

2311.3248.4

Université de Montréal

Régulation épigénétique au locus humain de la β -globine
lors de la différenciation de cellules ES

Par
Caroline Valat

Programme de Biologie Moléculaire
Faculté des Etudes Supérieures

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

Août 2004

©, Caroline Valat, 2004



QH

506

U54

2005

V.007

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation épigénétique au locus humain de la β -globine
lors de la différenciation de cellules ES

présenté par :
Caroline Valat

A été évalué par le jury composé des personnes suivantes :

Dre. Nathalie Labrecque
président-rapporteur

Dr. Éric Milot
directeur de recherche

Dre. Marie Trudel
membre du jury

Résumé en français

L'expression des gènes dans les organismes multicellulaires est spécifique d'un tissu, ou d'un stade de développement. La régulation épigénétique est impliquée dans le contrôle de cette expression, et peut faire intervenir des changements dans la structure de la chromatine. Le but de ce projet est d'élaborer un modèle *in vitro* pour mieux comprendre les mécanismes épigénétiques associés à l'activation d'un gène lors de la différenciation. Notre étude porte sur l'activation d'un transgène humain de β -globine lors de l'hématopoïèse, récapitulée durant la différenciation *in vitro* de cellules ES. L'intégration d'un transgène de globine sous le contrôle d'un LCR partiel conduit à une expression variée, soumise à l'effet de positionnement induit par les structures locales de la chromatine environnante.

Après transfection stable de la lignée ES R1, nous avons isolé des clones exprimant le transgène HS12GFP au stade de cellules ES. Le clone A3 montre une extinction du transgène lors de la prolifération, qui ne peut être modifiée par un traitement au TSA ni au 5-aza-Cytidine. Les autres clones expriment le transgène de façon stable lors de la prolifération. Nous avons aussi vérifié l'accessibilité de la chromatine du transgène au stade ES. Tous les clones montrent une diminution du nombre de cellules exprimant le transgène lors de la différenciation, modifiée par un traitement au TSA au jour 2 de différenciation. Un tri des cellules exprimant le transgène lors de la différenciation permet d'enrichir en progéniteurs. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer l'identité de ces progéniteurs, et pour compléter la caractérisation de ces clones.

Mots clés : hématopoïèse, différenciation *in vitro*, clonage, chromatine, extinction, répression transcriptionnelle, LCR, HS2

Résumé en anglais

Multi-cellular organisms require both developmental- and tissue-specific gene expression. Epigenetic regulation is involved in this fine control of gene expression, and implicates changes in chromatin structure. The aim of this project was to elaborate an *in vitro* model to elucidate the epigenetic mechanisms associated with gene activation during differentiation.

We decided to investigate the activation of a human β -globin transgene during hematopoiesis, which can be recapitulated during *in vitro* differentiation of mouse ES cells. Integration of a globin transgene under the control of a partial LCR leads to various expression, as a result of position effects induced by local chromatin structure.

After stable transfection of ES cell line R1, high-level expressing clones at ES stage were obtained. One clone, named A3, exhibits extinction of the transgene during proliferation, which cannot be inhibited by treatment with TSA, nor 5-aza-Cytidine. All other clones express stably the transgene during proliferation. We also looked at chromatin accessibility of the transgene to complete their characterization. All clones show a decrease in the number of cells expressing the transgene during differentiation, which can be partially relieved by a TSA treatment initiated at day 2 of differentiation. An enrichment in progenitors is also observed after sorting of transgene expressing cells during differentiation. Complementary studies are required to determine the identity of these progenitors, and to complete the characterization of these clones.

Key words: hematopoiesis, *in vitro* differentiation, cloning, chromatin, extinction, silencing, LCR, HS2

Table des Matières

Résumé en français	iii
Résumé en anglais	iv
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des sigles et abréviations	x
Remerciements	xiii
1 INTRODUCTION	1
1.1 Hématopoïèse – Erythropoïèse	2
1.2 Locus de la β -globine	8
1.2.1 Propriétés du LCR	10
1.2.2 LCR et activation de la transcription : mécanismes d'action	11
1.2.3 Spécificité des HS	12
1.2.4 Facteurs de transcription au locus de la β -globine	15
1.3 Régulation épigénétique	16
1.3.1 La méthylation de l'ADN	16
1.3.2 L'interférence d'ARN	17
1.3.3 Les variations de structure de la chromatine	18
1.3.4 Liaison de facteurs protéiques	22
1.4 Résumé	24
1.4.1 Régulation épigénétique au locus de la β -globine lors de l'hématopoïèse	24
1.4.2 Rationalisation	24
1.4.3 Objectif	26
2 MATERIEL ET METHODES	27
2.1 Clonage	28
2.2 Culture cellulaire	28
2.3 Production de LIF recombinant et titration	29
2.4 Southern blot	29
2.5 Cytométrie en flux	30
2.6 Sensibilité à la DNaseI	30

