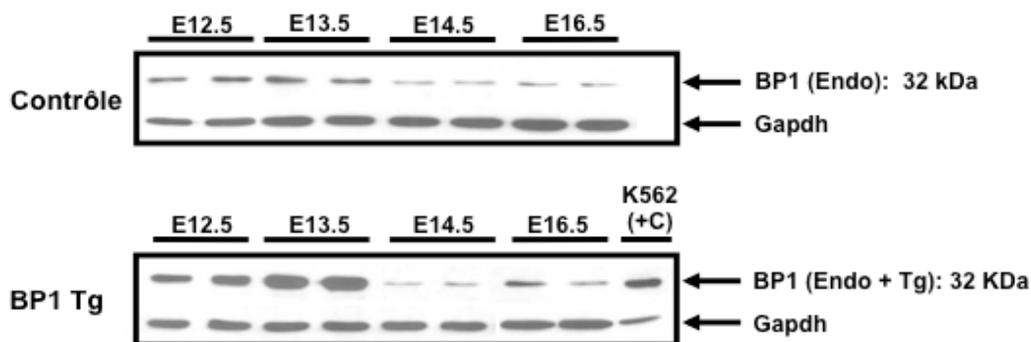


#### Figure 3.3. Expression de la glycophorine A

L'expression de la glycophorine A (GPA) dans le foie fœtal a été mesurée à différents âges embryonnaires chez les souris BP1<sup>43</sup> et comparée à celle des souris sauvages de même fond génétique (C57BL/6J x CBA/J).  $N \geq 5$  foies fœtaux ont été utilisés pour chaque âge indiqué. L'expression de GPA a été normalisée par rapport à celle du gène ribosomale S16. La variation des données est représentée par rapport à l'écart à la moyenne ( $\pm$  SEM). La différence de niveaux d'expression de GPA entre les embryons contrôles et BP1<sup>43</sup> a été déterminée par le test de Student (*t*-test): ns (non significatif),  $p > 0.05$  (par rapport au contrôle). La variation d'expression au cours du développement a été mesurée par le test ANOVA.

### 3.1.4 Expression de BP1 humain (protéine)

Étant donné que l'expression de BP1 humain a été déterminé au niveau ARN, nous voulions vérifier si les transcrits BP1 humains étaient traduits en protéines. Pour cela, le niveau d'expression de la protéine humaine BP1 a été déterminé par rapport à celle de la protéine endogène murine dans les cellules érythroïdes fœtales des embryons BP1<sup>43</sup>. Puisque l'anticorps employé pour détecter la protéine BP1 humaine reconnaît aussi la protéine endogène, une quantification des bandes protéiques a été nécessaire afin d'obtenir le niveau de surexpression du transgène chez les embryons BP1<sup>43</sup>. La mesure semi-quantitative de l'intensité des bandes protéiques montre que l'expression de la protéine BP1 endogène à E14.5 et E16.5 est deux fois plus basse comparativement aux âges E12.5 et E13.5, ce qui montre que l'expression protéique de BP1 murin diminue au cours du développement embryonnaire. En ce qui concerne le transgène, nos données indiquent que la protéine BP1 humaine est exprimée 2,5 à 3 fois plus que la protéine endogène aux âges E12.5 et E13.5 (Figure 3.4). À E14.5 et E16.5, il semble que BP1 humain n'est plus exprimé au niveau protéique : seule la protéine murine BP1 semble être détectée à ces âges embryonnaires.

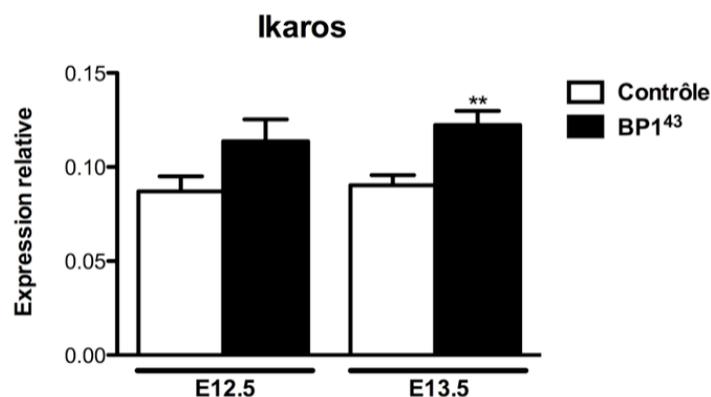


**Figure 3.4. Expression de la protéine BP1 murine et humaine dans le foie fœtal**

L'expression protéique de BP1 murin (Endo) et humain (Tg) a été déterminée à partir d'extraits protéiques de foies fœtaux provenant de souris sauvages et BP1<sup>43</sup>. N=2 foies fœtaux ont été choisis pour chaque âge. L'intensité des bandes protéiques a été mesurée puis normalisée à celle obtenues pour la Glycéraldehyde 3-phosphate déshydrogénase (Gapdh) qui a servi de contrôle interne. Pour déterminer la surexpression de BP1 humain chez BP1<sup>43</sup> à chaque stade, l'expression de la protéine endogène chez les embryons sauvages a été établie à 1. Les extraits protéiques des cellules K562 ont servi de contrôle positif pour la protéine BP1 humaine.

### 3.1.5 Expression d'Ikaros, EKLF, BCL11A et SOX6

Étant donné que la protéine BP1 humaine est exprimée à E12.5 et E13.5 dans le foie fœtal, nous avons décidé de vérifier si la présence de BP1 humain altérait la machinerie transcriptionnelle impliquée dans la régulation des gènes murins de  $\beta$ -globine. Aucune étude à ce jour n'a fait référence aux possibles rôles de BP1 dans la régulation de l'expression des facteurs de transcription qui sont d'ailleurs conservés chez la souris et l'humain. Étant donné notre intérêt pour la commutation de l'hémoglobine embryonnaire/fœtale-adulte, nous avons choisi de quantifier le niveau d'expression des facteurs de transcription connus pour être impliqués dans la régulation des gènes embryonnaires et fœtaux soit Ikaros, EKLF, BCL11A et SOX6. Leur niveau d'expression relative a été ainsi mesuré par PCR quantitatif dans le foie fœtal au moment où la protéine BP1 est exprimée, soit E12.5 et E13.5.

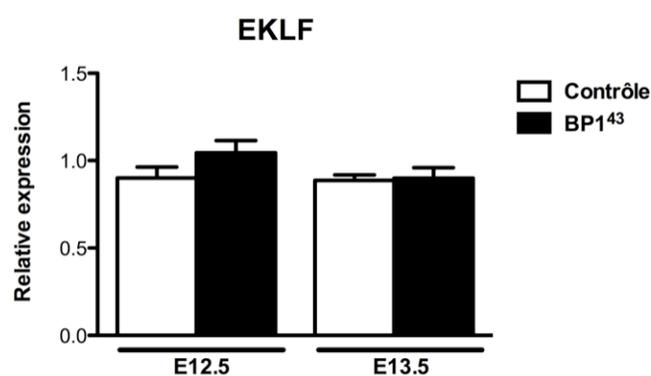


**Figure 3.5. Expression d'Ikaros dans les cellules érythroïdes fœtales**

L'expression d'Ikaros a été mesurée par PCR quantitatif à partir de foies fœtaux des embryons BP1<sup>43</sup> et des embryons sauvages de même fond génétique (C57BL/6J x CBA/J). N $\geq$ 5 foies fœtaux ont été utilisés pour chaque âge. Les niveaux d'expression des facteurs de transcription ont été normalisés par rapport à celles de gène de la glycophorine A (GPA). La variation des données est représentée par rapport à l'écart à la moyenne ( $\pm$  SEM). La différence dans les niveaux d'expression entre les embryons contrôles et BP1<sup>43</sup> a été évaluée par le test de Student (t-test): \*\*,  $p \leq 0.01$ .

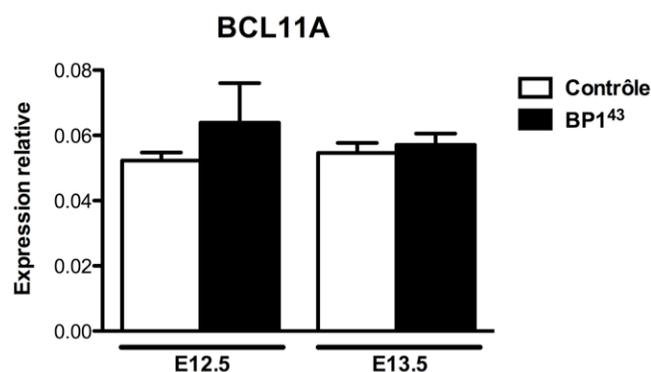
Le niveau d'expression d'Ikaros murin a été mesuré dans les cellules érythroïdes des souris sauvages et transgéniques BP1<sup>43</sup>. Nos données indiquent que l'expression d'Ikaros est élevée chez les embryons BP1<sup>43</sup> (Figure 3.5). En effet, la transcription d'Ikaros est augmentée d'environ 30 % à E12.5 et davantage (35 %) à E13.5 chez BP1<sup>43</sup>.

Le facteur de transcription EKLF est un régulateur essentiel de l'érythropoïèse définitive puisqu'il active l'expression des gènes adultes de  $\beta$ -globine et de nombreux autres gènes érythroïdes. À E12.5 et E13.5, nous avons pu constater que l'expression d'EKLF ne varie pas significativement entre les embryons sauvages et transgéniques BP1<sup>43</sup> (Figure 3.6). Étant donné que BCL11A est un gène cible d'EKLF, nous avons décidé de mesurer son expression chez les embryons BP1<sup>43</sup> (Figure 3.7). L'expression de BCL11A n'est pas non plus altérée significativement en présence de BP1 humain à E12.5 et à E13.5.



**Figure 3.6. Expression d'EKLF dans les cellules érythroïdes fœtales**

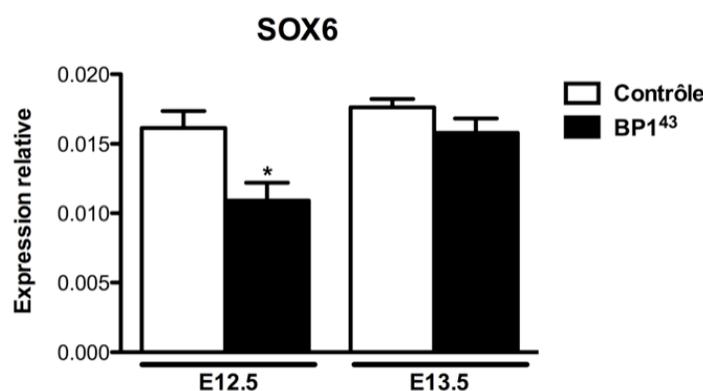
L'expression d'EKLF a été mesurée par PCR quantitatif à partir de foies fœtaux des embryons BP1<sup>43</sup> et des embryons sauvages de même fond génétique (C57BL/6J x CBA/J). N $\geq$ 5 foies fœtaux ont été utilisés pour chaque âge. Les niveaux d'expression des facteurs de transcription ont été normalisés par rapport à celles de gène de la glycophorine A (GPA). La variation des données est représentée par rapport à l'écart à la moyenne ( $\pm$  SEM).



**Figure 3.7. Expression de BCL11A dans les cellules érythroïdes fœtales**

L'expression de BCL11A a été mesurée par PCR quantitatif à partir de foies fœtaux des embryons BP1<sup>43</sup> et des embryons sauvages de même fond génétique (C57BL/6J x CBA/J). N $\geq$ 5 foies fœtaux ont été utilisés pour chaque âge. Les niveaux d'expression des facteurs de transcription ont été normalisés par rapport à celles de gène de la glycophorine A (GPA). La variation des données est représentée par rapport à l'écart à la moyenne ( $\pm$  SEM).

SOX6 a été identifié comme étant un régulateur de l'érythropoïèse définitive impliqué à plusieurs niveaux dans les cellules érythroïdes notamment dans la répression des gènes embryonnaires. Ce facteur de transcription réprime les gènes embryonnaires et fœtaux (chez l'humain) notamment via sa coopération avec BCL11A (Sankaran et al., 2011). Nos données montrent que le niveau d'expression de SOX6 est significativement réduit dans les cellules érythroïdes fœtales des embryons BP1<sup>43</sup> à E12.5 (Figure 3.8). Par contre, la transcription de SOX6 n'est plus réduite à l'âge embryonnaire E13.5.



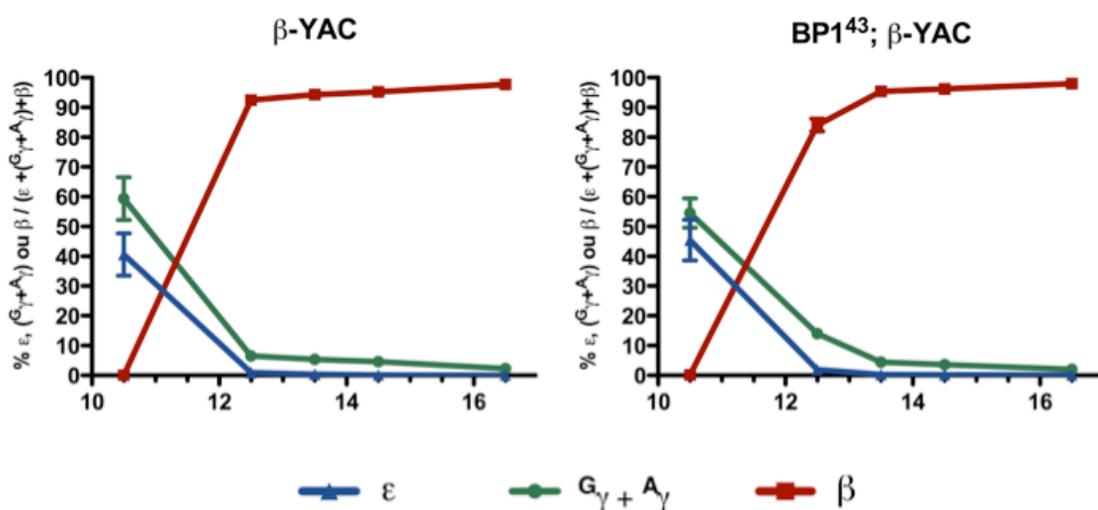
### Figure 3.8. Expression de SOX6 dans les cellules érythroïdes fœtales

L'expression de SOX6 a été mesurée par PCR quantitatif à partir de foies fœtaux des embryons BP1<sup>43</sup> et des embryons sauvages de même fond génétique (C57BL/6J x CBA/J). N $\geq$ 5 foies fœtaux ont été utilisés pour chaque âge. Les niveaux d'expression des facteurs de transcription ont été normalisés par rapport à celles de gène de la glycophorine A (GPA). La variation des données est représentée par rapport à l'écart à la moyenne ( $\pm$  SEM). La différence dans les niveaux d'expression entre les embryons contrôles et BP1<sup>43</sup> a été évaluée par le test de Student (t-test): \*, p $\leq$  0.05.

## 3.2 BP1 et les gènes humains de $\beta$ -globine

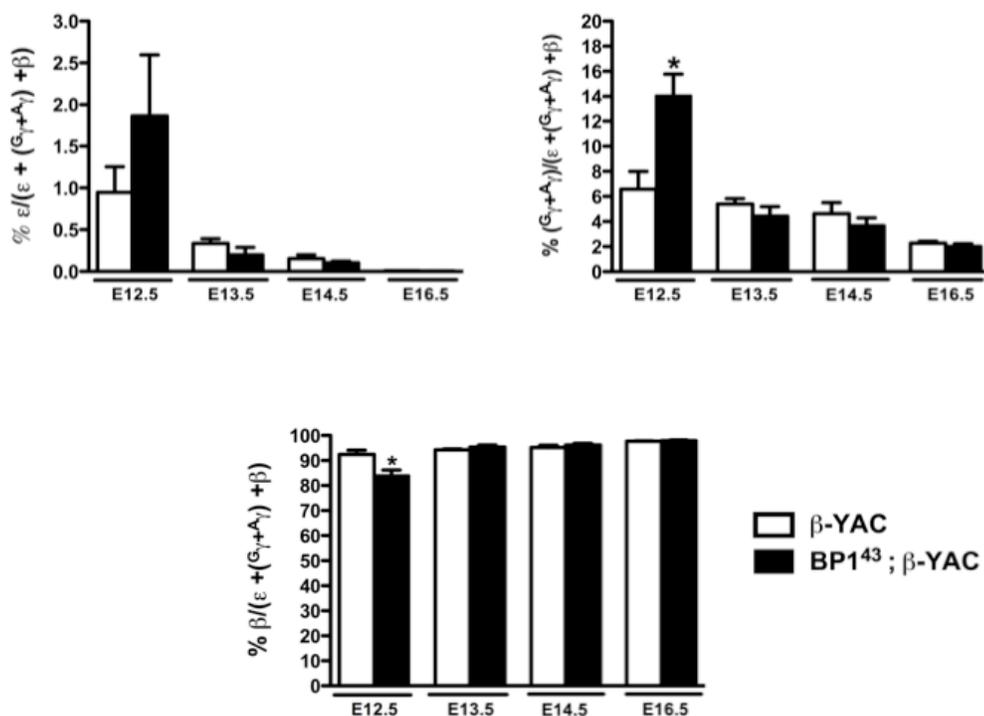
Afin de déterminer *in vivo* le rôle de BP1 humain dans l'expression des gènes humains de  $\beta$ -globine, nous avons croisé nos souris BP1<sup>43</sup> avec les souris  $\beta$ -YAC qui possèdent le locus entier de  $\beta$ -globine humaine et avons mesuré l'expression de chacune des globines ( $\epsilon$ ,  $\gamma^G$  et  $\gamma^A$ , et  $\beta$ ) à différents âges embryonnaires (E10.5, E12.5, E13.5, E14.5 et E16.5) chez  $\beta$ -YAC et BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC (Figure 3.9). Nous avons pu constater que la commutation de l'hémoglobine chez les embryons  $\beta$ -YAC et BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC a lieu au même jour embryonnaire soit vers E11.5. Toutefois, l'expression du gène  $\beta$  est

altérée à E12.5 chez BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC car sa transcription est réduite de 7% par rapport au niveau retrouvé chez  $\beta$ -YAC (Figure 3.10). L'expression des gènes foetaux ( $G_\gamma$  et  $A_\gamma$ ) est aussi modifiée à E12.5 chez BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC puisque leur niveau est 2 fois plus élevés que celui des embryons transgéniques  $\beta$ -YAC de même âge. Cette altération de l'expression des gènes  $\gamma$  et  $\beta$  en présence de BP1 humain à E12.5 est aussi accompagné d'une augmentation de l'expression du gène embryonnaire  $\epsilon$  mais qui n'est pas significative ( $p>0.05$ ). À E13.5, l'expression des gènes humains de  $\beta$ -globine ne semble pas différée entre les génotypes  $\beta$ -YAC et BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC.



**Figure 3.9. Profil d'expression des  $\beta$ -globines humaines en présence de BP1**

L'expression des gènes humains de  $\beta$ -globine a été mesurée par PCR quantitatif à différents âges embryonnaires chez les souris BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC et comparée à celle des souris  $\beta$ -YAC.  $N \geq 3$  embryons ont été utilisés pour chaque âge indiqué et les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à celles de gène de la glycophorine A (GPA). Le pourcentage d'expression de chaque gène a été calculé par rapport au pourcentage total de  $\beta$ -globine ( $\epsilon$ ,  $G_\gamma + A_\gamma$  et  $\beta$ ). La variation des données a été représentée en pourcentages  $\pm$  l'écart à la moyenne ( $\pm$  SEM).



**Figure 3.10. Expression des gènes humains de  $\beta$ -globine dans le foie fœtal**

L'expression de chaque gène humain de  $\beta$ -globine (%) est représentée individuellement. La variation des données a été représentée en pourcentage  $\pm$  l'écart à la moyenne ( $\pm$  SEM). La différence de niveau d'expression par rapport au génotype  $\beta$ -YAC été évaluée par le test de Student (t-test) : \*,  $p \leq 0.05$ .