2.7	Différenciation <i>in vitro</i> de cellules ES	31
2.8	Essai clonogénique.....	31
2.9	Traitement des cellules ES et des EB au TSA ou 5-aza-Cytidine	32
3	RESULTATS	33
3.1	Stratégie de clonage	34
3.2	Obtention et caractérisation des clones de ES	39
3.2.1	Obtention des clones de cellules ES	39
3.2.2	Détermination du nombre de copies par hybridation Southern	40
3.3	Expression du transgène au stade de cellules ES	42
3.3.1	Expression du transgène dans les clones HS12GFP	42
3.3.2	Expression du transgène HS12GFP dans le clone A3	44
3.3.3	Stabilité de l'expression du transgène dans les autres clones	45
3.3.4	Extinction du transgène HS12GFP dans le clone A3 : Résistance aux traitements TSA et 5-aza-Cytidine.....	46
3.4	Structure de la chromatine du transgène : Sensibilité à la DNaseI	49
3.5	Différenciation <i>in vitro</i> des cellules ES	52
3.5.1	Différenciation des ES en EB – différenciation primaire	52
3.5.2	Différenciation secondaire en Méthylcellulose.....	55
3.6	Etude <i>in vivo</i>	58
4	DISCUSSION	59
4.1	Construction du transgène HS12GFP	60
4.2	Sélection des clones et caractérisation de l'expression du transgène	60
4.3	Mécanisme d'extinction lors de la prolifération (clone A3)	62
4.4	Accessibilité de la chromatine	66
4.5	Variation de l'expression du transgène lors de la différenciation.....	69
4.6	Etude <i>in vivo</i>	74
4.7	Conclusion	74
5	ANNEXE :	76
	Construction d'un surexprimeur inducible de M31	76
5.1	Introduction.....	77
5.2	Matériel et Méthodes	77
5.2.1	Clonage	77

5.2.2	Mutagenèse dirigée	78
5.2.3	Séquençage.....	78
5.2.4	Transfection	79
5.2.5	Coloration DAPI	79
5.3	Résultats	79
5.3.1	Stratégie de clonage	79
5.3.2	Distribution de la protéine de fusion M31-YFP.....	81
5.4	Discussion	83
6	REFERENCES	85

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse définitive.....	3
Figure 2 : Locus de la β -globine: locus humain et locus murin.....	10
Figure 3 : Clonage du fragment GFP dans le vecteur pEV-Puro.....	36
Figure 4 : Clonage du fragment <i>LoxP</i> dans le vecteur pEV-Puro – GFP.....	37
Figure 5 : Schéma de la construction HS12GFP.....	39
Figure 6 : Hybridation Southern (Digestion <i>Eco RI</i> – Sonde β IVS2).....	40
Figure 7 : Cytométrie en flux - Expression du transgène dans les clones HS12GFP au stade ES.....	42
Figure 8 : Extinction du transgène lors de la prolifération du clone A3.....	45
Figure 9 : L'extinction du transgène HS12GFP dans le clone A3 est résistante à un traitement au TSA.....	48
Figure 10 : L'extinction du transgène HS12GFP dans le clone A3 est résistante à un traitement au 5-aza-Cytidine.....	48
Figure 11 : Sensibilité à la DNaseI.....	51
Figure 12 : Accessibilité de la chromatine au site HS1.....	51
Figure 13 : Expression du transgène HS12GFP au stade ES.....	53
Figure 14 : L'expression du transgène lors de la différenciation en EB est modifiée suite à un traitement au TSA.....	55
Figure 15 : Etapes de clonage réalisées pour la construction du vecteur inducible M31-YFP.....	80
Figure 16 : Séquençage du cDNA de M31, avant et après fixation de la mutation de l'exon 3 par mutagenèse dirigée.....	81
Figure 17 : Localisation cellulaire des protéines YFP et M31-YFP.....	83

Liste des tableaux

Tableau 1 : Bilan de l'expression du transgène dans les clones HS12GFP lors de la prolifération des cellules ES	46
Tableau 2 : Essai clonogénique sur le clone C1, avec ou sans TSA.....	58

Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
ADNc	Acide Désoxyribo-Nucléique complémentaire
ADP	Adénosine Di-Phosphate
ARN	Acide Ribonucléique
AGM	Aorte-Gonade-Mésonéphros
ATP	Adénosine triphosphate
BFU-E	<i>Burst Forming Unit-Erythroid</i>
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>
BRG1	<i>Brahma-related gene 1</i>
Ca-II	<i>Carbonic Anhydrase II gene</i>
CD	<i>Chromo-Domain</i>
CFC	<i>Colony forming cell</i>
CSD	<i>Chromo-Shadow-Domain</i>
CFU-E	<i>Colony Forming Unit-Erythroid</i>
CFU-GEMM	<i>Colony Forming Unit Granulocyte-Erythroid-Macrophage-Megakaryocyte</i>
ChIP	<i>Chromatin Immuno-Precipitation</i>
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i>
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i>
CpG	Cytosine-Guanine dinucléotide
CTCF	<i>CCCTC-Binding-Factor</i>
DNMT	DNA-Méthyl-Transférase
Dox	Doxycycline
DNaseI	Désoxyribonucléase I
E	jour de développement embryonnaire
EB	<i>Embryoid Body</i> ou corps embryonnaire
EKLF	<i>Erythroid Krüppel Like Factor</i>
Epo	Erythropoïétine
E-RC1	<i>EKLF coactivator-remodeling complex 1</i>
ES	<i>Embryonic Stem cells</i> / Cellules Souches Embryonnaires

FACS	<i>Fluorescent-Activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Flk1	<i>Fetal Liver Kinase 1</i>
FOG-1	<i>Friend of GATA-1</i>
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GATA	facteur de transcription liant la séquence GATA
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
H3	Histone H4
H4	Histone H3
HAT	Histone Acétyl-Transférase
HDAC	Histone Déacétylase
HMT	Histone Méthyl-Transférase
HP1	<i>Heterochromatin Protein 1</i>
HS	Site Hypersensible
HSC	Cellule souche hématopoïétique
IL3	Interleukine 3
ISWI	<i>imitation SWI</i>
K	Lysine
kb	kilo-paires de bases
LCR	<i>Locus Control Region</i>
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
Ln2	souris line2, transgénique pour le locus humain complet de la β -globine
LoxP	<i>locus of X-over P1</i>
LMO2	<i>LIM domain only 2</i>
MARE	<i>Maf Repeat Element</i>
MTG	Monothioglycérol
NF-E2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2</i>
Pc	Protéine Polycomb
pb	paire(s) de bases
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

pgk	Promoteur Phosphoglycérate Kinase-I
R	Arginine
RSB	<i>Reticulocyte Standard Buffer</i>
RtTA	<i>Reverse Trans-Activator</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SCL/Tal1	<i>Stem Cell Protein / T-cell Acute Lymphocytic Leukemia 1</i>
SWI/SNF	<i>Switching and/or Sucrose Non Fermentor</i>
tk	Promoteur Thymidine Kinase
TSA	Trichostatin A
tTA	<i>Trans-Activator</i>
Tpo	Thrombopoïétine
u	Unité
Xist	<i>X (inactive)-specific transcript</i>
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
YY1	<i>Yin-Yang 1 protein</i>

Remerciements

Je remercie mon directeur de recherche, Dr Éric Milot, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et confié ce projet.

Je remercie également les membres du laboratoire pour leur aide et leur soutien tout au long de ma maîtrise : Angélique Aumont, Antonia Balassy, Stefania Bottardi, Silvana Lachance, Natacha Pierre-Charles, Vincent Bourgoïn, Alex Wollenshlaeger.

Merci à Sophie Ouellette, qui a réalisé les expériences de tri cellulaire, et à Sébastien Harton pour avoir réalisé les souris transgéniques.

1 INTRODUCTION

1.1 Hématopoïèse – Erythropoïèse

L'hématopoïèse est le processus par lequel sont générées toutes les cellules sanguines et leurs progéniteurs à partir du mésoderme. Une cellule souche hématopoïétique (HSC) est ainsi capable de générer plusieurs lignées différentes: les lignées lymphoïde (B et T) d'une part, érythroïde et myéloïde (granulocytaire, monocytaire et mégakaryocytaire) d'autre part.