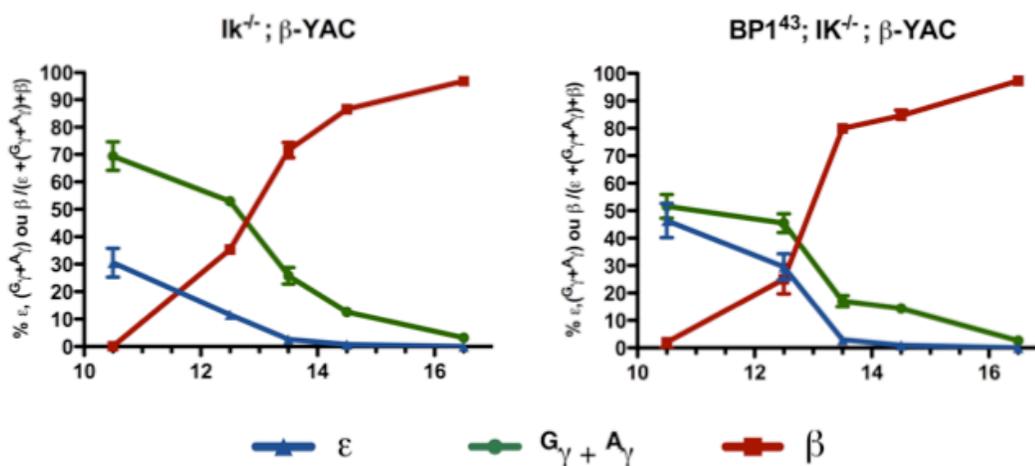
### 3.3 Régulation des gènes de $\beta$ -globine par BP1 et Ikaros

Au cours du développement, l'expression des gènes de  $\beta$ -globine murins et humains est sous le contrôle de différents facteurs de transcriptions. Ikaros en est un exemple car son absence affecte l'érythropoïèse définitive et entraîne une anémie visible durant le stade embryonnaire (Figure 3.11). Les embryons  $Ik^{-/-}$  semblent présenter d'ailleurs un retard dans la commutation de l'hémoglobine embryonnaire-adulte (Lopez et al., 2002). Afin d'identifier le rôle d'Ikaros dans la régulation des gènes humains de  $\beta$ -globine par BP1, nous avons entrepris nos analyses d'expression des  $\beta$ -globines humaines sur un fond génétique Ikaros-nulle en présence de BP1. Pour cela, nous avons croisé les souris  $\beta$ -YAC et Ikaros pour obtenir des souris  $Ik^{+/-}$ ;  $\beta$ -YAC. Ces dernières ont été ensuite croisées avec les souris BP1<sup>43</sup>;  $Ik^{+/-}$  afin d'obtenir des embryons BP1<sup>43</sup>;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC.



**Figure 3.11. Phénotype des embryons  $Ik^{+/+}$  et  $Ik^{-/-}$**   
 Les embryons  $Ik^{+/+}$  (à gauche) et  $Ik^{-/-}$  (à droite) ont été obtenus à E16.5 et photographiés avec un microscope Leica MZ12 (X2,5).

### 3.3.1 Profil d'expression des $\beta$ -globines en absence d'Ikaros



**Figure 3.12. Profil d'expression des  $\beta$ -globines humaines en absence d'Ikaros**

L'expression des gènes humains de  $\beta$ -globine a été mesurée par PCR quantitatif à différents âges embryonnaires.  $N=2$  pour E10.5 et  $n \geq 3$  embryons pour les autres âges indiqués et les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à celles de gène de la glycopherine A (GPA). Le pourcentage d'expression de chaque gène a été calculé par rapport au pourcentage total de  $\beta$ -globine ( $\epsilon$ ,  $G_{\gamma} + A_{\gamma}$  et  $\beta$ ). La variation des données a été représentée en pourcentages  $\pm$  l'écart à la moyenne ( $\pm$  SEM).

Nous avons déterminé le profil d'expression des  $\beta$ -globines humaines chez les embryons  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC et  $BP1^{43}$ ;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC (Figure 3.12). En absence d'Ikaros, l'expression stade-spécifique des gènes humains de  $\beta$ -globine est altérée chez les deux génotypes. Chez les embryons  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC, l'absence d'Ikaros entre E12.5 et E14.5 dans le foie fœtal retarde la répression des gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$  ainsi que l'activation de  $\beta$ . Nous avons pu constater un délai dans la mise en place de la commutation fœtale-adulte chez les embryons  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC : celle-ci a lieu vers E12.75 soit plus d'un jour de retard par rapport aux embryons  $\beta$ -YAC (E11.5). Chez les embryons  $BP1^{43}$ ;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC, la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte a lieu aussi vers E12.75. À E12.5 et E13.5, on peut observer que l'expression des gènes  $\epsilon$ ,  $\gamma$  et  $\beta$  est altérée dans les cellules érythroïdes des embryons  $BP1^{43}$ ;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC.

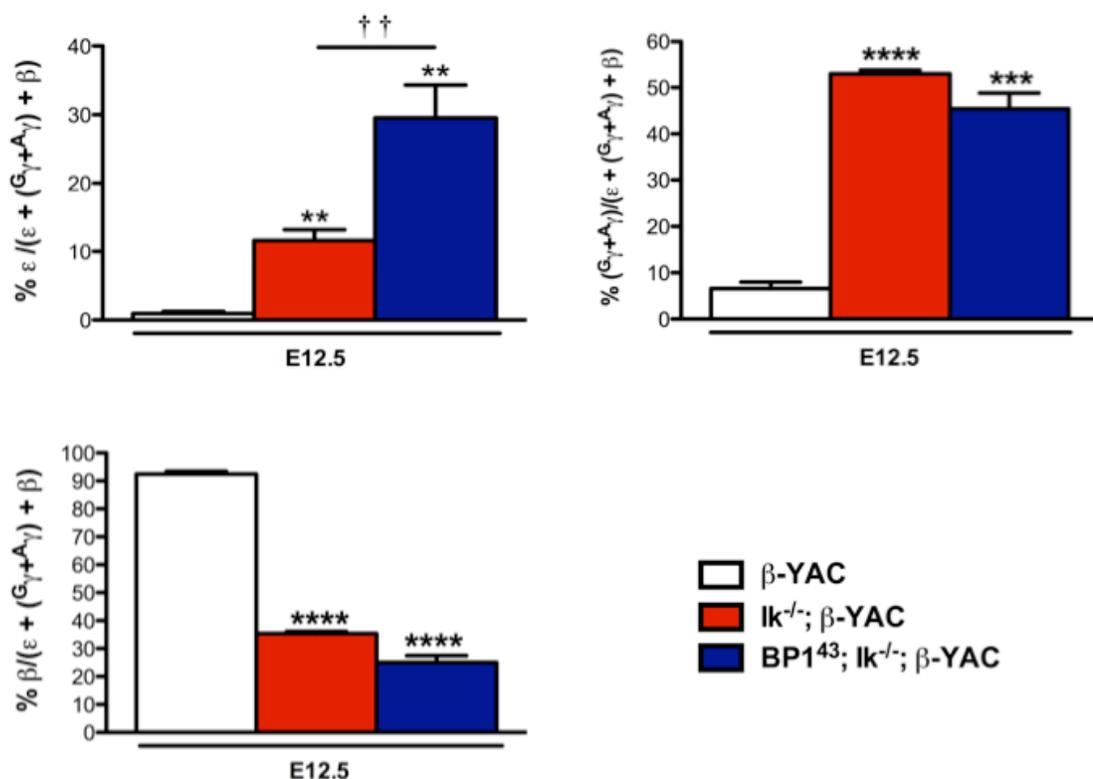
### 3.3.2 Expression d' $\epsilon$ , $\gamma$ et $\beta$ dans le foie fœtal à E12.5

Afin de mesurer précisément l'effet de BP1 humain en absence d'Ikaros, nous avons mesuré les niveaux d'expression de chacune des  $\beta$ -globines humaines dans les cellules érythroïdes fœtales des embryons  $\beta$ -YAC,  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC et  $BP1^{43}$ ;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC.

À E12.5 chez les souris  $\beta$ -YAC, l'expression du gène embryonnaire  $\epsilon$  représente seulement 1% de l'expression totale des  $\beta$ -globines humaines. Chez les embryons  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC, le niveau d' $\epsilon$  grimpe à environ 11% soit près de 11 fois le niveau observé chez  $\beta$ -YAC (Figure 3.13). Lorsque  $\epsilon$  est quantifié chez les embryons  $BP1^{43}$ ;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC, on s'aperçoit que son expression est jusqu'à 30 fois supérieurs comparativement au niveau présent dans les embryons  $\beta$ -YAC et de 3 fois si l'on compare avec celui d' $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC.

En ce qui concerne les gènes fœtaux ( $^G\gamma$  et  $^A\gamma$ ) à E12.5 chez les souris  $\beta$ -YAC, leur niveau d'expression est plus élevé que celui d' $\epsilon$  (6% versus 1%) mais est significativement plus bas comparé à celui du gène adulte  $\beta$  (92%). Chez les embryons  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC, la transcription de  $\gamma$  est maintenue élevée à E12.5 et représente 53 % de l'expression totale des  $\beta$ -globines humaines. Chez les souris  $BP1^{43}$ ;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC, la transcription des fœtaux ne représente que 45 %, un niveau plus bas que celui retrouvé chez  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC (non significative,  $p>0.05$ ).

L'expression du gène adulte  $\beta$  est aussi altérée à E12.5 chez  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC : elle représente seulement 35%, soit une baisse de 57 % comparé au niveau retrouvé chez les  $\beta$ -YAC (92%). Chez  $BP1^{43}$ ;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC, la transcription  $\beta$  est de 25%.

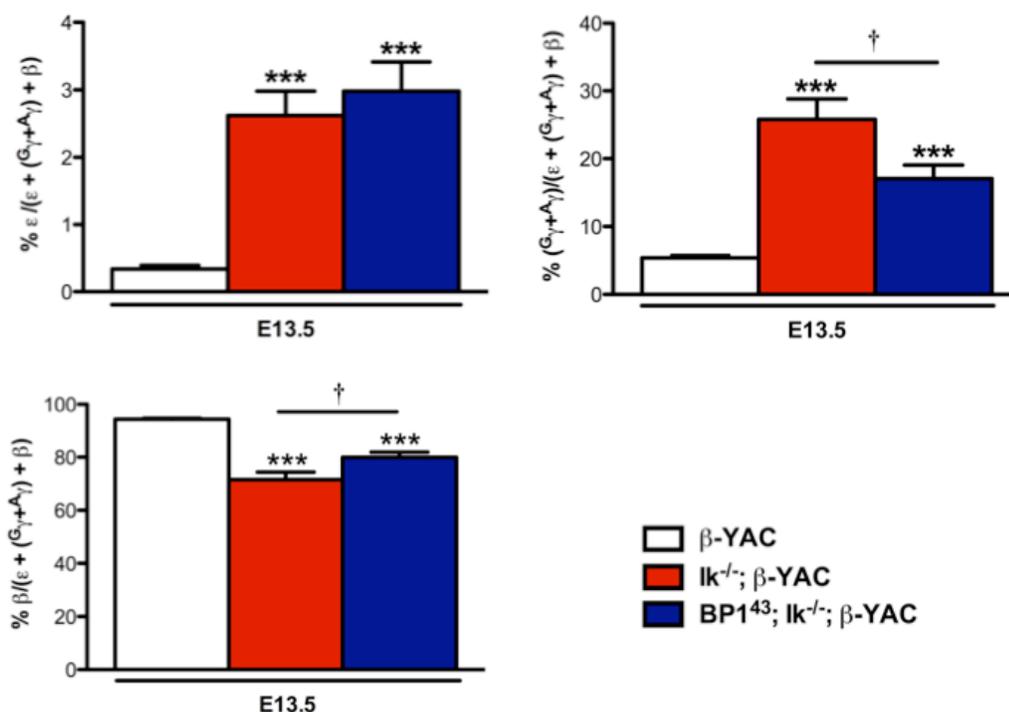


**Figure 3.13. Expression des gènes humains de  $\beta$ -globine à E12.5**

L'expression des gènes humains de  $\beta$ -globine a été mesurée par PCR quantitatif à différents âges embryonnaires. Les mesures de quantification des globines ont été effectuées à partir de  $n \geq 3$  foies fœtaux pour chaque âge indiqué et les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à celles du gène de la glycophorine A (GPA). Le pourcentage d'expression de chaque gène calculé par rapport au pourcentage total de  $\beta$ -globine ( $\epsilon$ ,  $G_{\gamma} + A_{\gamma}$  et  $\beta$ ) a été converti en ratio. La variabilité des données est représentée  $\pm$  l'écart à la moyenne ( $\pm$  SEM). La différence de niveau d'expression par rapport au génotype  $\beta$ -YAC été évaluée par le test de Student (t-test): \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p \leq 0.0001$ . La différence des niveaux d'expression entre les génotypes  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC et  $BP1^{43}$ ;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC été évaluée par le test de Student (t-test): ††,  $p < 0.01$ .

### 3.3.3 Expression d' $\epsilon$ , $\gamma$ et $\beta$ dans le foie fœtal à E13.5

À E13.5, l'expression du gène embryonnaire  $\epsilon$  est quasi nulle chez  $\beta$ -YAC. Chez les embryons  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC et  $BP1^{43}$ ;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC, le niveau d' $\epsilon$  reste élevé soit respectivement 2,6 % et 3 %. Les gènes fœtaux continuent à être fortement exprimés à E13.5 dans les cellules érythroïdes fœtales d' $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC (26%) et  $BP1^{43}$ ;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC (17%). Les données montrent surtout que la présence de BP1 humain engendre une répression significative ( $p < 0.05$ ) des gènes fœtaux dans un contexte Ikaros-nulle. L'absence d'Ikaros murin à l'âge E13.5 continue d'affecter aussi l'expression du gène adulte  $\beta$  humain qui se situe à 71 % chez les souris  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC. L'expression du gène  $\beta$  est toutefois significativement augmentée chez les embryons  $BP1^{43}$ ;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC si l'on compare à  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC ( $p < 0.05$ ).



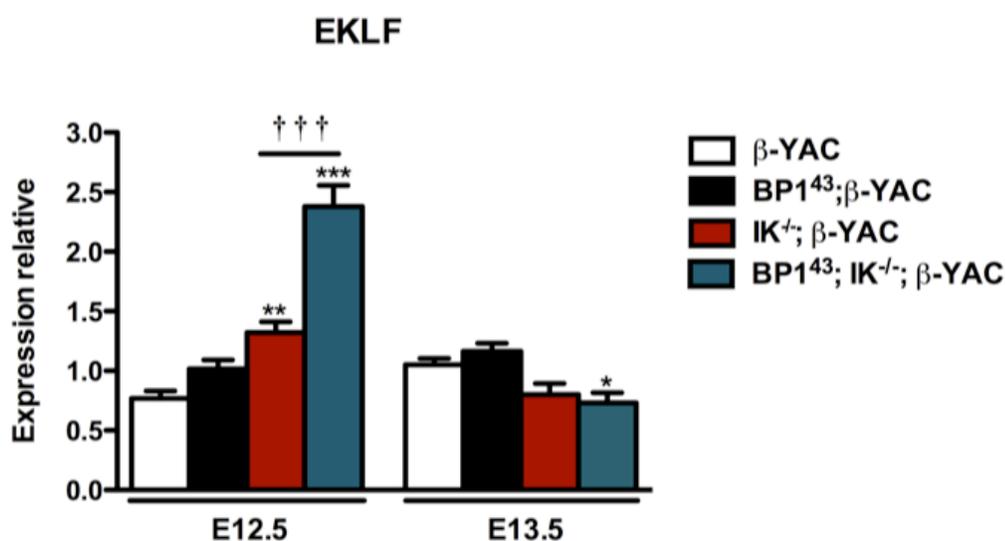
**Figure 3.14. Expression des gènes humains de  $\beta$ -globine à E13.5**

L'expression des gènes humains de  $\beta$ -globine a été mesurée par PCR quantitatif à différents âges embryonnaires. Les mesures de quantification des globines ont été effectuées à partir de  $n \geq 3$  foies fœtaux pour chaque âge indiqué et les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à celles du gène de la glycophorine A (GPA). Le pourcentage d'expression de chaque gène calculé par rapport au pourcentage total de  $\beta$ -globine ( $\epsilon$ ,  $G_{\gamma} + A_{\gamma}$  et  $\beta$ ) a été converti en ratio. La variabilité des données est représentée  $\pm$  l'écart à la moyenne ( $\pm$ SEM). La différence de niveau d'expression par rapport au génotype  $\beta$ -YAC été évaluée par le test de Student (t-test) : \*\*\*,  $p \leq 0.001$ . La différence des niveaux d'expression entre les génotypes  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC et  $BP1^{43}$ ;  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC été évaluée par le test de Student (t-test) : †,  $p < 0.05$ .

### 3.3.4 Expression des facteurs de transcription à E12.5 et E13.5

La régulation des gènes humains de  $\beta$ -globine par BP1 en absence d'Ikaros laisse penser que des facteurs de transcription tels que EKLF, BCL11A et SOX6 pourraient être impliqués dans le mécanisme transcriptionnel. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons quantifié leur niveau d'expression aux âges E12.5 et E13.5 chez les différents génotypes.

#### 3.3.4.1 Expression d'EKLF en absence d'Ikaros



**Figure 3.15. Expression relative d'EKLF en absence d'Ikaros**

L'expression relative d'EKLF a été mesurée par PCR quantitatif dans le foie fœtal des embryons transgéniques. Les mesures de quantification ont été effectuées à partir de  $n \geq 3$  foies fœtaux pour chaque âge indiqué. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à celles du gène de la glycophorine A (GPA). La variation des données est représentée par rapport à l'écart à la moyenne ( $\pm$ SEM). La différence d'expression par rapport à  $\beta$ -YAC a été évaluée par le test de Student: \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ . La différence des niveaux d'expression entre Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC et BP1<sup>43</sup>; Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC été évaluée par le test de Student (t-test) :†††,  $p < 0.001$ .

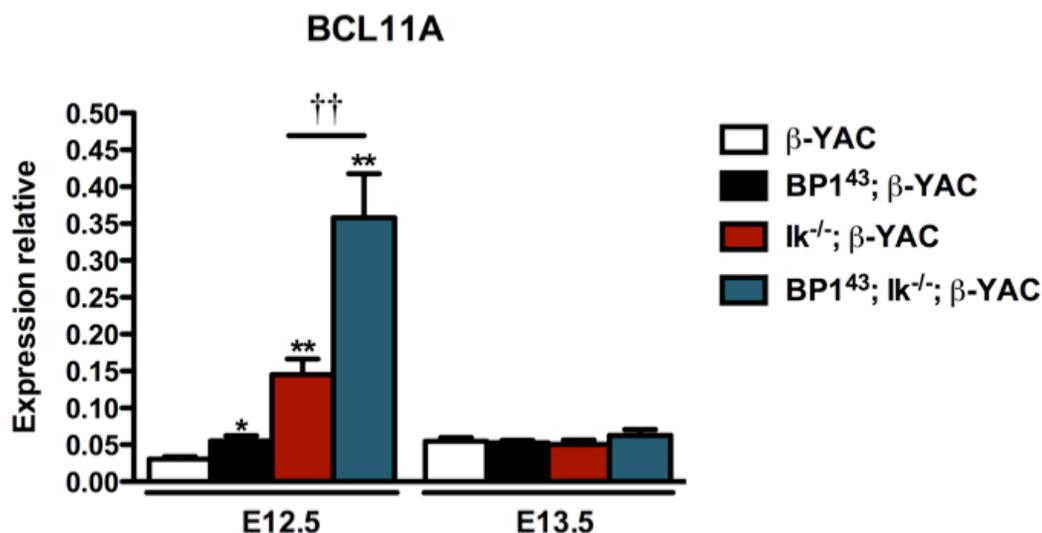
Le niveau d'expression d'EKLF murin a été déterminé dans les cellules érythroïdes des différents génotypes à E12.5 (Figure 3.16). Lorsqu'Ikaros est absent chez les embryons  $\beta$ -YAC (Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC), le niveau d'expression d'EKLF murin est augmenté d'environ 1.5 fois par rapport à celui de  $\beta$ -YAC. Chez BP1<sup>43</sup>; Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC à E12.5, le

niveau d'EKLf est augmenté de 3 fois par rapport à celui de  $\beta$ -YAC et représente le double de l'expression observée chez  $Ik^{-/-}; \beta$ -YAC ( $p < 0.001$ ). Le niveau d'EKLf semble augmenté chez les souris  $BP1^{43}; \beta$ -YAC mais la différence d'expression entre  $\beta$ -YAC et  $BP1^{43}; \beta$ -YAC n'est pas significative ( $p > 0.05$ ).