Chez l'embryon, la première vague d'hématopoïèse est transitoire et se situe au niveau du sac vitellin ; elle donne naissance principalement à des cellules érythroïdes primitives, au jour de développement embryonnaire E7.5 chez la souris. Elle est suivie quelques jours plus tard par l'hématopoïèse définitive, dont le siège principal passe rapidement de la région AGM (Aorte-Gonade-Mésonéphros) vers le foie fœtal aux jours E10-11, puis devient la moelle osseuse à partir du jour E16-17 et chez l'adulte (revu par Yoder, 2001). Alors que la première vague d'hématopoïèse primitive génère exclusivement des cellules érythroïdes, plus grosses et nucléées, et exprimant les formes embryonnaires de la β -globine (ϵ^γ et $\beta H1$ chez la souris, ϵ chez l'humain), l'hématopoïèse définitive est à l'origine des différentes lignées hématopoïétiques. L'origine des cellules hématopoïétiques définitives reste cependant controversée ; elles pourraient en effet provenir des cellules hématopoïétiques primitives, comme en atteste la présence de progéniteurs définitifs dans le sac vitellin, ou encore avoir une origine indépendante, suggérée entre autre par leurs capacités différentes en terme de reconstitution (revu par Palis et Yoder, 2001).

Les cellules souches hématopoïétiques sont pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables à la fois de proliférer pour s'auto-renouveler, et de se différencier en plusieurs types cellulaires. Ces propriétés sont illustrées par des expériences de repopulation après greffe de moelle de souris irradiées (revu par Zhu et Emerson, 2002). Des HSC ont cependant été identifiées à partir de populations de cellules hématopoïétiques définitives, mais non à partir de primitives (revu par Mikkola et Orkin 2002, Kondo *et al.*, 2003).

Des HSC dérivent les progéniteurs des lignées myéloïde (*Common Myeloid Progenitors* ou CMP) et lymphoïde (*Common Lymphoid Progenitors* ou CLP). Ces

progéniteurs sont toujours multipotents mais ont déjà acquis une spécificité myéloïde ou lymphoïde. Parmi les différents progéniteurs érythropoïétiques on trouve les progéniteurs multipotents CFU-GEMM (Colony Forming Unit Granulocyte-Erythroid-Macrophage-Megakaryocyte), suivis des BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) qui sont les progéniteurs érythroïdes les plus précoces, et enfin les CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid). Des progéniteurs dérivent les précurseurs, qui sont les premières cellules morphologiquement identifiables de chaque lignée, et poursuivent la différenciation terminale (proérythroblaste pour la lignée érythroïde par exemple).

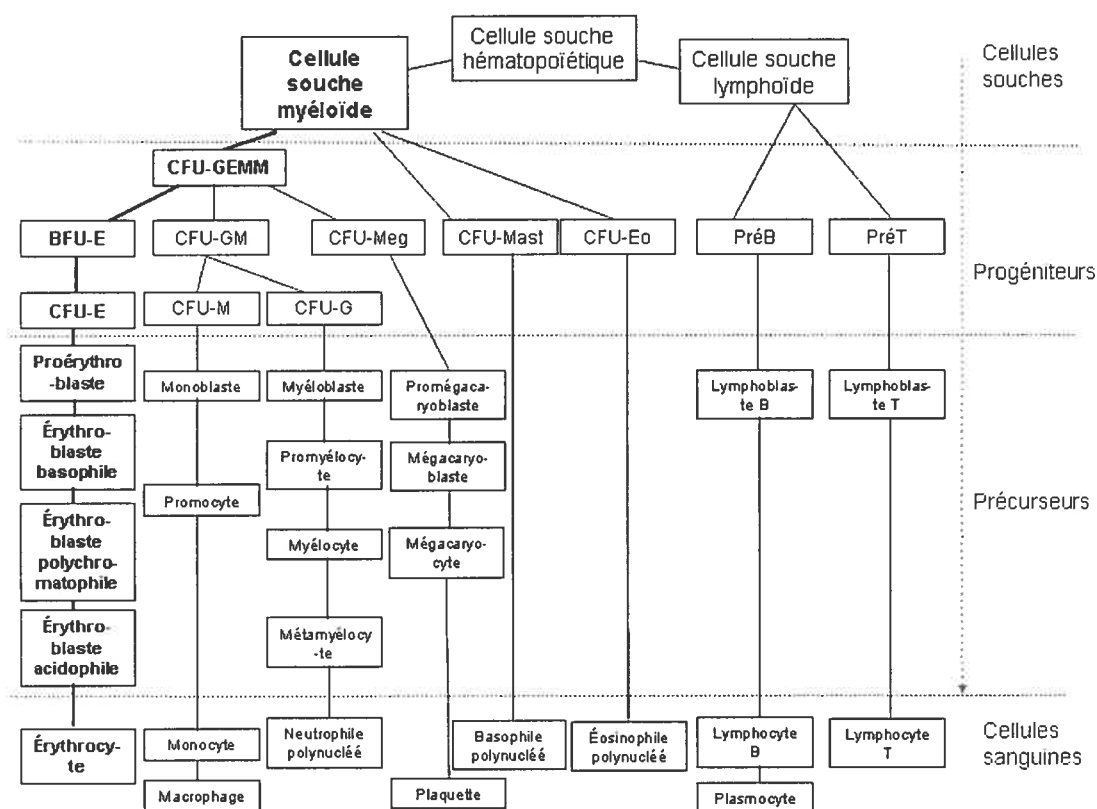


Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse définitive (adapté de Charpentier, 1996)

Les cytokines et certains facteurs de croissance peuvent influencer le destin de différents progéniteurs hématopoïétiques, mais ne sont pas nécessairement spécifiques d'une lignée. Ainsi l'interleukine-3 (IL3) et le *Stem Cell Factor* (SCF) sont requis pour la prolifération des cellules souches et des progéniteurs précoces. Le *Granulocyte*

Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) joue un rôle important pour stimuler la prolifération de certains progéniteurs (CFU-GEMM, BFU-E, CFU-E). L'Erythropoïétine (Epo) devient importante pour la prolifération des progéniteurs (BFU-E, CFU-E) et des précurseurs érythroïdes, donc elle a une action beaucoup plus tardive lors de la différenciation. La Thrombopoïétine (Tpo) est, elle, importante pour la lignée mégakaryocytaire (revu par Audet *et al.*, 1998).

Les HSC exprimeraient également plusieurs gènes spécifiques de certaines lignées, toutefois à un niveau de base. Il est suggéré que ce profil d'expression se restreint par la suite lors de la différenciation (Hu *et al.*, 1997). L'expression de ces gènes pourrait être due à des modifications de structure de la chromatine, qui agiraient comme un prélude à ce qui se passe en fin de différenciation. Ceci a été démontré pour le locus de la β -globine, qui se trouve dans une structure de chromatine ouverte bien avant que la différenciation érythroïde ne soit engagée (Jimenez *et al.*, 1992, Hu *et al.*, 1997, Kontaraki *et al.*, 2000, Bottardi *et al.*, 2003).

Pour identifier les HSC et les différents progéniteurs hématopoïétiques, on a souvent recours à la détection de l'expression de marqueurs spécifiques de chaque stade de différenciation. Ces marqueurs peuvent être des marqueurs de surface, dont l'expression est détectée via la liaison avec des anticorps spécifiques et analysée par FACS. Mais ce sont aussi des facteurs de transcription, dont l'expression, spécifique de différents stades de différenciation, est détectée par RT-PCR. Parmi ces nombreuses protéines, nous pouvons citer :

Brachyury, marqueur spécifique des cellules du mésoderme. Il est exprimé avant l'apparition des premières cellules hématopoïétiques (Keller *et al.*, 1993).

Flk-1, ou **Récepteur 2 du VEGF** (*Vascular Endothelial Growth Factor*) est un récepteur tyrosine kinase exprimé dans les stades précoces du développement endothélial et hématopoïétique. Il serait donc un marqueur du précurseur commun des systèmes hématopoïétique et endothélial, l'hémangioblaste (voir section suivante). Les souris déficientes pour Flk-1 meurent entre les jours E 8.5-9.5, avec un défaut dans la production des îlots sanguins au niveau du sac vitellin (revu par Mikkola et Orkin, 2002).

SCL/Tal1 est un facteur de transcription de la famille des bHLH (*basic Loop-Helix-Loop*) qui reconnaît des séquences consensus appelées E-box. Il est indispensable à l'hématopoïèse primitive et définitive, notamment au niveau des cellules souches, mais important aussi pour les lignées érythroïde et mégakaryocytaire (Palis *et al.*, 1999). Il est également requis pour le développement de cellules endothéliales dans l'embryon. Plusieurs études suggèrent qu'il est également un marqueur de l'hémangioblaste, puisque son expression est d'abord restreinte à une population de cellules Flk1+, avant de devenir spécifique des cellules hématopoïétiques. Le *knock-out* de SCL/Tal1 est létal au stade embryonnaire (E9.5), avec une absence complète d'hématopoïèse dans le sac vitellin. (Robb *et al.*, 1995, et Shivdasani *et al.*, 1995).