À l'âge embryonnaire E13.5, le niveau d'expression d'EKLf diminue de 20% chez  $Ik^{-/-}; \beta$ -YAC si l'on compare au niveau de  $\beta$ -YAC. Chez les embryons  $BP1^{43}; Ik^{-/-}; \beta$ -YAC à E13.5, la transcription d'EKLf est aussi réduite par rapport à  $\beta$ -YAC ( $p < 0.05$ ). La comparaison entre  $Ik^{-/-}; \beta$ -YAC et  $BP1^{43}; Ik^{-/-}; \beta$ -YAC montre aucune différence significative dans l'expression d'EKLf.

#### 3.3.4.2 Expression de BCL11A en absence d'Ikaros

Étant donné que BCL11A est un gène cible d'EKLf pour la répression de  $\gamma$ , nous avons vérifié si son niveau d'expression augmentait dans les cellules érythroïdes des embryons  $Ik^{-/-}; \beta$ -YAC et  $BP1^{43}; Ik^{-/-}; \beta$ -YAC (Figure 3.17). Le niveau de BCL11A murin chez les embryons  $Ik^{-/-}; \beta$ -YAC est augmenté à E12.5 et représente environ 5 fois celui de  $\beta$ -YAC. Chez les embryons  $BP1^{43}; Ik^{-/-}; \beta$ -YAC de même âge embryonnaire, le niveau de BCL11A augmente de 12 fois par rapport à celui de  $\beta$ -YAC et correspond à 2,5 fois l'expression observé chez  $Ik^{-/-}; \beta$ -YAC ( $p = 0.01$ ). Le niveau de BCL11A chez les souris  $BP1^{43}; \beta$ -YAC et la différence d'expression entre  $BP1^{43}; \beta$ -YAC et  $BP1^{43}; Ik^{-/-}; \beta$ -YAC est significative ( $p < 0.01$ ). La quantification de BCL11A à E13.5 chez les embryons  $Ik^{-/-}; \beta$ -YAC et  $BP1^{43}; Ik^{-/-}; \beta$ -YAC montre que les niveaux d'expression détectés sont similaires à celui de  $\beta$ -YAC.



**Figure 3.16. Expression relative de BCL11A en absence d'Ikaros**

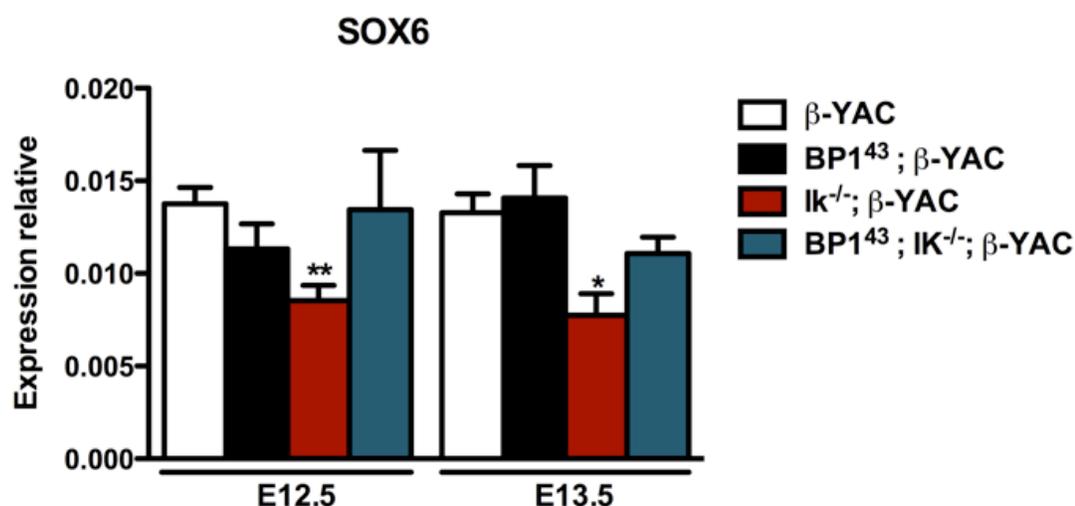
L'expression relative de BCL11A a été mesurée par PCR quantitatif dans le foie fœtal des embryons transgéniques. Les mesures de quantification ont été effectuées à partir de  $n \geq 3$  embryons pour chaque âge indiqué. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à celles du gène de la glycophorine A (GPA). La variation des données est représentée par rapport à l'écart à la moyenne ( $\pm$ SEM). La différence d'expression par rapport à  $\beta$ -YAC a été évaluée par le test de Student (t-test): \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ . La différence des niveaux d'expression entre Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC et BP1<sup>43</sup>; Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC été évaluée par le test de Student (t-test) : ††,  $p < 0.01$ .

### 3.3.4.3 Expression de SOX6 en absence d'Ikaros

BCL11A interagit avec le facteur de transcription de type HMG SOX6 dans les cellules érythroïdes pour réprimer  $\gamma$  (Xu et al. 2010). Nous avons ainsi procédé à la quantification de l'expression de SOX6 dans les cellules érythroïdes fœtales chez les mêmes génotypes. Chez les embryons Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC à E12.5, l'expression de SOX6 est réduite pratiquement de moitié par rapport au niveau mesuré chez  $\beta$ -YAC. Le niveau de SOX6 dans les cellules érythroïdes BP1<sup>43</sup>; Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC à E12.5 semble plus bas que celui mesuré chez  $\beta$ -YAC mais plus élevé que celui retrouvé chez Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC.

À E13.5, la transcription de SOX6 murin est aussi altérée chez Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC : le niveau est réduite de moitié par rapport à celui de  $\beta$ -YAC. Dans les cellules érythroïdes des embryons BP1<sup>43</sup>; Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC, le niveau de SOX6 murin est diminué s'il l'on compare à celui de  $\beta$ -YAC (non significatif,  $p > 0.5$ ) mais il s'avère plus élevé en comparant avec Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC (non significatif,  $p > 0.5$ ). Les données semblent montrer

que la présence de BP1 humain engendre une dérégulation de SOX6 murin en absence d'Ikaros à E12.5 et E13.5.



**Figure 3.17. Expression relative de SOX6 en absence d'Ikaros**

L'expression relative de SOX6 a été mesurée par PCR quantitatif dans le foie fœtal des embryons transgéniques. Les mesures de quantification ont été effectuées à partir de  $n \geq 3$  foies fœtaux pour chaque âge indiqué. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à celles du gène de la glycophorine A (GPA). La variation des données est représentée par rapport à l'écart à la moyenne ( $\pm$ SEM). La différence d'expression par rapport à  $\beta$ -YAC a été évaluée par le test de Student (t-test): \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ .

### 3.4 Identification des sites de liaison de BP1 et d'Ikaros

Puisque la surexpression de BP1 humain et l'absence d'Ikaros murin semblent influencer le niveau d'expression des facteurs de transcription endogènes EKLF, BCL11A et SOX6, nous avons décidé de vérifier la présence des sites de liaison potentiels de BP1 et d'Ikaros dans des régions régulatrices à proximité des gènes codant pour ces facteurs de transcription. L'identification des sites de liaison potentiels de BP1 et Ikaros a été effectuée dans les régions d'ADN allant de -700 pb à +499 pb par rapport au site d'initiation de la transcription des gènes murins EKLF, BCL11A et SOX6. La présence de sites de liaison et leur localisation sont indiquées dans les tableaux III-I et III-II.

### 3.4.1 Sites de liaison de BP1 dans EKLF, BCL11A et SOX6

Nos données semblent indiquer la présence d'un site de liaison potentiel de BP1 situé 422 pb en aval du site d'initiation de la transcription du gène murin EKLF (Tableau III-I). BP1 semble aussi posséder un site de liaison dans la région régulatrice du gène SOX6 localisé à +138 pb. Aucun site de liaison de BP1 n'a cependant été identifié dans la région promotrice du gène BCL11A. Par ailleurs, la liaison de BP1 a aussi été vérifiée dans la région régulatrice à proximité du gène Ikaros murin (Ik) mais aucun site de liaison potentiel n'a été identifié.

**Tableau III-I. Sites de liaison potentiels de BP1**

Région régulatrice (-700 à +499)	Nombre de sites de liaison identifiés	Localisation des sites de liaison relative au site d'initiation de la transcription
EKLF	1	+422 pb
BCL11A	0	N/A
SOX6	1	+138 pb
Ik	0	N/A

N/A : Non applicable. pb : paires de bases.

### 3.4.2 Sites de liaison d'Ikaros dans EKLF, BCL11A et SOX6

En ce qui concerne Ikaros, trois sites de liaison GGGAA (-63 pb, +456 pb et +467 pb) a pu être identifiés dans la région régulatrice du gène murin EKLF (Tableau III-II). Un seul site de liaison d'Ikaros a été repéré dans le promoteur du gène murin BCL11A à -401 pb mais aucun n'a été identifié pour la région régulatrice de SOX6.

**Tableau III-II. Sites de liaison potentiels d'Ikaros**

Région régulatrice (-700 à +499)	Nombre de sites de liaison identifiés	Localisation des sites de liaison relative au site d'initiation de la transcription
EKLF	3	-63 pb; +456 pb; +467 pb
BCL11A	1	-401 pb
SOX6	0	N/A

N/A : Non applicable. pb : paires de bases.

## ***Chapitre 4: Discussion***

### **4.1 Rôle de BP1 dans l'érythropoïèse fœtale murine**

À ce jour, la plupart des études concernant BP1 humain ont été menées dans un contexte *in vitro*. Son rôle dans la répression du gène adulte de  $\beta$ -globine a d'ailleurs été établi *in vitro* dans les cellules érythroleucémiques K562 humaines (Berg et al., 1989; Chase et al., 2002; Zoueva et al., 2004). Une seule étude a été effectuée *in vivo* avec des souris transgéniques mais l'analyse de BP1 humain dans le compartiment érythroïde définitif murin a été interrompue à cause du décès de la seule souris transgénique obtenue. De plus, les embryons LCRBP1 mouraient *in utero* durant l'érythropoïèse fœtale vers E16.5 notamment par le fait du niveau élevé de BP1 humain dont l'expression était sous le contrôle du LCR (Eiymo Mwa Pollo et al., 2006). Afin de produire des souris transgéniques ayant des niveaux de BP1 humain compatibles avec la survie des embryons, le LCR a été enlevé de la construction du transgène et plusieurs lignées de souris transgéniques ont été ainsi générées. Une seule d'entre elles, la lignée transgénique BP1<sup>43</sup>, a la caractéristique d'exprimer exclusivement BP1 humain dans les cellules érythroïdes de la moelle osseuse des souris transgéniques (Eiymo Mwa Pollo, 2007). De plus, la protéine BP1 humaine est significativement surexprimée par rapport à la protéine endogène dans les cellules de la moelle osseuse (Eiymo Mwa Pollo, 2007). Par ailleurs, la réduction de l'expression des gènes adultes  $\beta$  chez les souris adultes BP1<sup>43</sup> et BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC a confirmé *in vivo* la fonction de BP1 humain dans la répression de ce gène (Eiymo Mwa Pollo, 2007). Afin de déterminer le rôle de BP1 humain plus tôt dans le développement, nous avons décidé d'entreprendre notre analyse au niveau embryonnaire et plus particulièrement durant l'érythropoïèse définitive des embryons transgéniques BP1<sup>43</sup>. Vers l'âge embryonnaire E11.5 et pendant une grande partie de la gestation de la souris, le foie fœtal constitue le site principal de l'érythropoïèse définitive chez l'embryon. À l'âge E14.5, plus de 90 % des cellules du foie fœtal murin sont des cellules érythroïdes (Morris et al., 1988). Par ailleurs, l'établissement de l'érythropoïèse définitive dans le foie fœtal est associé à la commutation de l'hémoglobine embryonnaire/fœtale-adulte chez la souris sauvage et transgénique  $\beta$ -YAC (Gaensler et

al., 1993). Déterminer l'impact de la surexpression de BP1 dans l'érythropoïèse définitive fœtale était nécessaire avant notre analyse des gènes humains de  $\beta$ -globine chez les souris doubles transgéniques BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC.

#### 4.1.1 Niveau d'expression de BP1 humain dans le foie fœtal

La mesure d'expression de BP1 humain au niveau ARN dans les cellules érythroïdes fœtales a permis de mettre en évidence la surexpression du transgène par rapport à celle du gène endogène BP1. L'abondance des transcrits de BP1 humain dans les cellules érythroïdes fœtales est d'ailleurs attribuée aux éléments présents dans la construction  $\beta$ BP1 $\beta$ . Le promoteur humain de  $\beta$ -globine étant un promoteur faible, la région 3' du gène de  $\beta$ -globine comprenant 18 pb de l'exon 2 suivies de l'intron2, l'exon 3 et la région en 3' du poly(A) a été placée en aval de l'ADNc de BP1 humain. Plusieurs études ont clairement démontré l'importance des séquences 3' du gène de la  $\beta$ -globine pour l'expression dans les cellules érythroïdes fœtales et adultes. Les séquences présentes dans l'exon 3 du gène humain de  $\beta$ -globine sont nécessaires et suffisantes pour conduire l'expression de gènes hybrides 5'<sup>G</sup> $\gamma$ /3' $\beta$  dans les tissus érythroïdes adultes et dans le foie fœtal (Trudel et al., 1987). Un enhancer est d'ailleurs situé entre 600 et 900 pb en 3' du site poly(A) et permet l'expression stade-spécifique du gène adulte  $\beta$  (Trudel & Costantini, 1987). Par ailleurs, la construction  $\beta$ BP1 $\beta$  contient aussi des introns qui permettent non seulement d'augmenter significativement la transcription de transgène mais aussi le transport de l'ARNm hors du noyau, un processus couplé au mécanisme d'épissage (Brinster et al., 1988; Choi et al., 1991). En ce qui concerne le profil d'expression de BP1 humain obtenu dans le foie fœtal, nous devons apporter quelques précisions. En effet, l'expression du transgène a été normalisée par rapport à celle du gène érythroïde GPA donnant l'impression que BP1 diminue au cours du développement. Si on prend en compte que l'expression de GPA murin augmente significativement entre les âges E12.5 et E16.5 (Figure 3.3), cela fait en sorte que le ratio BP1Tg/GPA déterminé à E16.5 semble plus faible qu'à l'âge E12.5. En réalité, la transcription de BP1 humain ne diminue pas significativement entre E12.5 et E16.5 (Figure 3.2). Toutefois, nous n'écartons la possibilité que notre transgène soit sujet à un effet de position dans les cellules érythroïdes fœtales. En effet, *in vivo* l'expression des

transgènes peut être perturbée par l'activation d'éléments régulateurs situés de part et d'autre du site d'intégration dans la chromatine, ce qui peut résulter en une réduction de l'expression du transgène (Festenstein et al., 1996; Milot et al., 1996). Une hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) nous aurait permis de localiser le site d'intégration du transgène et définir les régions adjacentes qui pourraient influencer l'expression *in vivo* du transgène (Milot et al., 1996). Par ailleurs, une solution aurait été d'intégrer à la construction  $\beta$ BP1 $\beta$  un insulateur tel que le 5'HS4 (Walters et al., 1999) qui protège le transgène contre les effets de position de la chromatine. Nous avons d'ailleurs généré une autre construction dans laquelle l'insulateur HS4 est inséré en 3' de l'ADNc de BP1 humain qui est sous le contrôle d'un promoteur du gène érythroïde PBGD (Annexe 1). Cette construction servira à produire des souris transgéniques dans lesquels l'expression de BP1 humain est ciblée dans les cellules érythroïdes plus tôt dans le développement embryonnaire alors que la présence de l'insulateur HS4 permettra d'empêcher les effets de la chromatine environnante et assurer une expression plus stable du transgène BP1.

Déterminer l'expression du transgène BP1 au niveau protéique était particulièrement important pour la suite de notre analyse au niveau embryonnaire. Bien que l'expression de BP1 humain est élevée au niveau ARN, son expression au niveau protéique représente seulement que 2,5 à 3 fois le niveau de la protéine endogène. De plus, BP1 humain est exprimé uniquement au début de l'érythropoïèse fœtale soit aux âges embryonnaires E12.5 et E13.5. Ces observations suggèrent que les étapes post-transcriptionnelles telles que l'épissage constitutif et la traduction pourraient être altérées dans les cellules érythroïdes définitives fœtales des embryons BP1<sup>43</sup>. Il se peut que le faible taux de traduction observée soit attribué à un défaut d'accumulation des ARNm dans le cytoplasme des cellules érythroïdes (Yilmaz et al., 2006) ou peut être à une dégradation d'une fraction des transcrits BP1 humains. Ces hypothèses devront cependant être vérifiées afin d'éclaircir notamment l'absence de la protéine BP1 humaine aux autres âges embryonnaires soit à E14.5 et E16.5.

#### 4.1.2 Impact de BP1 humain dans les cellules érythroïdes BP1<sup>43</sup>

Les embryons transgéniques BP1<sup>43</sup> ne meurent pas *in utero* et sont phénotypiquement semblables aux embryons sauvages. Cette observation pourrait être expliquée par le fait que les niveaux protéiques de BP1 humain chez les embryons BP1<sup>43</sup> ne sont pas suffisants pour affecter significativement l'érythropoïèse définitive fœtale et entraîner une anémie. On peut donc penser que l'impact de BP1 serait dose-dépendent. Chez les embryons LCRBP1 (Eimyo Mwa Pollo et al., 2006), il se pourrait que le niveau protéique de BP1 ait été significativement élevé pour inhiber la production de cellules érythroïdes définitives, ce qui expliquerait leur mort *in utero*. Dans notre cas, l'expression de BP1 humain n'est pas sous le contrôle du LCR et l'expression protéique ne représente que 2,5 à 3 fois celui de l'endogène, ce qui expliquerait la survie des embryons transgéniques BP1<sup>43</sup>. En outre, le niveau d'expression du gène érythroïde GPA murin à E12.5 et E13.5 chez BP1<sup>43</sup> (Figure 3.3) indique que les niveaux protéiques de BP1 humain ne seraient pas suffisants pour engendrer une réduction significative du nombre de cellules érythroïdes définitives fœtales et causer une anémie. D'ailleurs, la production de proérythroblastes ne semble pas être compromise chez les embryons BP1<sup>43</sup> puisque l'expression de GPA débute à ce stade de différenciation érythroïde (Wojda et al., 2002 ; Chen et al 2009). Ces observations semblent confirmer que l'érythropoïèse fœtale des embryons BP1<sup>43</sup> n'est pas affectée. Toutefois, un tri cellulaire en utilisant les marqueurs CD71 et Ter119<sup>+</sup> permettrait de confirmer l'effet de BP1 humain dans la maturation érythroïde aux âges E12.5 et E13.5 chez les souris BP1<sup>43</sup>.

Pour expliquer l'absence de phénotype chez les embryons BP1<sup>43</sup>, nous avons décidé aussi de mesurer l'expression d'Ikaros, EKLF, BCL11A et SOX6 dans les cellules érythroïdes BP1<sup>43</sup> à E12.5 et E13.5. Ce choix fut justifié par le fait que ces facteurs de transcription sont impliqués à différents niveaux dans l'érythropoïèse définitive notamment dans l'activation de gènes essentiels aux cellules érythroïdes dont les gènes de  $\beta$ -globine. Ainsi, quelconque changement dans le niveau d'expression de ces régulateurs pouvait nous indiquer les effets de BP1 humain dans l'érythropoïèse définitive fœtale murine. Dans un premier temps, l'augmentation du niveau d'Ikaros dans les cellules érythroïdes fœtales BP1<sup>43</sup> (Figure 3.5) nous a révélé que BP1 humain pouvait être impliqué dans la régulation de ce facteur de transcription au cours du

développement. Toutefois, l'absence de site de liaison potentiel de BP1 dans la région régulatrice du gène murin Ikaros (Tableau III-I) semble indiquer que BP1 pourrait réguler l'expression d'Ikaros par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription. Étant donné qu'Ikaros semble jouer un rôle dans la prolifération et la différenciation des érythroblastes ainsi que dans la commutation de l'hémoglobine embryonnaire/fœtal-adulte (Lopez et al., 2002; Papathanasiou et al., 2003), l'augmentation de l'expression d'Ikaros pouvait compenser l'effet de BP1 humain dans les cellules érythroïdes définitives fœtales murines. Toutefois, nos données n'indiquent pas quelle isoforme est la plus abondante. En effet, plusieurs isoformes d'Ikaros ont été identifiées et chacune montre un profil tissu- et stade-spécifique durant le développement embryonnaire. Ikaros 1 (Ik1) et Ikaros 2 (Ik2) sont les isoformes les plus abondantes dans le foie fœtal (Molnar & Georgopoulos, 1994). Il se peut que les isoformes 1 et 2 soient majoritairement présentes dans le foie fœtal aux âges E12.5 et E13.5 dans les cellules érythroïdes BP1<sup>43</sup>. À noter qu'Ik1 et Ik2 sont des puissants activateurs comparés aux autres isoformes et pourraient stimuler l'expression des gènes érythroïdes cibles dans les cellules érythroïdes BP1<sup>43</sup> comme par exemple ceux codant pour le récepteur de la transferrine (CD71) et de l'érythropoïétine (Lopez et al., 2002).

Un des plus importants activateurs de l'érythropoïèse est le facteur de transcription EKLF. Celui-ci n'est pas nécessaire à l'expansion des progéniteurs érythroïdes ; en revanche, il est essentiel à la différenciation terminale des précurseurs car il active l'expression de gènes érythroïdes essentiels au métabolisme de l'hémoglobine (enzymes de synthèse de l'hème, molécules chaperrones et gène de  $\beta$ -globine adulte) et à la stabilité membranaire (Lim et al., 1997; Drissen et al., 2005). Bien qu'un site de liaison potentiel de BP1 ait été identifié dans la région régulatrice du gène murin EKLF suggérant une possible régulation directe d'EKLF par BP1, le niveau d'expression d'EKLF ne varie pas significativement dans les cellules érythroïdes des embryons BP1<sup>43</sup> à E12.5 et E13.5 (Figure 3.6). Cette observation semble ainsi suggérer indirectement que la différenciation terminale des précurseurs érythroïdes ne serait pas affectée par la présence de BP1 humain chez les embryons BP1<sup>43</sup>. Ceci est en accord avec les résultats précédents qui semblent montrer que les niveaux de BP1 humain n'entraînent pas de réduction significative de l'expression de GPA et donc que la

maturation des cellules érythroïdes ne serait pas affectée. Étant donné que la transcription d'EKLF ne change pas significativement en présence de BP1, les gènes cibles d'EKLF tels que BCL11A se comportent de la même manière. À noter qu'aucun site liaison de BP1 n'a été identifié dans la région régulatrice du gène murin BCL11A.

BP1 humain pourrait agir par d'autres voies que celle de la répression du gène adulte  $\beta$  pour perturber l'érythropoïèse définitive. C'est la raison pour laquelle le niveau de SOX6 a été mesuré chez les embryons BP1<sup>43</sup>. SOX6 est un facteur de transcription requis non seulement pour le développement des tissus érythropoïétiques (foie fœtal, rate, moelle osseuse) mais aussi pour la survie et la prolifération des cellules érythroïdes (Dumitriu et al., 2006). Nos données semblent indiquer que la surexpression de BP1 humain réduit significativement la transcription de SOX6 murin à E12.5. Il faut cependant souligner que l'effet de SOX6 dans l'érythropoïèse définitive dépend de son niveau d'expression: il a été démontré que l'haploinsuffisance de SOX6 n'est pas suffisant pour perturber significativement l'érythropoïèse normale (Cantu et al., 2011; Sankaran et al., 2011). Par conséquent, on peut supposer que la diminution de SOX6 observée chez les souris transgéniques BP1<sup>43</sup> n'aurait pas d'impact significatif dans la survie des cellules érythroïdes définitives fœtales, ce qui expliquerait en partie pourquoi les embryons transgéniques BP1<sup>43</sup> ne présentent pas d'anémie apparente. De plus, il s'avère que le niveau de SOX6 n'est plus affecté significativement à E13.5 malgré la présence de BP1 humain ce qui laisse penser que la maturation et la survie des cellules érythroïdes définitives BP1<sup>43</sup> ne sont pas compromises à court terme. Cette observation suggère que d'autres facteurs endogènes pourraient être impliqués dans l'activation de SOX6, ce qui antagoniserait l'effet répresseur de BP1. Étant donné que BP1 semble réguler le niveau d'expression de SOX6 et qu'un site de liaison potentiel de BP1 a été identifié dans la région régulatrice de ce gène, on peut envisager le possible rôle de BP1 humain dans la régulation des gènes embryonnaires et fœtaux de  $\beta$ -globine par l'intermédiaire de SOX6. D'ailleurs, le facteur de transcription SOX6 est responsable de la répression des gènes embryonnaires  $\epsilon\gamma$  et  $\beta\text{h}_1$  (Yi et al., 2006).

## 4.2 Régulation des gènes humains de $\beta$ -globine par BP1

### 4.2.1 Répression du gène adulte humain $\beta$ au stade embryonnaire

Plusieurs études *in vitro* ont montré que le facteur de transcription BP1 est un répresseur du gène adulte de  $\beta$ -globine. Toutefois, ce rôle n'a pas été confirmé dans un contexte *in vivo*. Avec les embryons doubles transgéniques BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC, nous avons la possibilité de déterminer pendant le stade embryonnaire murin si BP1 humain pouvait réprimer le gène  $\beta$  *in vivo*. Sachant que les niveaux protéiques de BP1 humain n'inhibent pas l'érythropoïèse définitive fœtale murine, on pouvait s'attendre à ce que la répression de  $\beta$  ne soit pas importante au stade embryonnaire. À l'âge E12.5 chez les embryons doubles transgéniques BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC, la transcription de  $\beta$  est réduite uniquement de 7% par rapport au niveau observé chez les embryons  $\beta$ -YAC, une répression de  $\beta$  bien inférieure à celle mesurée au stade adulte dans les cellules de la moelle osseuse (~50%) (Eiymo Mwa Pollo, 2007). Plusieurs possibilités pourraient expliquer que cette situation. Le niveau d'expression protéique de BP1 humain au stade embryonnaire pourrait en effet être en cause puisque qu'elle ne représente que 2,5 fois le niveau de la protéine endogène à E12.5. Par ailleurs, on peut aussi penser que la faible répression de  $\beta$  humain soit attribuée à l'absence de partenaire protéique de BP1 dans les cellules érythroïdes fœtales. Bien qu'aucune protéine partenaire de BP1 n'ait été identifiée à ce jour, il se pourrait que la répression de  $\beta$  soit médiée par un complexe multiprotéique comprenant non seulement BP1 mais aussi d'autres protéines tel que les protéines HMG et BP2 (Drew et al., 2000) ou même d'autres facteurs de transcription qui pourraient agir comme cofacteurs de BP1. Le profil d'expression ainsi que le rôle de BP2 ne sont pas connus à ce jour mais cette protéine pourrait être un des partenaires potentiels. D'ailleurs, BP2 peut lier *in vitro* dans le promoteur du gène  $\beta$  à -270 pb, un site proche du silencer II de BP1 (Berg et al., 1989). On pourrait aussi envisager que des mécanismes endogènes antagoniseraient la répression de  $\beta$  par BP1. Cette hypothèse est mise en avant pour deux raisons. La première vient du fait que la protéine BP1 humaine est exprimée à l'âge E13.5 alors qu'aucune répression de  $\beta$  n'est visible. Deuxièmement, l'expression d'Ikaros est augmentée en présence de BP1 humain chez les embryons simples transgéniques BP1<sup>43</sup>. Dans les cellules érythroïdes fœtales, Ikaros fait partie du

complexe PYR qui semble faciliter la commutation de l'hémoglobine embryonnaire/fœtale-adulte en changeant entre autre la conformation du locus de  $\beta$ -globine de sorte que le  $\beta$ LCR active préférentiellement le gène humain de  $\beta$ -globine. Ikaros pourrait donc compétitionner avec BP1 humain en favorisant l'activation de  $\beta$  humain.

#### 4.2.2 Régulation des gènes $\epsilon$ et $\gamma$ par BP1 ?

La répression de  $\beta$  à E12.5 chez BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC est associée à une élévation de l'expression des gènes humains  $\epsilon$  et  $\gamma$ . Cette observation propose que BP1 humain puisse participer aux mécanismes d'activation des autres gènes fonctionnels de  $\beta$ -globine au début du développement embryonnaire. Bien qu'aucun site de liaison de BP1 n'a été identifié dans le promoteur d' $\epsilon$ , trois sites de liaison de BP1 ont été identifiés par EMSA en amont du site d'initiation de la transcription des gènes fœtaux  $^G\gamma$  et  $^A\gamma$  (Berg, données non publiées). En effet, deux sites de BP1 ont été localisés à 1427 pb et 1091 pb en amont de  $^G\gamma$  alors qu'un autre site est situé à 1091 bp en amont de  $^A\gamma$ . De plus, un site de liaison de BP1 est présent dans la région intergénique  $\gamma$ - $\delta$  et plus précisément en amont du gène  $\delta$  (Chase et al., 2002), une région importante dans la régulation de la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte. BP1 pourrait lier ses sites et participer à l'activation des gènes fœtaux dans les cellules érythroïdes. Une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) sera cependant nécessaire pour déterminer si BP1 humain lie véritablement ces régions du locus humain de  $\beta$ -globine.

Par ailleurs, il se pourrait aussi que BP1 humain puisse activer les gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$  par le biais de la répression de SOX6. En effet, nos données semblent montrer que l'expression de SOX6 murin diminue lorsque BP1 humain est surexprimée chez les embryons BP1<sup>43</sup> et BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC à E12.5. D'ailleurs, un site de liaison potentiel de BP1 semble être présent dans la région régulatrice du gène murin SOX6. Fait intéressant, différentes études montrent aussi que le profil d'expression de BP1 murin et SOX6 murin s'opposent au cours du développement embryonnaire chez les souris sauvages. En effet, au début du stade embryonnaire (E10.5), l'expression de BP1 murin est élevée (Zoueva et al., 2008) alors que celle de SOX6 murin est faible (Yi et al.,

2006). Il se pourrait que BP1 murin puisse maintenir l'expression des gènes embryonnaires ( $\epsilon$ y et  $\beta_{h1}$ ) en réprimant l'expression de SOX6 tôt dans le développement. On pourrait donc envisager le même type d'action de la part de BP1 humain sur les gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$  dans les cellules érythroïdes murines BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC. À ce jour, aucune étude ne fait état de la fonction des facteurs DLX dans la régulation du gène SOX6 dans les cellules érythroïdes murines.

### 4.3 Rôle de BP1 en absence d'Ikaros

BP1 pourrait faire partie des mécanismes transcriptionnels impliqués dans la répression de  $\beta$  et l'activation d' $\epsilon$  et  $\gamma$  au cours du développement embryonnaire. Nous avons toutefois remarqué que la surexpression de BP1 humain dans les cellules érythroïdes fœtales murines était associée à une élévation de l'expression d'Ikaros murin qui est un facteur transcriptionnel qui facilite la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte. Cette observation nous a conduit à émettre l'hypothèse que BP1 et Ikaros seraient liés d'une manière ou d'une autre aux mécanismes de régulation des gènes humains de  $\beta$ -globine dans les cellules érythroïdes fœtales.

#### 4.3.1 Altération de l'expression d' $\epsilon$ , $\gamma$ et $\beta$ en absence d'Ikaros

Ikaros est exprimé dans les cellules érythroïdes définitives du foie fœtal (O'Neill et al., 1999). Son rôle dans la régulation des gènes humains  $\gamma$  et  $\beta$  a déjà été abordé *in vivo* dans les souris transgéniques (Lopez et al., 2002). Toutefois, il restait à éclaircir son impact dans un contexte de locus entier de  $\beta$ -globine notamment en ce qui concerne son rôle dans l'expression du gène humain  $\epsilon$ . En effet, les analyses d'expression ont été menées chez des souris transgéniques possédant un mini locus de  $\beta$ -globine (cosmide  $\Delta\gamma$ - $\beta$ ) (O'Neill et al., 1999; Lopez et al., 2002). Les analyses d'expression menées avec nos embryons  $Ik^{-/-}$ ;  $\beta$ -YAC semblent confirmer le rôle d'Ikaros dans la répression de  $\gamma$  et l'activation de  $\beta$  et révèlent entre autre son implication dans la répression d' $\epsilon$ . Il s'avère en effet que le gène embryonnaire humain se comporte de la même manière que les gènes fœtaux en absence d'Ikaros. La liaison d'Ikaros au promoteur d' $\epsilon$  n'a pas été encore investiguée dans les cellules érythroïdes fœtales des souris sauvages. Toutefois,

une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a été effectuée avec des cellules érythroleucémiques K562 mais les résultats semblent indiquer qu'Ikaros n'occupe pas la région promotrice du gène  $\epsilon$  (Keys et al., 2008). Cette observation pourrait suggérer qu'Ikaros nécessiterait la coopération d'autres facteurs pour réprimer  $\epsilon$ . On peut aussi envisager la possibilité qu'Ikaros régule positivement l'expression de facteurs de transcription responsable à leur tour de la répression des gènes embryonnaires. Fait intéressant, l'absence d'Ikaros à E12.5 et à E13.5 est associée à une réduction significative de SOX6 alors que l'expression du gène  $\epsilon$  est maintenue élevée. Il se pourrait que chez les souris sauvages, Ikaros participe à l'activation de SOX6 qui à son tour réduit la transcription des gènes embryonnaires. Toutefois, il faut noter qu'aucun site de liaison d'Ikaros n'a été identifié dans la région promotrice de SOX6 suggérant qu'Ikaros pourrait contrôler indirectement le niveau d'expression de SOX6 via d'autres facteurs de transcription (Tableau III-II).

Bien que l'expression des gènes humains de  $\beta$ -globine soit altérée en absence d'Ikaros, la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte survient tout de même suggérant que les mécanismes de répression de  $\gamma$  et d'activation  $\beta$  sont conservés. Il a été démontré qu'EKLF et BCL11A sont des facteurs impliqués dans la répression de  $\gamma$  (Zhou et al., 2010). En absence d'Ikaros à E12.5, il s'avère que leur niveau d'expression est élevé dans les cellules érythroïdes fœtales indiquant que l'élévation d'EKLF et de BCL11A serait nécessaire pour permettre la commutation de l'hémoglobine fœtale-adulte dans un contexte Ikaros-nulle. À noter aussi que des sites de liaison potentiels d'Ikaros sont présents dans les régions régulatrices (promoteurs) d'EKLF et BCL11A (Tableau III-II) suggérant que Ikaros pourrait contrôler directement l'expression de ces facteurs de transcription dans les cellules érythroïdes définitives d'embryons sauvages.

En ce qui concerne le rôle de SOX6 dans le mécanisme de répression de  $\gamma$ , il se pourrait que sa fonction ne soit pas indispensable. D'ailleurs, le niveau d'expression de SOX6 est réduit alors que celui de BCL11A est augmenté en absence d'Ikaros. Des récentes données ont montré que le facteur de transcription SOX6 coopère avec BCL11A pour la répression de  $\gamma$  mais suggèrent toutefois que BCL11A joue un rôle prédominant par rapport à SOX6 dans cette régulation (Sankaran et al., 2010).

### 4.3.2 BP1 humain atténue l'absence d'Ikaros

La surexpression de BP1 humain dans les cellules érythroïdes  $\beta$ -YAC dépourvues d'Ikaros (BP1<sup>43</sup>; Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC) semble mettre en évidence le rôle de BP1 humain dans la régulation des gènes humains  $\epsilon$  et  $\gamma$ . En absence d'Ikaros, la surexpression de BP1 humain accentue l'augmentation d' $\epsilon$  confirmant l'implication de BP1 dans l'activation de ce gène. Cette observation souligne aussi le fait que l'activation du gène embryonnaire  $\epsilon$  par BP1 pourrait être indépendante de la présence d'Ikaros. En outre, nos données suggèrent fortement que BP1 et Ikaros auraient des fonctions opposées quant à la régulation du gène  $\epsilon$  au cours du développement embryonnaire. À ce jour, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer si BP1 active directement le gène  $\epsilon$  en se liant à son promoteur ou indirectement via la répression de SOX6. En effet, il s'avère que la diminution de SOX6 est associée à une élévation d' $\epsilon$  chez BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC à E12.5. Par ailleurs, un site de liaison de BP1 semble avoir été identifié dans SOX6 tel que mentionné précédemment. Toutefois, la dérépression de SOX6 observée chez les embryons BP1<sup>43</sup>; Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC alors que le gène  $\epsilon$  est davantage élevé laisse penser que les mécanismes de régulation du gène  $\epsilon$  par BP1 serait bien plus complexe. Les mécanismes moléculaires impliquant SOX6 restent donc à être élucidés étant donné que ce facteur de transcription peut agir soit en tant qu'activateur soit en tant que répresseur transcriptionnel (Lefebvre, 2010).

L'expression de  $\gamma$  semble diminuer dans les cellules érythroïdes définitives fœtales BP1<sup>43</sup>; Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC à E12.5 et E13.5 suggérant un rôle de BP1 humain dans la répression des gènes fœtaux en absence d'Ikaros. Cette observation indique que la présence de BP1 humain atténue l'altération de l'expression des gènes de  $\beta$ -globine engendrée par la perte d'Ikaros. Toutefois, l'effet de BP1 humain ne semble pas être suffisant pour abolir totalement le retard en absence d'Ikaros puisque la commutation de l'hémoglobine fœtal-adulte a lieu au même âge que Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC soit E12.75. Même si les mécanismes impliqués restent à être définis, l'élévation importante du niveau d'EKLf et BCL11A pourrait expliquer cette situation. En effet, BP1 semble avoir un impact plus important dans l'activation de ces facteurs en absence d'Ikaros à E12.5 (Figure 3.15 et 3.16). Il semblerait donc que BP1 antagonise la perte d'Ikaros en

augmentant considérablement l'expression d'EKLF et indirectement celle de BCL11A, ce qui entraîne une réduction de  $\gamma$  qui persiste à E13.5. D'ailleurs, cette hypothèse semble concorder avec le fait qu'un site de liaison potentiel de BP1 ait été identifié 422 bp en aval du site d'initiation de la transcription du gène murin EKLF. Ainsi, en l'absence d'Ikaros, BP1 pourrait augmenter directement l'expression d'EKLF, ce qui engendrait par la même occasion une augmentation du niveau de BCL11A dans les cellules érythroïdes définitives. Par ailleurs, cette hypothèse semble aussi suggérer la possibilité que les protéines endogènes BP1 et Ikaros soient liées fonctionnellement au niveau post-traductionnelle dans les cellules érythroïdes définitives fœtales des embryons sauvages aux âges embryonnaires E12.5 et E13.5.

À noter que la diminution de  $\gamma$  à E13.5 est associée à une élévation du niveau de  $\beta$  dans les cellules érythroïdes définitives BP1<sup>43</sup>; Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC. Il se pourrait que les niveaux élevés d'EKLF et BCL11A soient responsables de cette situation. En effet, BCL11A pourrait reconfigurer le locus humain de  $\beta$ -globine entre E12.5 et E13.5 de sorte que le  $\beta$ LCR puisse interagir préférentiellement avec le gène adulte  $\beta$  (Sankaran et al., 2010). Une capture de la conformation de la chromatine (3C) pourrait confirmer cette hypothèse et aider à mieux comprendre l'impact de la surexpression de BP1 humain dans la régulation des gènes fœtaux et adultes de  $\beta$ -globine en absence d'Ikaros. De plus, il se pourrait que la dérèpression de SOX6 murin observée à E12.5 soit nécessaire afin de finaliser la répression des gènes fœtaux  $\gamma$  dans les cellules érythroïdes des embryons BP1<sup>43</sup>; Ik<sup>-/-</sup>;  $\beta$ -YAC. Étant donné que le facteur de transcription BCL11A n'occupe pas les promoteurs des gènes fœtaux du locus humain de  $\beta$ -globine (Sankaran et al., 2010), la répression de  $\gamma$  observée pourrait être due à l'action de SOX6.