GATA-2 est un facteur de transcription de la famille GATA, dont les membres reconnaissent la séquence consensus (T/A)GATA(A/G). GATA-2 est impliqué lors de l'hématopoïèse définitive. Le *knock-out* de GATA-2 est létal au stade embryonnaire vers le jour E10.5, avec une absence totale d'hématopoïèse définitive, conduisant à une anémie de l'embryon (Ohneda et Yamamoto, 2002).

Plus tard lors de la différenciation, on retrouve des marqueurs plus spécifiques de certaines lignées, comme les facteurs de transcription GATA-1, EKLF et NF-E2, importants pour la lignée érythroïde par exemple.

Le fait que les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques ont une origine simultanée au niveau des îlots sanguins du sac vitellin a conduit à l'hypothèse qu'elles partageraient un précurseur commun : l'hémangioblaste (revu par Mikkola et Orkin, 2002). Plusieurs études ont également permis d'étayer cette hypothèse, notamment l'identification de marqueurs cellulaires communs, correspondants aux différents stades de différenciation (Choi *et al.*, 1998). Ainsi, cellules endothéliales et cellules hématopoïétiques expriment des marqueurs communs, comme CD34, Flk1, SCL/Tal1, et GATA-2 (revu par Robertson *et al.*, 1999).

Il est cependant très difficile d'étudier les événements précoces aboutissant à la différenciation de cellules hématopoïétiques à partir de cellules souches hématopoïétiques. Les cellules souches embryonnaires isolées à partir du foie fœtal offrent plus d'avantages que leurs homologues adultes. Elles montrent en particulier

une capacité de reconstitution accrue, à la fois en terme de rapidité et de capacité (revu par Kondo *et al.*, 2003). Cependant, ces cellules sont difficiles à obtenir et à isoler à partir d'embryons ; il est également difficile de les cultiver tout en conservant leurs propriétés d'auto-renouvellement (cellules souches) et de totipotentialité (revu par Domen et Weissman, 1999). Pour ces raisons, de nombreuses équipes se sont tournées vers l'utilisation de cellules embryonnaires (*Embryonic Stem Cells*, ou cellules ES) et leur différenciation *in vitro*, afin d'élucider les mécanismes moléculaires associés à leur auto-renouvellement et à leur potentiel de différenciation (Keller *et al.*, 1993).

Les cellules ES sont dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste au jour E3.5 chez la souris. Ce sont des cellules totipotentes, que l'on peut modifier génétiquement et ensuite réimplanter chez des mères porteuses pour obtenir des animaux transgéniques. Elles peuvent également être cultivées *in vitro* à l'état indifférencié, en présence de *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), ou encore être différenciées en une variété de lignées, avec un apport de facteurs de croissance spécifiques. Les cellules ES de souris ont été utilisées en particulier pour étudier la différenciation de cellules souches vers les lignées hématopoïétique, endothéliale, musculaire et neuronale (revu par Keller, 1995).

Elles sont également le sujet de nombreuses études visant à élucider les mécanismes précoces conduisant à la différenciation des cellules souches vers les différentes lignées hématopoïétiques (Wiles et Keller, 1991). Leur différenciation *in vitro* récapitule au moins partiellement l'érythropoïèse, à partir des stades précoces de l'érythropoïèse primitive : même ordre de développement des précurseurs (Keller *et al.*, 1993, Palis *et al.*, 1999), même cinétique d'expression génique (revu par Cantor et Orkin, 2002), ce qui suggère que le système de différenciation des cellules ES *in vitro* est comparable à ce qui se passe lors de l'embryogenèse.

Cependant aucune cellule souche hématopoïétique n'a pu être isolée, ni à partir de cellules ES, ni à partir du sac vitellin. Afin d'identifier les mécanismes moléculaires à la base de la totipotentialité des cellules ES, plusieurs équipes ont vérifié l'effet de la surexpression de différentes protéines sur le potentiel de reconstitution hématopoïétique de ces cellules. C'est le cas par exemple de Bcr-Abl (Perlingeiro *et al.*, 2001) ou HoxB4 (Kyba *et al.*, 2002), qui, lorsqu'ils sont

surexprimés au niveau du sac vitellin, permettent d'obtenir plusieurs lignées hématopoïétiques définitives à partir de précurseurs primitifs, suggérant ainsi que les HSC ont bien pour origine un précurseur contenu dans le sac vitellin. Cependant, malgré de nombreuses études, cette controverse sur une origine commune ou indépendante des différents précurseurs hématopoïétiques subsiste toujours (revu par Keller *et al.*, 1999, Yoder *et al.*, 2001).