## Conclusions et perspectives

Notre étude chez les souris transgéniques BP1<sup>43</sup> a permis de montrer que BP1 humain peut non seulement réprimer le gène adulte  $\beta$  mais aussi activer les gènes  $\epsilon$  et  $\gamma$  *in vivo*. Cependant, les mécanismes moléculaires restent à être définis. En effet, il faudra effectuer des analyses par immunoprécipitation de la chromatine afin de déterminer la liaison de BP1 au niveau des promoteurs des gènes fœtaux et adultes. Il sera important de confirmer *in vivo* si BP1 humain lie réellement les silenciers I et II présents dans le promoteur du gène humain  $\beta$ . Par ailleurs, déterminer la conformation de la chromatine par une analyse 3C chez les souris BP1<sup>43</sup>;  $\beta$ -YAC à E12.5 aiderait à avoir une idée de la reconfiguration du locus humain de  $\beta$ -globine en présence de BP1 humain notamment en ce qui concerne l'interaction entre le  $\beta$ -LCR et les gènes de  $\beta$ -globine.

Des données indiquent que BP1 humain pourrait faire partie d'un complexe comprenant les protéines de type HMG capables de créer une torsion de l'ADN. BP1 et HMG pourrait interagir physiquement pour produire un encombrement spatial au niveau de la promoteur du gène adulte  $\beta$  et empêcher des activateurs tels que EKLF de promouvoir l'activation des gènes adultes (Drew et al., 2000). Il sera donc intéressant de vérifier ceci par une immunoprécipitation des protéines. Ceci permettra par la même occasion de déterminer les protéines partenaires de BP1 qui à ce jour restent inconnus. Par ailleurs, la fonction de BP1 dans la régulation des gènes de  $\beta$ -globine pourrait dépendre de l'interaction/présence avec d'autres facteurs de transcriptions tels qu'Ikaros. Cette idée est supportée par la répression des gènes fœtaux et l'activation du gène adulte dans un contexte de surexpression de BP1 en absence d'Ikaros. Nous proposons que BP1 nécessite la présence d'Ikaros pour certaines fonctions dans la régulation des gènes humains de  $\beta$ -globines. Il sera intéressant de vérifier par co-immunoprécipitation si BP1 interagit avec Ikaros dans les cellules érythroïdes définitives des embryons sauvages et transgéniques. Par ailleurs, BP1 semble pouvoir réguler les facteurs EKLF et BCL11A en absence d'Ikaros. Étant donné qu'un site de liaison potentiel de BP1 a été mis en évidence dans la région régulatrice du gène murin EKLF, nous pourrions vérifier par ChIP si le facteur de transcription BP1 lie véritablement cette région d'EKLF pour

confirmer l'hypothèse émise précédemment concernant la participation de BP1 dans la régulation d'EKLF et par extension dans celle de BCL11A.

Plusieurs études dont la nôtre démontrent la présence d'un homologue de BP1 humain chez la souris. Il serait judicieux de procéder à une ablation du gène endogène murin BP1 spécifiquement dans le compartiment érythroïde des souris sauvages. Pour cela, des souris BP1<sup>fl/fl</sup> (sites *loxP* de part et d'autre d'un des exons du gène murin BP1) pourraient être croisées avec des souris *ErGFPCre* dans lesquelles la Cre recombinase, sous le contrôle du promoteur de *EpoR*, est capable de recombiner les gènes flanqués par des sites LoxP uniquement dans les cellules érythroïdes (Heinrich et al., 2004). Ceci pourrait éclairer la fonction de BP1 au cours de l'érythropoïèse.

Chez la souris et l'humain, la protéine BP1 possède un poids moléculaire d'environ 32 kDa alors que la taille prédite est de 26 kDa (Chase et al., 2002). Il se pourrait que le facteur de transcription BP1 subisse des modifications post-traductionnelles nécessaires à sa fonction dans la régulation des gènes de  $\beta$ -globine. Plusieurs études ont mis en évidence que la sumoylation est responsable non seulement de l'augmentation du poids moléculaire des protéines mais surtout de la modification de la fonction des facteurs de transcription (Gomez del Arco, 2005; Siatecka et al., 2007). De plus, la sumoylation est impliquée dans les interactions protéine-protéine. Une désomoylation de la protéine BP1 murine dans les cellules érythroïde fœtales pourrait être envisagée afin de déterminer si ce facteur de transcription est la cible de ce type de modification post-traductionnelle.

# Bibliographie

Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, Chui DHK, Steinberg MH. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*. 2011; 118(1): 19-27.

Ali SA. Milder variant of sickle-cell disease in Arabs in Kuwait associated with unusually high level of foetal haemoglobin. *Br J Haematol*. 1970; 19(5): 613-619.

Anderson KP, Crable SC, Lingrel JB. The GATA-E box-GATA motif in the EKLF promoter is required for in vivo expression. *Blood*. 2000; 95(5): 1652-1655.

Angelucci E, Bai H, Centis F, Bafti MS, Lucarelli G, Ma L, Schrier S. Enhanced macrophagic attack on beta-thalassemia major erythroid precursors. *Haematologica*. 2002; 87(6): 576-583.

Azim AC, Kim AC, Lutchman M, Andrabi S, Peters LL, Chishti AH. cDNA sequence, genomic structure and expression of the mouse demantin gene (Epb4.9). *Mamm Genom*. 1999; 10: 1026-1029.

Baglioni C & Campana T.  $\alpha$ -Chain and Globin: Intermediates in the synthesis of rabbit hemoglobin. *European J Biochem*. 1967 ; 480-492.

Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin : new players, new complexities. *Blood*. 2006; 107: 435-443.

Bard H, Makowski EL, Meschia G, Battaglia FC. The relative rates of synthesis of hemoglobin A and F in immature red cells of newborn infants. *Pediatrics*. 1970 ; 45: 766.

Bard H. Postnatal fetal and adult hemoglobin synthesis in early preterm newborn infants. *J. Clin. Invest*. 1973; 52: 1789-1795.

Bard H. The postnatal decline of hemoglobin F synthesis in normal full-term Infants. *J. Clin. Invest*. 1975; 55: 395-398.

Basu P, Lung TK, Lemsaddek W, Sargent TG, Williams Jr DC, Basu M, Redmond LC, Lingrel JB, Haar JL, Lloyd JA. EKLF and KLF2 have compensatory roles in embryonic  $\beta$ -globin gene expression and primitive erythropoiesis. *Blood*. 2007; 110: 3417-3425.

Basu P, Morris PE, Haar JL, Wani MA, Lingrel JB, Gaensler KML, Lloyd JA. KLF2 is essential for primitive erythropoiesis and regulates the human and murine embryonic  $\beta$ -like globin genes *in vivo*. *Blood*. 2005; 106(7): 2566-2571.

Basu P, Sargent TG, Redmond LC, Aisenberg JC, Kransdorf EP, Wang SZ, Ginder GD, Lloyd JA. Evolutionary conservation of KLF transcription factors and functional conservation of human  $\gamma$ -globin gene regulation in chicken. *Genomics*. 2004; 84: 311-319.

Beauchemin H, Blouin MJ, Trudel M. Differential regulatory and compensatory responses in hematopoiesis/erythropoiesis in  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin hemizygous mice. *J Biol Chem*. 2004; 279: 19471-80.

Beaudoin M. BP1, un gène homéotique distal-less et son rôle dans l'érythropoïèse murine définitive (Mémoire). 2003. Université de Montréal.

Beaven GH, Ellis MJ, White JC. Studies on Human Fœtal Hemoglobin I. Detection and Estimation. *Brit. J Haemat*. 1960 ; 6: 1.

Behringer RR, Ryan TM, Palmiter RD, Brinster RL, Townes TM. Human gamma-to beta-globin gene switching in transgenic mice. *Genes Dev*. 1990; 4(3): 380-389.

Bell AC, West AG, Felsenfeld G. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell*. 1999; 98: 387-396.

Benz EJ Jr, Murnane MJ, Tonkonow BL, Berman BW, Mazur EM, Cavallese C, Jenko T, Snyder EL, Forget BG, Hoffman R. Embryonic-fetal erythroid characteristics of a human leukemic cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77(6): 3509-3513.

Berg PE, Abhyankar S, Chase M. The high mobility group protein HMG-I(Y) binds to a silencer DNA sequence upstream of the human  $\beta$ -globin gene. *Blood*. 1994; 84 Suppl1: 262a.

Berg PE, Mittelman M, Elion J, Labie D, Schechter AN. Increased protein binding to a -530 mutation of the human  $\beta$ -globin gene associated with decreased  $\beta$ -globin synthesis. *Am J Hematol*. 1991; 36(1): 42-47.

Berg PE, Williams DM, Qian RL, Cohen RB, Cao SX, Mittelman M, Schechter AN. A common protein binds to two silencers 5' to the human  $\beta$ -globin gene. *Nucleic Acids Res*. 1989; 17: 8833-8852.

Bernard C. Leçons sur les effets des substances toxiques et médicamenteuses. 1857. Paris: Baillière.

Blouin MJ, Beauchemin H, Wright A, De Paepe M, Sorette M, Bleau AM, Nakamoto B, Ou CN, Stamatoyannopoulos G, Trudel M. Genetic correction of sickle cell disease : insights using transgenic mouse models. *Nat Med*. 2000; 6: 177-182.

Boggs SS, Trevisan M, Patrene K, Georgopoulos K. Lack of natural killer cell precursors in fetal liver of Ikaros knockout mutant mice. *Nat Immunol*. 1998; 16: 137-145.

Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, Gutiérrez L, Grech G, Fanis P, Phylactides M, Verkerk AJ, van der Spek PJ, Scerri CA, Cassar W, Galdies R, van Ijcken W, Özgür Z, Gillemans N, Hou J, Bugeja M, Grosveld FG, von Lindern M, Felice AE, Patrinos GP, Philipsen S. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nature Genet*. 2010; 42(9): 801-805.

Bottardi S, Ross J, Bourgoïn V, Fotouhi-Ardakani N, Affar EB, Trudel M, Milot E. Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human  $\gamma$ -globin genes. *Mol Cell Biol*. 2009; 29(6): 1526-1537.

Boyer SH, Belding TK, Margolet L, Noyes AN. Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F-cells) in normal human adults. *Science*. 1975; 188: 361-363.

Brotherton TW, Chui DHK, Gauldie J, Patterson M. Hemoglobin ontogeny during normal mouse fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76:2853-2857.

Briegel K, Lim KC, Plank C, Beug H, Engel JD, Zenke M. Ectopic expression of a conditional GATA-2/estrogen receptor chimera arrests erythroid differentiation in a hormone-dependent manner. *Genes Dev*. 1993; 7(6): 1097-1109.

Brinster RL, Allen JM, Behringer RR, Gelinas RE, Palmiter RD. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 836-840.

Bulger M, von Doorninck JH, Saitoh N, Telling A, Farrell C, Bender MA, Felsenfeld G, Axel R, Groudine M. Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human  $\beta$ -globin loci: the  $\beta$ -globin genes are embedded within an array of odorant receptor genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 5129-5134.

Bulger M & Groudine M. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev*. 1999; 13: 2465-2477.

Bungert J, Davé U, Lim K-C, Lieu KH, Shavit JA, Liu Q, Engel JD. Synergistic regulation of human  $\beta$ -globin gene switching by locus control region elements HS3 and HS4. *Genes Dev*. 1995; 9:3083-96.

Bungert J, Tanimoto K, Patel S, Liu Q, Fear M, Engel JD. Hypersensitive site 2 specifies a unique function within the human  $\beta$ -globin locus control region to stimulate globin gene transcription. *Mol Cell Biol*. 1999; 19: 3062-3072.

Burgess-Beusse B, Farrell C, Gaszner M, Litt M, Mutskov V, Recillas-Raga F, Simpson M, West A, Felsenfeld G. The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(4): 16433-16437.

Cantor AB, Orkin SH. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*. 2002; 21: 3368-3376.

Cantu C, Lerardi R, Alborelli L, Fugazza C, Cassinelli L, Piconese S, Bosè F, Ottolenghi S, Ferrari G, Ronchi A. SOX6 enhances differentiation in human erythroid progenitors. *Blood*. 2011; 117(13): 3669-3679.

Capp GL, Rigas DA, Jones RT. Hemoglobin Portland I: A new human hemoglobin unique in structure. *Science*. 1967; 157: 65.

Carter D, Chakalova L, Osborne CS, Dai YF, Fraser P. Long-range chromatin regulatory interactions in vivo. *Nat Genet*. 2002; 32: 623-626.

Cavallese R, Tuan D. Modulatory subdomains of the HS2 enhancer differentially regulate enhancer activity in erythroid cells at different developmental stages. *Blood Cells Mol Dis*. 1997; 23: 8-26.

Centis F, Tabellini L, Lucarelli G, Buffi O, Tonucci P, Persini B, Annibaldi M, Emiliani R, Iliescu A, Rapa S, Rossi R, Ma L, Angelucci E, Schrier SL. The importance of erythroid expansion in determining the extent of apoptosis in erythroid precursors in patients with beta-thalassemia major. *Blood*. 2000; 96(10): 3624-3629.

Chakalova L, Osborne CS, Dai YF, Goyenechea B, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis A, Kattamis C, Fraser P. The Corfu  $\delta\beta$  thalassemia deletion disrupts  $\gamma$ -globin gene silencing and reveals post-transcriptional regulation of HbF expression. *Blood*. 2005; 105: 2154-2160.

Charron F, Nemer M. GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol*. 1999; 10, 85-91.

Chase MB, Fu S, Haga SB, Davenport G, Stevenson H, Do K, Morgan D, Mah AL, Berg PE. BP1, a homeodomain-containing isoform of DLX4, represses the beta-globin gene. *Mol Cell Biol*. 2002; 22: 2505-2514.

Chase MB, Haga SB, Hankins WD, Williams DM, Zhigang Bi, Strovel JW, Obriecht C, Berg PE. Binding of HMG-I(Y) elicits structural changes in a silencer of the human  $\beta$ -globin gene. *Am J Hematol*. 1999; 60: 27-35.

Chasis JA. Erythroblastic islands: Specialized microenvironmental niches for erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* . 2006; 13: 137-141.

Chebloune Y, Pagnier J, Trabuchet G, Faure C, Verdier G, Labie D, Nigon V. 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 USA*. 1988; 85(12): 4431-4435.

Chen K, Liu J, Heck S, Chasis JA, An X, Mohandas N. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(41): 17413-8.

Choi OR, Engel JD. Developmental regulation of  $\beta$ -globin gene switching. *Cell*. 1988; 55: 17-26.

Choi T, Huang M, Gorman C, Jaenisch R. A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol*. 1991; 11: 3070-3074.

Chudwin DS, Rucknagel DL. Immunological quantification of hemoglobins F and A<sub>2</sub>. *Clin Chim Acta*. 1974; 50: 413-418.

Chui DHK, Loyer BV. Foetal erythropoiesis in Steel mutant mice. II. Haemopoietic stem cells in foetal livers during development. *Br J Haematol*. 1975; 29:553-565.

Chui DHK, Russell ES. Foetal erythropoiesis in Steel mutant mice. I. A morphological study of erythroid cell development in fetal liver. *Dev Biol*. 1974; 40:256-269.

Chung JH, Bell AC, Felsenfeld G. Characterization of the chicken  $\beta$ -globin insulator. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 575-580.

Chung JH, Whiteley M, Felsenfeld G. A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell*. 1993; 74: 505-514.

Cobb BS, Morales-Alcelay S, Kleiger G, Brown KE, Fisher AG, Smale ST. Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. *Genes Dev*. 2000; 14: 2146-2160.

Cohen-Barak O, Erickson DT, Badowski MS, Fuchs DA, Klassen CL, Harris DT, Brilliant MH. Stem cell transplantation demonstrates that Sox6 represses epsilon y globin expression in definitive erythropoiesis of adult mice. *Exp. Hematol*. 2007; 35, 358-367.

Cohen-Barak O, Hagiwara N, Arlt MF, Horton JP, Brilliant MH. Cloning, characterization and chromosome mapping of the human SOX6 gene. *Gene*. 2001; 265: 157-164.

Cohen-Barak O, Yi Z, Hagiwara N, Monzen K, Komuro I, Brilliant MH. Sox6 regulation of cardiac myocyte development. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31, 5941-5948.

Cohen SM, Bronner G, Kuttner F, Jurgens G, Jackle H. Distal-less encodes a homeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature*. 1989; 338: 432-434.

Collis P, Antoniou M, Grosveld F. Definition of minimal requirements within the human beta-globin gene and the dominant control region for high level expression. *EMBO J*. 1990; 9: 233-240.

Connor F, Cary PD, Read CM, Preston NS, Driscoll PC, Denny P, Crane-Robinson C, Ashworth A. DNA binding and bending properties of the post-meiotically expressed Sry-related protein Sox-5. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22: 3339-3346.

Connor F, Wright E, Denny P, Koopman P, Ashworth A. The Sry-related HMG box-containing gene Sox6 is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse. *Nucleic Acids Res*. 1995; 23: 3365-3372.

Cooley TB, Lee P. A series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. *Trans Am Pediatr Soc*. 1925; 37: 29-30.

Craig ML, Russell ES. A developmental change in hemoglobins correlated with an embryonic red cell population in the mouse. *Dev Biol*. 1964; 10: 191-201.

Crispino JD, Lodish MB, Mackay JP, Orkin SH. Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Mol Cell*. 1999; 3: 219-228.

Crossley M, Tsang AP, Bieker JJ, Orkin SH. Regulation of the erythroid kruppel-like factor (EKLF) gene promoter by the erythroid transcription factor GATA-1. *J Biol Chem*. 1994; 269(22): 15440-15444.

Crossley M, Whitelaw E, Perkins A, Williams G, Fujiwara Y, Orkin SH. Isolation and characterization of the cDNA encoding BKLF/TEF-2, a major CACCC-box-binding protein in erythroid cells and selected other cells. *Mol Cell Biol*. 1996; 16(4): 1695-1705.

Cunningham MJ, Macklin EA, Neufeld EJ, Cohen AR. Complications of  $\beta$ -thalassemia major in North America. *Blood*. 2004; 104: 34-39.

Dan M, Hagiwara A. Detection of two types of hemoglobin (HbA and HbF) in single erythrocytes by fluorescent antibody technique. *Exp Cell Res*. 1967; 46: 596-598.

Deisseroth A, Nienhuis A, Lawrence J, Giles R, Turner P, Ruddle FH. Chromosomal localization of human  $\beta$  globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75: 1456-60.

Dean A, Ley TJ, Humphries RK, Fordis M, Schechter AN. Inducible transcription of five globin genes in K562 human leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 80(18): 5515-5519.

Dillon N, Grosveld F. Human gamma-globin genes silenced independently of other genes in the beta-globin locus. *Nature*. 1991; 350: 252-254.

Dumitriu B, Patrick MR, Petschek JP, Cherukuri S, Klingmuller U, Fox PL, Lefebvre V. Sox6 cell-autonomously stimulates erythroid cell survival, proliferation, and terminal maturation and is thereby an important enhancer of definitive erythropoiesis during mouse development. *Blood*. 2006; 108: 1198-1207.

Dolle P, Price M, Duboule D. Expression of the murine Dlx-1 homeobox gene during facial, ocular and limb development. *Differentiation*. 1992; 49: 93-99.

Donze D, Townes TM, Bieker JJ. Role of the erythroid Krüppel-like factor in human gamma-to beta-globin gene switching. *J Biol Chem*. 1995; 270: 1955-1959.

Drew LR, Tang DC, Berg PE, Rodgers GP. The role of *trans*-acting factors and DNA-bending in the silencing of human  $\beta$ -globin gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(14): 2823-2830.

Driscoll MC, Dobkin CS, Alter BP.  $\gamma\delta\beta$ -Thalassemia due to a *de novo* mutation deleting the 5' $\beta$ -globin gene activation-region hypersensitive site. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 7470-7474.

Drissen R, Palstra RJ, Gillemans N, Splinter E, Grosveld F, Philipsen S, de Laat W. The active spatial organization of the beta-globin locus requires the transcription factor EKLF. *Genes Dev*. 2004; 18(20): 2485-2490.

Drissen R, von Lindern M, Kolbus A, Driegen S, Steinlein P, Beug H, Grosveld F, Philipsen S. The erythroid phenotype of EKLF-null mice: Defects in hemoglobin metabolism and membrane stability. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(12): 5205-5214.

Dumortier A, Kirstetter P, Kastner P, Chan S. Ikaros regulates neutrophil differentiation. *Blood*. 2003; 101: 2219-2226.

Dynan WS, Tjian R. Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell*. 1983; 32: 669-680.

Ebb D, Tang DC, Drew L, Chin K, Berg PE, Rodgers GP. Identification of upstream regulatory elements that repress expression of adult beta-like globin genes in a primitive erythroid environment. *Blood Cells Mol Dis*. 1998; 24(18): 356-369.

Eiymo Mwa Pollo MS. Caractérisation du rôle de la protéine homéotique BP1 dans la régulation des gènes adultes de  $\beta$ -globine (Mémoire). 2007. Université de Montréal.

Eiymo Mwa Pollo MS, Beaudoin M, Berg PE, Beauchemin H, D'Agati V, Trudel M. BP1 is a negative modulator of definitive erythropoiesis. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(18): 5232-5237.

Elion J, Berg PE, Lapoumeroulie C, Trabuchet G, Mittelman M, Krishnamoorthy R, Schechter AN, Labie D. 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*. 1992; 79(3): 787-792.

Ellis J, Tanun KC, Harper A, Michalovich D, Yannoutsos N, Philipsen S, Grosveld F. A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human beta-globin locus control region. *EMBO*. 1996; 15: 562-568.

Engel JD, Tanimoto K. Looping, linking and chromatin activity: New insights into  $\beta$ -globin locus regulation. *Cell*. 2000; 100: 499-502.

Enver T, Raich N, Ebens AJ, Papayannopoulou T, Costantini F, Stamatoyannopoulos G. Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. *Nature*. 1990; 344(6264): 309-313.

Epner E, Reik A, Cimborra D, Telling A, Bender MA, Fiering S, Enver T, Martin DIK, Kennedy M, Keller G, Groudine M. The  $\beta$ -globin LCR is not necessary for an open chromatin structure or developmentally regulated transcription of the native mouse  $\beta$ -globin locus. *Mol Cell*. 1998; 2: 447-455.

Evans T, Reitman M, Felsenfeld G. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85: 5976-5980.

Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*. 1971; 10(13): 2606-2617.

Fantoni A, de la Chapelle A, Marks PA. Synthesis of embryonic hemoglobins during erythroid cell development in fetal mice. *J Biol Chem*. 1969; 244: 675-681.

Fantoni A, de la Chapelle A, Rifkind RA, Marks PA. Erythroid cell development in fetal mice: synthetic capacity for different proteins. *J Mol Biol*. 1968; 33: 79-81.

Feng WC, Southwood CM, Bieker JJ. Analyses of  $\beta$ -thalassemia mutant DNA interactions with erythroid Krüppel-like factor (EKLF), an erythroid cell-specific transcription factor. *J Biol Chem*. 1994; 269: 1493-1500.

Ferkowicz MJ, Yoder MC. Blood island formation: Longstanding observations and modern interpretations. *Exp hematol*. 2005; 33: 1041-1047.

Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J*. 1992; 11: 4497-4506.

Ferrari N, Palmisano GL, Paleari L, Basso G, Mangioni M, Fidanza V, Albini A, Croce CM, Levi G, Brigati C. DLX genes as targets of ALL-1: DLX 2, 3, 4 down-regulation in t(4;11) acute lymphoblastic leukemias. *J Leukoc Biol.* 2003; 74(2): 302-305.

Festenstein R, Tolaini M, Corbella P, Mamalaki C, Parrington J, Fox M, Miliou A, Jones M, Kioussis D. Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. *Science.* 1996; 271: 1123-1125.

Finch CA, Deubelbeiss K, Cook JD, Eschbach JW, Harker LA, Funk DD, Marsaglia G, Hillman RS, Slichter S, Adamson JW, Ganzoni A, Biblett ER. Ferrokinetics in man. *Medecine.* 1970; 49(1): 17-53.

Forrester WC, Epner E, Driscoll MC, Enver T, Brice M, Papayannopoulou T, Groudine M. 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.* 1990; 4: 1637-1649.

Forrester WC, Thompson C, Elder JT, Groudine M. A developmentally stable chromatin structure in the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83: 1359-1363.

Fox AH, Kowalski K, King GF, Mackay JP, Crossley M. Key residues characteristic of GATA N-fingers are recognized by FOG. *J Biol Chem.* 1998; 273: 33595-33603.

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

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

Frazer ST, Isern J, Baron MH. Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell-surface antigen expression. *Blood.* 2007; 109: 343-352.

Frenette PS & Atweh GF. Sickle cell disease : old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest.* 2007; 117: 850-858.

Friedmann M, Holth LT, Zoghbi HY, Reeves R. Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(18): 4259-4267.

Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 12355-12358.

- Fujiwara Y, Chang AN, Williams AM, Orkin SH. Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development. *Blood*. 2004; 103, 583-585.
- Fukuda M. Tumor-promoting phorbol diester-induced specific changes in cell surface glycoprotein profile of K562 human leukemic cells. *Cancer Res*. 1981; 41(11): 4621-4628.
- Fu S, Stevenson H, Strovel JW, Haga SB, Stamberg J, Do K, Berg PE. Distinct functions of two isoforms of a homeobox gene, BP1 and DLX7, in the regulation of the  $\beta$ -globin gene. *Gene*. 2001; 278: 131-139.
- Gaensler KM, Burmeister M, Brownstein BH, Taillon-Miller P, Myers RM. Physical mapping of yeast artificial chromosomes containing sequences from the human  $\beta$ -globin gene region. *Genomics*. 1991; 10: 976-984.
- Gaensler KM, Kitamura M, Kan YW. Germ-line transmission and developmental regulation of a 150-Kb yeast artificial chromosome containing the human  $\beta$ -globin locus in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 11381-11385.
- Gaensler KM, Zhang Z, Lin C, Yang S, Hardt K, Flebbe-Rehwaldt L. Sequences in the  $^A\gamma$ - $\beta$  intergenic region are not required for stage-specific regulation of the human  $\beta$ -globin gene locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 3374-3379.
- Gahmberg CG, Jokinen M, Anderson LC. Expression of major sialoglycoprotein (glycophorin) on erythroid cells in human bone marrow. *Blood*. 1978. 52(2): 379-387.
- Gale R, Clegg J, Huehns E. Human embryonic hemoglobins Gower-1 and Gower-2. *Nature*. 1979; 280: 162-164.
- Georgopoulos K. Hematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and Ikaros. *Nat Rev Immuno*. 2002; 2: 162-174.
- Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, Molnar A, Wu P, Winandy S, Sharpe A. The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell*. 1994; 79(1): 143-156.
- Georgopoulos K, Moore DD, Derfler B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science*. 1992; 258: 808-812.
- Gibney GT, Panhuysen CI, So JC, Ma ES, Ha SY, Li CK, Lee AC, Li CK, Yuen HL, Lau YL, Johnson DM, Farrell JJ, Bisbee AB, Farrer LA, Steinberg MH, Chan LC, Chui DH. Variation and heritability of Hb F and F-cells among beta-thalassemia heterozygotes in Hong Kong. *Am J Hematol*. 2002; 83(6): 458-464.
- Gilman J.G. Mouse hemoglobin beta chains: comparative sequence data on adult major and minor beta chain from two species. *Biochem J*. 1976; 159:43-53.

Gomez-del Arco P, Koipally J, Georgopoulos K. Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(7): 2688-2697.

Granick S, Levere RD. Heme synthesis in erythroid cells. *Progress in Hematology.* 1964; 1-47.

Grass JA, Boyer ME, Pal S, Wu J, Weiss MJ, Bresnick EH. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 8811-8816.

Gregory CJ, Eaves AC. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood.* 1978; 51: 527-537.

Gregory RC, Taxman DJ, Seshasayee D, Kesinger MH, Bieker JJ, Wojchowski DM. Functional interaction of GATA1 with erythroid Kruppel-like factor and Sp1 at defined erythroid promoter. *Blood.* 1996; 87: 1793-1801.

Gribnau J, Diderich K, Pruzina S, Calzolari R, Fraser P. Intergenic transcription and developmental remodeling of chromatin structure in the human  $\beta$ -globin locus. *Mol Cell.* 2000; 5: 377-386.

Grosso M, Amendolara M, Rescigno G, Danise P, Todisco N, Izzo P, Amendola G. Delayed decline of gamma-globin expression in infant age associated with the presence of Ggamma-158 (C→T) polymorphism. *Int J Lab Hematol.* 2008; 30(3): 191-195.

Grosveld F, Blom van Assendelft G, Greaves DR, Kollias G. Position-independent, high-level expression of the human  $\beta$ -globin gene in transgenic mice. *Cell.* 1987; 51(6): 975-985.

Guy LG, Mei Q, Perkins AC, Orkin SH, Wall L. Erythroid Kruppel-like factor is essential for beta-globin gene expression even in absence of gene competition, but is not sufficient to induce switch from gamma-globin to beta-globin gene expression. *Blood.* 1998; 91(7): 2259-2263.

Haar JL, Ackerman GA. A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *Anat Rec.* 1971; 170:199-224.

Haga SB, Fu S, Karp JE, Ross DD, William DM, Hankins WD, Behm F, Ruscetti FW, Chang M, Smith BD, Becton D, Raimondi SC, Berg PE. BP1, a new homeobox gene, is frequently expressed in acute leukemias. *Leukemia.* 2000; 14: 1867-1875.

Hagiwara N, Klewer SE, Samson RA, Erickson DT, Lyon MF, Brilliant MH. Sox6 is a candidate gene for p100H myopathy, heart block, and sudden neonatal death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 4180-4185.

Hagiwara N, Yeh M, Liu A. Sox6 is required for normal fiber type differentiation of fetal skeletal muscle in mice. *Dev Dyn.* 2007; 236: 2062-2076.

Hagen G, Muller S, Beato M, Suske G. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related gene. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 5519-5525.

Hahm K, Cobb BS, McCarty AS, Brown KE, Klug CA, Lee R, Akashi K, Weissman IL, Fisher AG, Smale ST. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev.* 1998; 12: 782-796.

Hahm K, Ernst P, Lo K, Kim GC, Turck C, Smale ST. The lymphoid transcription factor Lyf-1 is encoded by specific alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. *Mol Cell Biol.* 1994; 14(11): 7111-7123.

Hahn EV and Gillespie EB. Sickle cell anemia. *Arch Int Med.* 1927; 39: 233.

Haire RN, Miracle AL, Rast JP, Litman GW. Members of the Ikaros gene family are present in early representative vertebrates. *J Immunol.* 2000; 165: 306-312.

Harju S, McQueen KJ, Peterson KR. Chromatin structure and Control of  $\beta$ -like globine gene switching. *Exp Biol Med.* 2002; 227(9): 683-700.

Hecht F, Motulsky A, Lemire R, Shepard T. Predominance of human hemoglobin Gower-1 in early human embryonic development. *Science.* 1966; 152: 91-92.

Heinrich AC, Pelanda R, Klingmüller U. A mouse model for visualization and conditional mutations in the erythroid lineage. *Blood.* 2004; 104: 659-666.

Henderson LJ. Blood: a study in general physiology. New Haven. Yale University Press. 1928; pp 1-297.

Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Int Med* 1910 6 : 517-521.

Higgs D. Do LCRs open chromatin domains? *Cell.* 1998; 95: 299-302.

Ho PJ, Hall GW, Luo LY, Weatherall DJ, Thein SL. Beta-thalassemia intermedia : is it possible to consistently predict phenotype from genotype ? *Br J Haematol.* 1998; 100: 70-78.

Hodge D, Coghill E, Keys J, Maguire T, Hartmann B, McDowall A, Weiss M, Grimmond S, Perkins A. A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood.* 2006; 107(8): 3359-3370.

Horack CE, Mahajan MC, Luscombe NM, Gerstein M, Weissman SM, Snyder M. GATA-1 binding sites mapped in the  $\beta$ -globin locus by using mammalian ChIP-ChIP analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 2924-2929.

Hosoi T. Studies on hemoglobin F within single erythrocyte by fluorescent antibody technique. *Exp Cell Res*. 1965; 37: 680-683.

Hoyer JD, Penz CS, Fairbanks VF, Hanson CA, Katzmann JA. Flow cytometric measurement of hemoglobin F in RBCs: diagnostic usefulness in the distinction of hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) and hemoglobin S-hPFH from other conditions with elevated levels of hemoglobin F. *Am. J. Clin. Pathol*. 2002; 117(6): 857-863.

Hu X, Bi J, Loh HH, Wei LN. An Intronic Ikaros-binding Element Mediates Retinoic Acid Suppression of the Kappa Opioid Receptor Gene, Accompanied by Histone Deacetylation on the Promoters. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(7): 4597-4603.

Huehns ER, Flynn FV, Butler EA, Beaven GH. Two new haemoglobin variants in a very young embryo. *Nature*. 1961; 189: 496-497.

Huehns E, Dance N, Beaven G, Hecht F, Motulsky A. Human embryonic hemoglobins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1964; 29: 327-331.

Huehns E, Beaven G. Developmental changes in human hemoglobins. *Clin Dev Med*. 1971; 37: 175-203.

Hünefeld, F. L. Die Chemismus in der thierischen Organization. Brockhaus: Leipzig. 1840; 158-163.

Hutton JJ, Bishop J, Schweet R, Russell ES. Hemoglobin inheritance in inbred strains I. Structural differences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962; 48: 1505-1513.

Hutton JJ., Bishop J, Schweet R, Russell ES. Hemoglobin inheritance in inbred strains II. Genetic studies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962; 48: 1718-1724.

Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou I, Seki S, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Ikegawa S, Chung UI. The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum*. 2004; 50: 3561-3573.

Ingram VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anemia haemoglobin. *Nature*. 1956; 178:792-794.

Ingram VM. Embryonic red blood cell formation. *Nature*. 1972; 235: 338-339.

Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature*. 1957; 180: 326-328.

Ingram VM, Stretton AO. Genetic basis of the thalassaemia diseases. *Nature*. 1959; 184: 1903-1909.

Irwin JJ, Kirchner JT. Anemia in children. *Am Fam Physician*. 2001; 64(8): 1379-1387.

Isern J, Fraser ST, He Z, Baron MH. The fetal liver is a niche for maturation of primitive erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(18): 6662-7.

Jackson JD, Petrykowska H, Philipsen S, Miller W, Hardison R. Role of DNA sequences outside the cores of DNase hypersensitive sites (HSs) in functions of the  $\beta$ -globin locus control region. Domain opening and synergism between HS2 and HS3. *J Biol Chem*. 1996; 271: 11871-11878.

Jane SM, Cunningham JM. Molecular mechanisms of hemoglobin switching. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996; 28: 1197-1209.

Jarman AP, Higgs DR. Nuclear scaffold attachment sites in the human globin gene complexes. *EMBO J*. 1988; 7: 3337-3344.

Jia CP, Huang SZ, Yan JB, Xiao YP, Ren ZR, Zeng YT. Effects of human locus control region elements HS2 and HS3 on human  $\beta$ -globin gene expression in transgenic mouse. *Blood cells Mol Dis*. 2003; 31: 360-369.

Ji RP, Phoon CKL, Aristizabal O, McGrath KE, Palis J, Turnbull DH. Onset of cardiac function during early mouse embryogenesis coincides with entry of primitive erythroblasts into the embryo proper. *Circ Res*. 2003; 92:133-135.

Kar BC, Satapathy RK, Kulozik AE, Kulozik M, Sirt S, Serjeant BE, Serjeant GR. Sickle cell disease in Orissa State, India. *Lancet*. 1986; 2(8517): 1198-1201.

Kelley CM, Ikeda T, Koipally J, Avitahl N, Wu L, Georgopoulos K, Morgan BA. Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol*. 1998; 8: 508-515.

Kennedy M, Firpo M, Choi K, Wall C, Robertson S, Kabrun N, Keller G. A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature*. 1997; 386: 488-493.

Keys JR, Tallack MR, Zhan Y, Papathanasiou P, Goodnow CC, Gaensler KM, Crossley M, Dekker J, Perkins AC. A mechanism for Ikaros regulation of human globin gene switching. *Br J Haematol*. 2008; 141(3): 398-406.

Kingsley C, Winoto A. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol cell Biol.* 1992; 12: 4251-4261.

Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo K, Palis J. Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood.* 2004; 104:19-25.

Kirstetter P, Thomas M, Dierich A, Kastner P, Chan S. Ikaros is critical for B cell differentiation and function. *Eur J Immunol.* 2002; 32: 720-730.

Klug CA, Morrison SJ, Masek M, Hahn K, Smale ST, Weissman IL. Hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors express different Ikaros isoforms, and Ikaros is localized to heterochromatin in immature lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 657-662.

Ko LJ, Engel JD. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: 4011-4022.

Kohn J, Payne BV. An immunological method for the detection and characterization of fetal haemoglobin. *J Clin Pathol.* 1972; 25: 830-831.

Kong S, Bohl D, Li C, Tuan D. Transcription of the HS2 enhancer towards a *cis*-linked gene is independent of the orientation, position and distance of the enhancer relative to the gene. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 3955-3965.

Kulozik AE, Wainscoat JS, Serjeant GR, Kar BD, Al-Awamy B, Essan GJF, Falusi AG, Haque SK, Hilali AM, Kate S, Ranasinghe WAEP, Weatherall DJ. Geographical survey of  $\beta^s$ -globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. *Am J Hum Genet.* 1986; 39(2): 239-241.

Kuo CT, Veselits ML, Barton KP, Lu MM, Clendenin C, Leiden JM. The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis. *Genes Dev.* 1997; 11: 2996-3006.

Kurata, H, Mancini, GC, Alespieti G, Migliaccio AR, Migliaccio G. Stem cell factor induces proliferation and differentiation of fetal progenitor cells in the mouse. *Br. J. Haematol.* 1998; 101: 676-687.

Labie D, Richin C, Pagnier J, Gentilini M, Nagel RL. Hemoglobins S and C in Upper Volta. *Hum Genet.* 1984; 65(3): 300-302.

Lapoum roulie C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Mony-Lob  M, Bodo JM, Carnevale P, Labie D, Elion J, Krishnamoorthy R. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Hum Genet.* 1992; 89(3): 333-337.

Laverri re AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem.* 1994; 269: 23177-23184.

Lawn RM, Fritsch EF, Parker RC, Blake G, Maniatis T. The isolation and characterization of linked  $\delta$ - and  $\beta$ -globin genes from a cloned library of human DNA. *Cell*. 1978; 15: 1157-74.

Lefebvre V. The SoxD transcription factors - Sox5, Sox6, and Sox13- are key cell fate modulators. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42(3): 429-432.

Leonard M, Brice M, Engel JD, Papayannopoulou T. Dynamics of GATA transcription factor expression during erythroid differentiation. *Blood*. 1993; 82: 1071-1079.

Letovsky J, Dynan WS. Measurement of the binding of transcription factor SP1 to a single GC box recognition sequence. *Nucleic acids Res*. 1989; 17: 2639-2653.

Levine M, Rubin GM, Tijan R. Human DNA sequences homologous to a protein coding region conserved between homeotic genes of *Drosophila*. *Cell*. 1984; 38: 667-673.

Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. 1978; 276: 565-570.

Lette G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araujo AS, Uda M, Sanna S, Cao A, Schlessinger D, Costa FF, Hirschhorn JN, Orkin SH. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(33): 11869-11874.

Levine M, Hoey T. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell*. 1988; 55: 537-540.

Li G, Lim KC, Engel JD, Bungert J. Individual LCR hypersensitive sites cooperate to generate an open chromatin domain spanning the human  $\beta$ -globin locus. *Genes Cells*. 1998; 3(7): 415-429.

Li J, Noguchi CT, Miller W, Hardison R, Schechter AN. Multiple regulatory elements in the 5'-flanking sequence of the human  $\epsilon$ -globin gene. *J Biol Chem*. 1998; 273: 10202-10209.

Li Q, Stamatoyannopoulos G. Hypersensitive site 5 of the human  $\beta$ -locus control region functions as a chromatin insulator. *Blood*. 1994; 84: 1399-1401.