La différenciation des cellules ES peut se faire de façon spontanée, en absence de LIF ; les agrégats cellulaires ainsi formés, entre les jours 4 et 10 de différenciation, appelés corps embryonnaires ou EB (*Embryoid Bodies*) sont tout d'abord constitués d'une population transitoire de cellules blastiques correspondant aux érythroïdes primitifs (Robertson *et al.*, 1999). Ces colonies blastiques contiendraient des précurseurs hématopoïétiques, puisqu'elles expriment les marqueurs flk-1, SCL/Tal1, GATA-1, CD34. Le profil d'expression précoce de ces gènes lors du développement est récapitulé lors de la différenciation *in vitro* de cellules ES (Orkin et Zon, 1997).

Puis, rapidement les EB renferment différents progéniteurs hématopoïétiques, qui peuvent être identifiés par marquage avec des anticorps spécifiques pour chaque lignée, ou encore par essai clonogénique. En effet, Keller et collaborateurs ont montré par RT-PCR que les EB sont capables d'exprimer dès le jour 4 de différenciation la forme embryonnaire de la β -globine de souris β H1, caractéristique des cellules érythroïdes primitives, suivie peu après par la forme adulte β major (β maj) aux jours 5-6 de différenciation (Keller *et al.*, 1993).

L'essai clonogénique consiste à ensemercer des progéniteurs en milieu semi-solide (méthylcellulose) contenant des cytokines et facteurs de croissance hématopoïétiques appropriés. Par exemple on peut ensemercer le milieu avec des cellules provenant de la moelle osseuse, ou encore issues de la différenciation de cellules ES en EB ; les progéniteurs issus de ces populations ont la capacité de proliférer et de se différencier en formant des colonies identifiables, dévoilant ainsi leur potentiel de différenciation.

L'essai clonogénique en méthylcellulose permet une identification et un décompte facile des colonies issues des différents progéniteurs hématopoïétiques

présents au sein des EB. Pour les EB issus des cellules ES, le cocktail de cytokines hématopoïétiques ajouté au milieu est constitué d'IL3, de SCF, d'Epo, et d'insuline.

1.2 Locus de la β -globine

L'hémoglobine, produite par les cellules érythroïdes, est constituée de deux chaînes d' α -globine et deux chaînes de β -globine, liées à 4 molécules d'hème. Pour conserver cet équilibre, il faut donc un contrôle fin à la fois au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel. En effet, un défaut dans la production de l'une ou l'autre des chaînes de globine peut entraîner l'apparition de thalassémies, caractérisées par un déséquilibre dans la production des chaînes de globine et donc par une insuffisance en hémoglobine. Les thalassémies peuvent être le résultat de mutations affectant l'épissage ou la stabilité du transcrit. Elles peuvent aussi résulter de délétions se situant au niveau des gènes eux-mêmes, ou encore au niveau de leur promoteur. Cependant chez certains patients ces délétions peuvent concerner la région en amont du gène c'est le cas par exemple de la β -globine. Ceci a conduit à l'identification d'une large région régulatrice située en amont des gènes sur le locus de la β -globine: le LCR ou *Locus Control Region*. Ce LCR est constitué de plusieurs sites hypersensibles à la digestion par des nucléases, appelés HS (*Hypersensitive Sites*). Ces sites sont caractéristiques d'une structure de chromatine accessible ou ouverte. Ainsi dans la thalassémie hispanique, une délétion couvrant environ 30 kb concerne les sites HS2 à HS5 du LCR et laisse le gène de la β -globine intact, tout en conduisant à un défaut d'expression de la β -globine (Kioussis *et al.*, 1983, Forrester *et al.*, 1990). Depuis la découverte du LCR de la β -globine, une trentaine de loci comportant des LCR ont été identifiés chez plusieurs mammifères, mais aussi chez le poulet (revu par Li *et al.*, 1999).

Le locus humain de la β -globine est un locus multigénique qui couvre environ 70 kb sur le chromosome 11 ; il est constitué de 5 gènes exprimés successivement lors du développement: le gène ϵ au stade embryonnaire, les gènes $A\gamma$ et $G\gamma$ au stade fœtal, et les gènes δ et β au stade adulte. Donc l'expression de la β -globine est spécifique du

stade de développement. L'expression de la globine est également tissu-spécifique, restreinte aux cellules érythroïdes.