Li Q, Zhang M, Han H, Rohde A, Stamatoyannopoulos G. 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*. 2002; 30: 2484-2491.

Lim SK, Bieker JJ, Lin CS, Costantini F. A shortened life span of *EKLF*<sup>-/-</sup> adult erythrocytes, due to a deficiency of beta-globin chains, is ameliorated by human gamma-globin chains. *Blood*. 1997; 90: 1291-1299.

Lopez RA, Schoetz S, DeAngelis K, O'Neill D, Bank A. Multiple hematopoietic defects and delayed globin switching in Ikaros null mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99(2): 602-607.

Machnicka B, Grochowalska R, Boguslawska DM, Sikorski AF, Lecomte MC. Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69: 191-201.

Maier-Redelsperger M, Noguchi CT, de Montalembert M, Rodgers GP, Schechter AN, Gourbil A, Blanchard D, Jais JP, Ducrocq R, Peltier JY, Cottat MC, Lacaille F, Belloy M, Elion J, Labie D, Girot R. Variation in fetal hemoglobin parameters and predicted hemoglobin S polymerisation in sickle cell children in the first two years of life: Parisian prospective study on sickle cell disease. *Blood*. 1994; 84(9): 3182-3188.

Menzel S, Garner C, Gut I, Matsuda F, Yamaguchi M, Heath S, Foglio M, Zelenika D, Boland A, Rooks H, Best S, Spector TD, Farrall M, Lathrop M, Thein SL. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2q15. *Nat Genet*. 2007; 39(10): 1197-1199.

Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. *J Clin Pathol*. 1965; 18(6): 790-792.

Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell*. 1997; 89: 619-628.

Marks, P. A., and Rifkind, R. A. Protein synthesis: Its control in erythropoiesis. *Science*. 1972; 175: 955-961.

Martin DIK, Orkin SH. Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev*. 1990; 4: 1886-1898.

Martin DIK, Tsai SF, Orkin SH. Increased  $\gamma$ -globin expression in a nondeletion HPHF mediated by an erythroid-specific DNA binding factor. *Nature* (London). 1990; 338: 435-438.

Martin DIK, Zon LI, Mutter G, Orkin SH. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature*. 1990; 344: 444-447.

Matsumoto N, Kubo A, Liu H, Akita K, Laub F, Ramirez F, Keller G, Friedman SL. Developmental regulation of yolk sac hematopoiesis by Krüppel-like factor 6. *Blood*. 2006; 107: 1357-1365.

Maximow AA. Untersuchungen über blut und bindegewebe 1. Die frühesten entwicklungsstadien der blut- und binde-gewebszellen beim saugtierembryo, bis zum anfang der blutbildung und der leber. *Arch Mikroskop Anat*. 1909; 73:444-561.

McGrath KE, Koniski AD, Malik J, Palis J. Circulation is established in a step-wise pattern in mammalian embryo. *Blood*. 2003; 101: 1669-1676.

Merika M, Orkin SH. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol*. 1993; 13: 3999-4010.

Merika M, Orkin SH. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins SP1 and EKLF. *Mol Cell Biol*. 1995; 15: 2437-2447.

Merry AH, Thomson EE, Anstee DJ, Stratton F. The quantification of erythrocyte antigen sites with monoclonal antibodies. *Immunology*. 1984; 51(4): 793-800.

Mignotte V, Eleouet F, Raich N, Romeo PH. Cis- and trans-acting elements involved in the regulation of the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 6548-6551.

Mignotte V, Wall L, deBoer E, Grosveld F, Romeo PH. Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res*. 1989; 17: 37-54.

Miller IJ, Bieker JJ. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol*. 1993; 13: 2776-2786.

Milot E, Fraser P, Grosveld F. Position effects and genetic disease. *Trends Genet*. 1996; 12: 123-126.

Milot E, Strouboulis J, Trimborn T, Wijgerde M, de Boer E, Langeveld A, Tan-Un K, Vergeer W, Yannoutsos N, Grosveld F, Fraser P. Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell*. 1996; 87:105-114.

Minegishi N, Ohta J, Suwabe N, Nakauchi H, Ishihara H, Hayashi N, Yamamoto M. Alternative promoters regulate transcription of the mouse GATA-2 gene. *J Biol Chem*. 1998; 273(6): 3625-3634.

Molete JM, Petrykowska H, Bouhassira EE, Feng YQ, Miller W, Hardison RC. Sequences flanking hypersensitive sites of the  $\beta$ -globin locus control region are required for synergistic enhancement. *Mol Cell Biol*. 2001; 21: 2969-2980.

Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem*. 2000; 275: 38949-3895294.

Molnar A, Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol*. 1994; 14: 8292-8303.

Molnar A, Wu P, Largespada DA, Vortkamp A, Scherer S, Copeland NG, Jenkins NA, Bruns G, Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. *J Immunol.* 1996; 156: 585-592.

Morasso MI, Grinberg A, Robinson G, Sargent TD, Mahon KA. Placenta failure in mice lacking the homeobox gene *Dlx3*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(1): 162-167.

Morasso MI, Radoja N. *Dlx* genes, p63, and ectodermal dysplasias. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2005; 75(3): 163-171.

Morgan B, Sun L, Avitahl N, Andrikopoulos K, Ikeda T, Gonzales E, Wu P, Neben S, Georgopoulos K. Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J.* 1997; 16(8): 2004-2013.

Morioka K, Tone S, Mukaida M, Takano-Ohmuro H. The apoptotic and nonapoptotic nature of the terminal differentiation of erythroid cells. *Exp Cell Res.* 1998; 240:206-217.

Morley BJ, Abbott CA, Sharpe JA, Lida J, Chan-Thomas PS, Wood WG. A single  $\beta$ -globin locus control region element (5' hypersensitive site 2) is sufficient for developmental regulation of human globin genes in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 1992; 12: 2057-2066.

Morris L, Crocker PR, Gordon S. Murine fetal liver macrophages bind developing erythroblasts by a divalent cation-dependent hemagglutinin. *J Cell Biol.* 1988; 106: 649-656

Nakamura S, Stock DW, Wydner KL, Bollekens JA, Takeshita K, Nagai BM, Chiba S, Kitamura T, Freeland TM, Zhao Z, Minowada J, Lawrence JB, Weiss KM, Ruddle FH. Genomic analysis of a new mammalian distal-less gene: *Dlx-7*. *Genomics.* 1996; 38: 314-324.

Nathan DG, Gunn RB. Thalassemia: the consequences of unbalanced hemoglobin synthesis. *Am J Med.* 1966; 41(5): 815-830.

Neel JV. The inheritance of sickle cell anemia. *Science.* 1949; 110: 64-66.

Nerlov C, Querfurth E, Kulesa H, Graf T. GATA-1 interacts with the myeloid PU. 1 transcription factor and represses PU. 1-dependent transcription. *Blood.* 2000; 95: 2543-2551.

Neumeyer P, Betke K. Haemoglobin A2 in newborn infants of different maturity. *Eur J Pediatric.* 1987; 146: 598-600.

Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Neben S, Friedrich C, Georgopoulos K. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med*. 1999; 190: 1201-1214.

Nicolis S, Ronohi A, Margaretti N, Mantovani R, Giglioni B, Ottolenghi S. Increased erythroid-specific expression of mutated HPFH  $\gamma$ -globin promoter requires the erythroid factor NFE-1. *Nucleic Acids Res*. 1989; 17: 5509-5516.

Nuez B, Michalovich D, Bygrave A, Ploemacher R, Grosveld F. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature*. 1995; 375(6529): 316-318.

Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkova V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet*. 2001; 17: 520-527.

O'Neill DW, Bornschlegel K, Flamm M, Castle M, Bank A. A DNA-binding factor in adult hematopoietic cells interacts with a pyrimidine-rich domain upstream from the  $\delta$ -globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 8953-8957.

O'Neill DW, Schoetz SS, Lopez RA, Castle M, Rabinowitz L, Shor E, Krawchuk D, Goll MG, Renz M, Seelig HP, Han S, Seong RH, Park SD, Agalioti T, Munshi N, Thanos D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bank A. An Ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol Cell Biol*. 2000; 20(20): 7572-7582.

O'Neill DW, Yang J, Erdjument-Bromage H, Bornschlegel K, Tempst P, Bank A. Tissue-specific and developmental stage-specific DNA binding by a mammalian SWI/SNF complex associated with human fetal-to-adult globin gene switching. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 349-354.

Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*. 1992; 80: 575-581.

Orkin SH, Antonarakis SE, Kazazian HH Jr. Base substitution at position -88 in a beta-thalassemic globin gene. Further evidence for the role of distal promoter element ACACCC. *J Biol Chem*. 1984; 259: 8679-8681.

Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Waber PG, Giardina PJ. Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. *Nature*. 1982; 296(5858): 627-631.

Orlic D, Anderson S, Biesecker LG, Sorrentino BP, Bodine DM. Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and *c-myb* and low levels or no mRNA for *c-fms* and the receptors for granulocyte colony-stimulating factor and interleukins 5 and 7. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 4601-4605.

Osada H, Grutz G, Axelson H, Forster A, Rabbitts TH. Association of erythroid transcription factors : Complexes involving the LIM protein RBTN2 and the zinc-finger protein GATA1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 9585-9589.

Osada H, Grutz G, Axelson H, Forster A, Rabbitts TH. LIM-only protein Lmo2 forms a protein complex with erythroid transcription factor GATA-1. *Leukemia*. 1997; 3:307-312.

Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, Labie D. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81(6): 1771-1773.

Palis J. Developmental biology: no red cell is an island. *Nature*. 2004; 432: 964-965.

Palstra RJ, Tolhuis B, Splinter E, Nijmeijer R, Grosveld F, de Laat W. The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat Genet*. 2003; 35(2): 190-194.

Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983; 33: 967-978.

Pang CJ, Lemsadekk W, Alhashem YN, Bondzi C, Redmond LC, Ah-Son N, Dumur CI, Archer KJ, Haar JL, Lloyd JA, Trudel M. Krüppel-like factor 1 (KLF1), KLF2 and Myc control a regulatory network essential for embryonic erythropoiesis. *Mol Cell Biol*. 2012; 32(13): 2628-2644.

Papathanasiou P, Perkins AC, Cobb BS, Ferrini R, Sridharan R, Hoynes GF, Neims KA, Smal ST, Goodnow CC. Widespread failure of hematolymphoid differentiation caused by a recessive niche-filling allele of the Ikaros transcription factor. *Immunity*. 2003; 19(1): 131-144.

Paszy C, Brion CM, Mancini E, Witkowska E, Stevens ME, Mohandas N, Rubin EM. Transgenic Knockout Mice with Exclusively Human Sickle Hemoglobin and Sickle Cell Disease. *Science*. 1997; 278(5339): 876-878.

Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science*. 1949; 110: 543-548.

Payne KJ, Nicolas JH, Zhu JY, Barsky LW, Crooks GM. Cutting Edge: Predominant expression of a novel Ikaros isoform in normal human hemopoiesis. *J Immunol*. 2001; 167: 1867-1870.

Pearson R, Fleetwood J, Eaton S, Crossley M, Bao S. Kruppel-like transcription factors: a functional family. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(10): 1996-2001.

Perdomo J, Holmes M, Chong B, Crossley M. Eos and Pegasus, two members of the Ikaros family of proteins with distinct DNA binding activities. *J Biol Chem.* 2000; 275: 38347-38354.

Perkins AC, Gaensler KM, Orkin SH. Silencing of human fetal globin expression is impaired in the absence of the adult  $\beta$ -globin gene activator protein EKLf. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 12267-12271.

Perkins AC, Peterson KR, Stamatoyannopoulos G, Witkowska HE, Orkin SH. Fetal expression of a human  $A\gamma$  globin transgene rescues globin chain imbalance but not hemolysis in EKLf null mouse embryos. *Blood.* 2000; 95: 1827-1833.

Perkins AC, Sharpe AH, Orkin SH. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLf. *Nature.* 1995; 375(6529): 318-322.

Perrine RP, Brown MJ, Clegg JB, Weatherall DJ, May A. Benign sickle-cell anaemia. *Lancet.* 1972; 2: 1163-1167.

Perrine RP, Pembrey ME, John P, Perrine S, Shoup F. Natural history of sickle cell anemia in Saudi Arabs. A study of 270 subjects. *Ann Intern Med.* 1978; 88(1): 1-6.

Persons DA, Allay JA, Allay ER, Ashmun RA, Orlic D, Jane SM, Cunningham JM, Nienhuis AW. Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. *Blood.* 1999; 93(2):488-499.

Perutz MF, Rossman MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North ACT. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5Å resolution, obtained by x-ray analysis. *Nature.* 1960; 185: 416-422.

Peschle C, Mavilio F, Care A, Migliaccio G, Migliaccio AR, Salvo G, Samoggia P, Petti S, Guerriero R, Marinucci M. Haemoglobin switching in human embryos: asynchrony of  $\zeta \rightarrow \alpha$  and  $\epsilon \rightarrow \gamma$ -globin switches in primitive and definitive erythropoietic lineage. *Nature.* 1985; 313: 235-238.

Peterson KR, Clegg CH, Navas PA, Norton EJ, Kimbrough TG, Stamatoyannopoulos G. Effect of deletion of 5'HS3 or 5'HS2 of the human  $\beta$ -globin LCR on the developmental regulation of globin gene expression in  $\beta$ -YAC transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 6605-6609.

Peterson KR, Li QL, Clegg CH, Furukawa T, Navas PA, Norton EJ, Kimbrough TG, Stamatoyannopoulos G. Use of yeast artificial chromosomes (YACs) in studies of mammalian development: Production of  $\beta$ -globin locus YAC mice carrying human globin developmental mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 5655-5659.

- Pevny L, Lin CS, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, Costantini F. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development*. 1995; 121: 163-172.
- Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH, Costantini F. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*. 1991; 349: 257-260.
- Philipsen S, Pruzina S, Grosveld F. The minimal requirements for activity in transgenic mice of hypersensitive site 3 of the beta globin locus control region. *EMBO*. 1993; 12: 1077-1085.
- Philipsen S, Suske G. A tale of three fingers : the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 1999; 27(15): 2991-3000.
- Philipsen S, Talbot D, Fraser P, Grosveld F. The beta-globin dominant control region : hypersensitive site 2. *EMBO*. 1990; 9: 2159-2167.
- Popp R.A. Sequence of amino acids in the  $\beta$  chain of single hemoglobins from C57BL, SWR, and NB mice. *Biochim Biophys Acta*. 1973; 303: 52-60.
- Pootrakul P, Sirankapracha P, Hemsorach S, Mounsub W, Kumbunlue R, Piangitjagum A, Wasi P, Ma L, Schrier SL. A correlation of erythrokinetics, ineffective erythropoiesis, and erythroid precursor apoptosis in thai patients with thalassemia. *Blood*. 2000; 96(7) : 2606-2612.
- Porcu S, Poddie D, Melis M, Cao A, Ristaldi MS.  $\beta$ -Minor globin gene expression is preferentially reduced in EKLF Knock-Out mice. *Gene*. 2005; 351:11-17.
- Price JA, Bowden DW, Wright JT, Pettenati MJ, Hart TC. Identification of a mutation in DLX3 associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome. *Hum Mol Genet*. 1998; 7: 563-569.
- Proudfoot NJ, Baralle FE. Molecular cloning of human  $\epsilon$ -globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 5435-9.
- Qian RL, Chen YD, Song QB, Hu YL. Binding of HMG proteins to the 5'-flanking sequence of human beta-globin gene. *Sci China B*. 1993; 36(1): 81-88.
- Quinn LM, Johnson BV, Nicholl J, Sutherland GR, Kalionis B. Isolation and identification of hemeobox genes from human placenta including a novel member of the Distal-less family, DLX4. *Gene*. 1997; 187: 55-61.
- Raich N, Clegg CH, Grofti J, Romeo PH, Stamatoyannopoulos G. GATA1 and YY1 are developmental repressors of the human  $\epsilon$ -globin gene. *EMBO J*. 1995; 14: 801-809.

Raich N, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Enver T. Demonstration of a human epsilon-globin gene silencer with studies in transgenic mice. *Blood*. 1992; 79: 861-864.

Raich N, Enver T, Nakamoto B, Josephson B, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G. Autonomous developmental control of human embryonic globin gene switching in transgenic mice. *Science*. 1990; 250: 1147-1149.

Raich N, Romeo PH. Erythroid regulatory elements. *Stem Cells*. 1993; 11: 95-104.

Ramirez F, Burns AL, Mears JG, Spence S, Starkman D, Bank A. Isolation and characterization of cloned human fetal globin genes. *Nucleic Acids Res*. 1979; 7: 1147-62.

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

Rekhtman N, Radparvar F, Evans T, Skoultchi AI. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU. 1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev*. 1999; 13: 1398-1411.

Rich IN, and Kubanek B. The ontogeny of erythropoiesis in the mouse detected by the erythroid colony-forming technique. *J Embryol Exp Morphol*. 1979; 50: 57-74.

Rifkind RA, Chui D, Epler H. Ultrastructural study of early morphogenetic events during the establishment of fetal hepatic erythropoiesis. *J. Cell Biol*. 1969; 40: 343-365.

Rioja L, Girot R, Garabedian M, Cournot-Witmer G. Bone disease in children with homozygous beta-thalassemia. *Bone Miner*. 1990; 8: 69-86.

Roberts NA, Sloane-Stanley JA, Sharpe JA, Stanworth SJ, Wood WG. Globin gene switching in transgenic mice carrying HS2-globin gene constructs. *Blood*; 1997; 89: 713-723.

Robinson GW, Mahon K. Differential and overlapping expression domains of Dlx-2 and Dlx-3 suggest distinct roles for Distal-less homeobox genes in craniofacial development. *Mech Dev*. 1994; 48: 199-215.

Robinson J, Sieff C, Delia D, Edwards PAW, Greaves M. Expression of cell-surface HLA-DR, HLA (ABC) and glycophorin during erythroid differentiation. *Nature*. 1981; 289(5793): 68-71.

Romeo PH, Prandini MH, Joulin V, Mignotte V, Prenant M, Vainchenker W, Marguerie G, Uzan G. Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature*. 1990; 344: 447-449.

Rouyer-Fessard P, Scott MD, Leroy Viard K, Garel MC, Bachir D, Galecteros F, Beuzard Y. Fate of  $\alpha$ -hemoglobin chains and erythrocyte defects in  $\beta$ -thalassemia. *Ann NY Acad Sci*. 1990; 612: 106-17.

Rutherford TR, Clegg JB, Higgs DR, Jones RW, Thompson J, Weatherall DJ. Embryonic erythroid differentiation in the human leukemic cell line K562. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78(1): 348-352.

Rutherford TR, Clegg JB, Weatherall DJ. K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature*. 1979; 280: 164-165.

Ryan TM, Behringer RR, Martin NC, Townes TM, Palmiter RD, Brinster RL. A single erythroid-specific DNaseI super-hypersensitive site activates high levels of human  $\beta$ -globin gene expression in transgenic mice. *Gene Dev*. 1989; 3: 314-323.

Ryan TM, Sun CW, Ren J, Townes TM. Human gamma-globin gene promoter element regulates human beta-globin gene developmental specificity. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(14): 2736-40.

Rylski M, Welch JJ, Chen YY, Letting DL, Diehl JA, Chodosh LA, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol Cell Biol*. 2003; 23: 5031-5042.

Saffer JD, Jackson SP, Annarella MB. Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol*. 1991; 11: 2189-2199.

Sangiorgi F, Woods CM, Lazarides E. Vimentin downregulation is an inherent feature of murine erythropoiesis and occurs independently of lineage. *Development*. 1990; 110: 85-96.

Sankaran VG, Menne J, Heller R. Heterozygous disruption of human SOX6 is insufficient to impair erythropoiesis or silencing of fetal hemoglobin. *Blood*. 2011; 117(16): 4396-4397.

Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, Mikkola HK, Hirschhorn JN, Cantor AB, Orkin SH. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*. 2008; 322(5909): 1839-1842.

Sankaran VG, Xu J, Ragozy T, Ippolito GC, Walkley CR, Maika SD, Fujiwara Y, Ito M, Groudine M, Bender MA, Tucker PW, Orkin SH. Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature*. 2009; 460(7259): 1093-1097.

Sargent TG, Lloyd JA. The human gamma-globin TATA and CACCC elements have key, distinct roles in suppressing beta-globin gene expression in embryonic/fetal development. *J Biol Chem*. 2001; 276(45): 41817-41824.

Schechter AN, Noguchi CT, Rodgers GP. Sick cell anemia. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW, eds. *The Molecular Basis of Blood Diseases*. Philadelphia: WB Saunders; 1987:179-218.

Schrier SL. Thalassemia: pathophysiology of red cell changes. *Annu Rev Med*. 1994; 45: 211-8.

Schrier SL. Pathobiology of thalassemic erythrocytes. *Curr Opin Hematol*. 1997; 4: 75-8.

Shih DM, Wall RJ, Shapiro SG. Developmentally regulated and erythroid-specific expression of the human embryonic  $\beta$ -globin gene in transgenic mice. *Nucleic Acids Res*. 1990; 18: 5465-5472.

Shimamoto T, Nakamura S, Bollekens J, Ruddle FH, Takeshita K. Inhibition of DLX-7 homeobox gene causes decreased expression of GATA-1 and c-myc genes and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(7): 3245-3249.

Shimamoto T, Ohyashiki K, Takeshita K. Overexpression of the homeobox gene DLX-7 inhibits apoptosis by induced expression of intercellular adhesion molecule-1. *Exp Hematol*. 2000; 28(4): 433-441.

Shirihai OS, Gregory T, Yu C, Orkin SH, Weiss MJ. ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation. *EMBO J*. 2000; 19: 2492-2502.

Siatecka M, Bieker JJ. The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. 2011; 118: 2044-2054.

Siatecka M, Xue L, Bieker JJ. Sumoylation of EKLF promotes transcriptional repression and is involved in inhibition of megakaryopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2007; 27(24): 8547-8560.

Sieff C, Bicknell D, Caine G, Robinson J, Lam G, Greaves M. Changes in cell surface antigen expression during hemopoietic differentiation. *Blood*. 1982; 60(3): 703-713.

Silver L, Palis J. Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis. *Blood*. 1997; 89: 1154-1164.

Silverman L, Glick D. Measurement of protein concentration by quantitative electron microscopy. *J Cell Biol*. 1969; 40: 773-8.

Simeone A, Acampora D, Pannese M, D'Esposito M, Stornaiuolo A, Gulisano M, Mallamaci A, Kastury K, Druck T, Huebner K. Cloning and characterization of two members of the vertebrate *Dlx* gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 2250-2254.

Southwood CM, Downs KM, Bieker JJ. Erythroid Kruppel-like factor exhibits an early and sequentially localized pattern of expression during mammalian erythroid ontogeny. *Dev Dyn*. 1996; 206(3): 248-259.

Steinberg MH, Lu ZH, Barton FB, Terrin ML, Charache S, Dover GJ. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia : determinants of response to hydroxyurea. Multicenter Study of Hydroxyurea. *Blood*. 1997; 89(3): 1078-1088.

Steiner R, Vogel H. On the kinetics of erythroid cell differentiation in fetal mice: I. Microspectrophotometric determination of the hemoglobin content in erythroid cells during gestation. *J Cell Physiol*. 1973; 81:323-338.

Stamatoyannopoulos G. Human hemoglobin switching. *Science*. 1991; 252(5004): 383.

Stamatoyannopoulos JA, Goodwin A, Joyce T, Lowrey CH. NF-E2 and GATA binding motifs are required for the formation of DNase I hypersensitive site 4 of the human  $\beta$ -globin locus control region. *EMBO J*. 1995; 14: 106-116.

Stoyanova E, Trudel M, Felfly H, Garcia D, Cloutier G. Characterization of circulatory disorders in  $\beta$ -thalassemic mice by noninvasive ultrasound biomicroscopy. *Physiol Genomics*. 2007; 29: 84-90.

Stoyannova E, Cloutier G, Felfly H, Lemsaddek W, Ah-Son N, Trudel M. Evidence for a novel mechanism independent of myocardial iron in  $\beta$ -thalassemia cardiac pathogenesis. *PLoS ONE*. 2012; 7(12): e52128.

Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004; 364: 1343-1360.

Sumiyama K, Irvine SQ, Ruddle FH. The role of gene duplication in the evolution and function of the vertebrate Dlx/distal-less bigene clusters. *J Struct Funct Genomics*. 2003; 3: 151-159.

Sun L, Crotty ML, Sensel M, Sather H, Navara C, Nachman J, Steinherz PG, Gaynon PS, Seibel N, Mao C, Vassilev A, Reaman GH, Uckun FM. Expression of dominant-negative Ikaros isoforms in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 1999; 5(8): 2112-2120.

Sun L, Goodman PA, Wood CM, Crotty ML, Sensel M, Sather H, Navara C, Nachman J, Steinherz PG, Gaynon PS, Seibel N, Vassilev A, Juran BD, Reaman GH, Uckun FM. Expression of aberrantly spliced oncogenic ikaros isoforms in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncology*. 1999; 17(12) : 3753-3766.

Sun L, Liu A, Georgopoulos K. Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J*. 1996; 15: 5358-5369.

Sydenstricker VP. Further observations on sickle cell anemia. *JAMA* 1924; 83: 12-15.

Talbot D, Grosveld F. The 5'HS2 of the globin locus control region enhances transcription through the interaction of a multimeric complex binding at two functionally distinct NF-E2 binding sites. *EMBO J.* 1991; 10: 1391-1398.

Tang DV, Ebb D, Hardison RC, Rodgers GP. Restoration of the CCAAT box or insertion of the CACCC motif activates  $\delta$ -globin gene expression. *Blood.* 1997; 90(1): 421-427.

Tanimoto K, Liu Q, Bungert J, Engel JD. Effects of altered gene order or orientation of the locus control region on human  $\beta$ -globin gene expression in mice. *Nature.* 1999; 398: 344-348.

Tanimoto K, Liu Q, Grosveld F, Bungert J, Engel JD. Context-dependent EKLF responsiveness defines the developmental specificity of the human epsilon-globin gene in erythroid cells of YAC transgenic mice. *Genes Dev.* 2000; 14: 2778-2794.

Tanimoto K, Sugiura A, Omori A, Felsenfeld G, Engel JD, Fukamizu A. Human  $\beta$ -globin locus control region HS5 contains CTCF- and developmental stage-dependent enhancer-blocking activity in erythroid cells. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 8946-8952.

Takashina T. Haemopoiesis in the human yolk sac. *J Anat* 1987 ; 151: 125-135.

Tavill AS, Grayzel AI, Vanderhoff GA, London IM. The control of hemoglobin synthesis. *Trans Assoc Am Physicians.* 1967; 80:305-13.

Tavill AS, Grayzel AI, London IM, Williams MK, Vanderhoff GA. The role of heme in the synthesis and assembly of hemoglobin. *J Biol Chem.* 1968; 243: 4987-4999.

Tewari R, Gillemans N, Wijgerde M, Nuez B, von Lindern M, Grosveld F, Philipsen S. Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) is active in primitive and definitive erythroid cells and is required for the function of 5'HS3 of the beta-globin locus control region. *EMBO J.* 1998; 17(8): 2334-2341.

Thein SL. Genetic modifiers of the beta-haemoglobinopathies. *Br J Haematol.* 2008; 141: 357-366.

Thein SL, Craig JE. Genetics of HbF/F cell variance in adults and heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Hemoglobin.* 1998; 22(5-6): 401-414.

Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin : new insights emerging from genomics and clinical implications. *Hum Mol Genet.* 2009; 18: 216-223.

Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, Silver N, Gerovasilli A, Ping C, Yamaguchi M, Wahlberg K, Ulug P, Spector TD, Garner C, Matsuda F, Farrall M, Lathrop M. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(27): 11346-11351.

Thomas JO, Travers AA. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci*. 2001; 26(3): 167-174.

Tolhuis B, Palstra RJ, Splinter E, Grosveld F, de Laat W. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell*. 2002; 10: 1453-1456.

Tomoda Y. Demonstration of foetal erythrocyte by immunofluorescent staining. *Nature*. 1964; 202: 910-911.

Tomita M, Furthmayr H, Marchesi VT. Primary structure of human erythrocyte glycophorin-A. Isolation and characterization of peptides and complete amino acid sequence. *Biochemistry*. 1978; 17(22): 4756-4770.

Tomita M, Marchesi VT. Amino-acid sequence and oligosaccharide attachment sites of human erythrocyte glycophorin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; 72(8): 2964-2968.

Townes TM, Behringer RR. Human globin locus activation region (LAR): role in temporal control. *Trends Genet*. 1990; 6: 219-223.

Trudel M, Costantini F. A 3' enhancer contributes to the stage-specific expression of the human beta-globin gene. *Genes Dev*. 1987; 1(9): 954-61.

Trudel M, Magram J, Bruckner L, Costantini F. Upstream  $\gamma$ -globin and downstream  $\beta$ -globin sequences required for stage-specific expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol*. 1987; 7(11): 4024-4029.

Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*. 1994; 371(6494): 221-226.

Tsai FY, Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*. 1997; 89(10): 3636-3643.

Tsang AP, Fujiwara Y, Hom DB, Orkin SH. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcription cofactor FOG. *Genes Dev*. 1998; 12: 2776-2786.

Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, Crossley M, Orkin SH. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*. 1997; 90: 109-119.

Tuan D, Solomon W, Li Q, London IM. The " $\beta$ -like-globin" gene domain in human erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82: 6384-6388.

Tuan D, Kong S, Hu K. Transcription of the hypersensitive site HS2 enhancer in erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 11219-11223.

Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, Usala G, Busonero F, Maschio A, Albai G, Piras MG, Sestu N, Lai S, Dei M, Mulas A, Crisponi L, Naitza S, Asunis I, Deiana M, Nagaraja R, Perseu L, Satta S, Cipollina MD, Sollaino C, Moi P, Hirschhorn JN, Orkin SH, Abecasis GR, Schlessinger D, Cao A. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of phenotype of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(5): 1620-1625.

Uguccioni M, Meliconi R, Lalli E, Nesci S, Delfini C, Lucarelli G, Gasbarrini G, Facchini A. Serum amyloid A protein concentration in bone marrow transplantation for  $\beta$ -thalassaemia. *J Clin Pathol*. 1992; 45: 348-351.

Vakoc CR, Letting DL, Gheldof N, Sawado T, Bender MA, Groudine M, Weiss MJ, Dekker J, Blobel GA. Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol Cell*. 2005 ; 17(3) 453-452.

van Oostveen J, Biji J, Raaphorst F, Walboomers J, Meijer C. The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leukemia*. 1999; 13: 1675-1690.

Wainscoat JS, Thein SL, Wood WG, Weatherall DJ, Metaxotou-Mavromil A, Tzotos S, Kanavakis E, Kattamis C. A novel délétion in the beta-globin gene complex. *Ann NY Acad Scie*. 1985; 445: 20-27.

Wall L, deBoer E, Grosveld F. The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes Dev*. 1988; 2: 1089-1100.

Walters M, Fiering S, Bouhassira EE, Scalzo D, Goeke S, Magis W, Garrick D, Whitelaw E, Martin DIK. The chicken  $\beta$ -globin 5'HS4 boundary element blocks enhancer-mediated suppression of silencing. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(5): 3714-3726.

Walters M, Kim C, Gelinas R. Characterization of a DNA binding activity in DNaseI hypersensitive site 4 of the human globin locus control region. *Nucleic Acids Res*. 1991; 19: 5385-5393.

Wang J.H., Nichogiannopoulou A., Wu L., Sun L., Sharpe A.H., Bigby M., and Georgopoulos K. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity*. 1996; 5:537–549.

Wani MA, Means RTJ, Lingrel JB. Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice. *Transgenic Res*. 1998; 7: 229-238.

Watson J. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. *Am J Med Sci*. 1948; 215: 419-423.

Wawrzyniak, C. and R. Popp. Expression of the two adult  $\beta$ -globin genes in mouse yolk sac and fetal liver erythrocytes. *Dev. Biol*. 1987; 119: 299-301.

Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassemias. *Nat Rev Genet*. 2001; 2: 245-255.

Weatherall DJ, Clegg JB, Naughton MA. Globin synthesis in thalassaemia: an in vitro study. *Nature*. 1965; 208(15): 1061-1065.

Weaver S, Comer MB, Jahn CL, Hutchinson CA, Edgell MH. The adult  $\beta$ -globin genes of the “single” type mouse C57BL. *Cell*. 1981; 24: 403-411.

Weaver S, Haigwood NL, Hutchinson CA, Edgell MH. DNA fragments of the *Mus musculus*  $\beta$ -globin haplotypes Hbb<sup>s</sup> and Hbb<sup>d</sup>. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 1385-1389.

Weed RI, Reed CF, Berg G. Is hemoglobin an essential structural component of human erythrocyte membranes ?. *J Clin Invest*. 1963; 42(4): 581-8.

Weiss MJ, Keller G, Orkin SH. Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev*. 1994; 8: 1184-1197.

Weiss MJ, Orkin SH. GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol*. 1995; 23: 99-107.

Welch JJ, Watts JA, Vakoc CR, Yao Y, Wang H, Hardison RC, Blobel GA, Chodosh LA, Weiss MJ. Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. *Blood*. 2004; 104: 3136-3147.

Whipple GH, Bradford WL. Mediterranean disease “thalassemia” (erythroblastic anemia of Cooley); associated pigment abnormalities simulating hemochromatosis. *J Pediatr*. 1936; 9: 279-311.

Whitelaw E, Tsai SF, Hogben P, Orkin SH. Regulated expression of globin chains and the erythroid transcription factor GATA-1 during erythropoiesis in the developing mouse. *Mol Cell Biol*. 1990; 10(12): 6596-6606.

Whitney JB. Differential control of the synthesis of two hemoglobin  $\beta$  chains in normal mice. *Cell*. 1977; 12(4): 863-871.

Whyatt DJ, deBoer E, Grosveld F. The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities. *EMBO J*. 1993; 12: 4993-5005.

Whyatt D, Lindeboom F, Karis A, Ferreira R, Milot E, Hendriks R, de Bruijn M, Langeveld A, Gribnau J, Grosveld F, Philipsen S. An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells. *Nature*. 2000; 406: 519-524.

Wickramasinghe SN, Hughues M. Some features of bone marrow macrophages in patients with homozygous beta-thalassemia. *Br J Haematol*. 1978; 38(1): 23-28.

Wijgerde M, Gribnau J, Trimborn T, Nuez B, Philipsen S, Grosveld F, Fraser P. The role of EKLF in human  $\beta$ -globin gene competition. *Genes Dev*. 1996; 10: 2894-2902.

Wojda U, Noel P, Miller JL. Fetal and adult hemoglobin production during adult erythropoiesis: coordinate expression correlates with cell proliferation. *Blood*. 2002; 99: 3005-3013.

Wong PM, Chung SW, Eaves CJ, Chui DH. Ontogeny of the mouse hemopoietic system. *Prog Clin Biol Res*. 1985; 193: 17-28.

Wood DG, Stamatoyannopoulos G, Lim G, Nute PE. F-cells in the adult: normal values in individuals with hereditary and acquired elevations of HbF. *Blood*. 1975; 46: 671-682.

Wu L, Nichogiannopoulou A, Shortman K, Georgopoulos K. Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity*. 1997; 7: 483-492.

Xu J, Sankaran VG, Ni M, Menne TF, Puram RV, Kim W, Orkin SH. Transcriptional silencing of  $\gamma$ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes Dev*. 2010; 24: 783-798.

Yale SH, Nagib N, Guthrie T. Approach to the vaso-occlusive crisis in adults with sickle cell disease. *Am Fam Physician*. 2000; 61(5): 1349-1356.

Yamamoto M, Ko LJ, Leonard MW, Beug H, Orkin SH, Engel JD. Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev*. 1990; 4: 1650-1662.

Yang HY, Evans T. Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains. *Mol Cell Biol*. 1992; 12: 4562-4570.

Yi Z, Cohen-Barak O, Hagiwara N, Kingsley PD, Fuchs DA, Erickson DT, Epner EM, Palis J, Brillant MH. Sox6 directly silences  $\epsilon$  globin expression in definitive erythropoiesis. *PLoS Genet.* 2006; 2(2) : e14.

Yilmaz A, Fernandez S, Lairmore MD, Boris-Lawrie K. Coordinate enhancement of transgene transcription and translation in a lentiviral vector. *Retrovirology.* 2006; 3:13.  
Yurchenco PD, Furthmayr H. Expression of red cell membrane proteins in erythroid precursor cells. *J Supramol Struct.* 1980; 13(2): 255-269.

Yu HC, Zhao HL, Wu ZK, Zhang JW. Eos negatively regulates human  $\gamma$ -globin gene transcription during erythroid differentiation. *PLoS One.* 2011; 6(7): 1-11.

Zhang P, Basu P, Redmond LC, Morris PE, Rupon JW, Ginder GD, Lloyd JA. A functional screen for Krüppel-like factors that regulate the human  $\gamma$ -globin gene through the CACCC promoter element. *Blood Cells Mol Dis.* 2005; 35(2): 227-235.

Zhang P, Behre G, Pan J, Iwama A, Wara-Aswapati N, Radomska HS, Auron PE, Tenen DG, Sun Z. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU. 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 8705-8710.

Zhang J, Socolovsky M, Gross AW, Lodish H. Role of Ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis by flow cytometry-based novel culture system. *Blood.* 2003; 102: 3938-3946.

Zheng FY, Rodgers GP, Huang SZ, Schechter AN, Salamah M, Perrine S, Berg PE. Sequence of the -530 region of the beta-globin gene of sickle cell anemia patients with the Arabian haplotype. *Hum Mutat.* 1994; 3(2) :163-165.

Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma to beta-globin switching. *Nat Genet.* 2010; 42(9): 742-744.

Zhou D, Pawlik KM, Ren J, Sun CW, Townes TM. Differential binding of erythroid Krüppel-like factor to embryonic/fetal globin gene promoters during development. *J Biol Chem.* 2006; 281: 16052-16057.

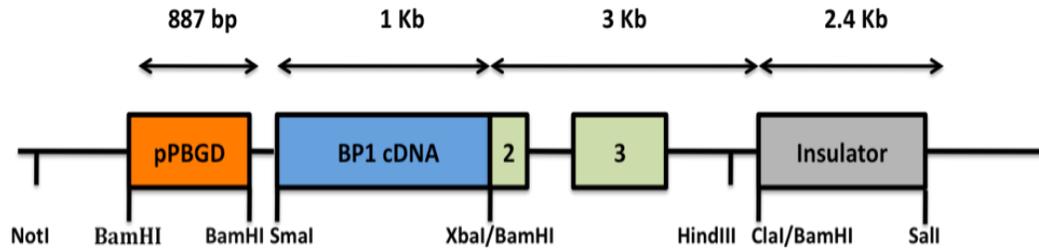
Zon LI, Tsai SF, Burgess S, Matsudaira P, Bruns GA, Orkin SH. The major human erythroid DNA-binding protein (GF-1): primary sequence and localization of the gene to the X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 668-672.

Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma-to-beta globin gene switching. *Nat Genet.* 2010; 42(9): 742-744.

Zoueva OP, Rodgers GP. Inhibition of  $\beta$  protein 1 expression enhances  $\beta$ -globin promoter activity and  $\beta$ -globin mRNA levels in the human erythroleukemia (K562) cell line. *Exp Hemat.* 2004; 32: 700-708.

Zoueva OP, Garrett LJ, Bodine D, Rodgers GP. BP1 motif in the human  $\beta$ -globin promoter affects  $\beta$ -globin expression during embryonic/fetal erythropoiesis in transgenic mice bearing the human  $\beta$ -globin gene. *Blood Cells Mol Dis*. 2008; 41(3): 244-251.

## Annexe 1



### Annexe 1. Construction plasmidique PBGD-BP1 $\beta$ -HS4

La construction comprend le promoteur PBGD érythroïde spécifique en amont de l'ADNc de BP1 humain. Les éléments régulateurs de  $\beta$ -globine humaine (18 pb de l'exon 2, intron 2, exon 3, et polyA) et l'insulateur HS4 ont été mis en position 3' de l'ADNc de BP1 humain.