La structure du locus de la β -globine est extrêmement bien conservée chez les mammifères, et de nombreuses études concernent aussi le locus du poulet. Situé sur le chromosome 7, le locus murin montre la même organisation que le locus humain, avec deux gènes ϵ^y et $\beta H1$ exprimés au stade embryonnaire, tandis que les gènes β -maj et β -min sont exprimés aux stades fœtal et adulte.

L'expression de la β -globine est sous la dépendance de différents éléments de régulation, proximaux et distaux :

- Promoteur spécifique pour chaque gène, comportant des sites de liaison pour des facteurs de transcription, qui sont soit ubiquitaires soit érythroïde-spécifiques.
- 3' HS1 β -*enhancer*, situé en aval de l'extrémité poly-A des gènes de β -globine : comme tout enhancer, il est capable de stimuler l'expression d'un gène (Pasceri *et al.*, 1998) quelle que soit son orientation, et d'exercer son action même à longue distance. Le 3' β -*enhancer* contribue à une expression tissu- et développement-spécifique des gènes de globine (Kollias *et al.*, 1987, Trudel et Costantini, 1987). Il semble également interagir avec le LCR pour augmenter la transcription des gènes de β -globine à différents stades de développement (Rubin *et al.*, 2000, Palstra *et al.*, 2003).
- En amont des gènes de β -globine : le LCR

Principalement définis comme des séquences régulatrices capables d'augmenter l'expression de gènes à un niveau physiologique et de façon tissu-spécifique (revu par Li *et al.*, 2002), les LCR sont composés de sites hypersensibles (HS) à la digestion par des nucléases. De plus, des expériences réalisées avec des souris transgéniques montrent que le LCR de la β -globine conduit également à une expression du transgène qui est dépendante du nombre de copies, mais indépendante du site d'intégration (Grosveld *et al.*, 1987). Cependant la délétion d'un des HS du LCR abolit ces propriétés, et conduit à une expression variable du transgène, qui devient dépendante du site d'intégration (Forrester *et al.*, 1990, Bungert *et al.*, 1995, Milot *et al.*, 1996).

Le LCR de la β -globine est constitué de 4 sites hypersensibles (HS1 à HS4) à la digestion par la DNase I (Groudine *et al.*, 1983) dans le locus humain. Ces HS sont

spécifiques des cellules érythroïdes, tandis qu'un dernier site hypersensible, HS5, est plutôt hématopoïétique spécifique (Li *et al.*, 2002). Le locus murin est quant à lui composé de 6 sites hypersensibles. Chaque site hypersensible est constitué d'une séquence principale, appelée *core*, qui contient des sites de liaison pour des facteurs de transcription, et de séquences flanquantes, qui semblent également être importantes pour la fonction du LCR (Molette *et al.*, 2001). Plusieurs études suggèrent que chaque HS est également plus ou moins spécifique d'un gène et d'un stade de développement (Navas *et al.*, 1998). Cependant la perte d'un des gènes de globine (gène γ ou gène β) conduit à une perte de la régulation en fonction du développement : le gène lié au LCR avec son promoteur spécifique, qui habituellement lui confère une expression à un stade donné, devient exprimé quel que soit le stade de développement (Hanscombe *et al.*, 1991).

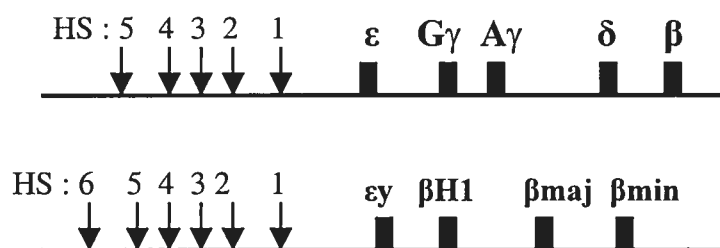


Fig. 2 : Locus de la β -globine: locus humain (haut) et locus murin (bas)

HS : Sites Hypersensibles, suivis des gènes actifs ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ et β chez l'humain, et ϵy , $\beta H1$, βmaj et βmin chez la souris

1.2.1 Propriétés du LCR

Le LCR permet de conduire à une forte expression du gène qui lui est lié, et ce de façon tissu-spécifique, indépendante du site d'intégration, mais dépendante du nombre de copies (Grosveld *et al.*, 1987). On peut distinguer deux propriétés exercées par le LCR: la première, une activité d'*enhancer*, permet l'augmentation de l'activité transcriptionnelle d'un gène, et la seconde est son aptitude à ouvrir la chromatine (revu par Grosveld, 1999). Cette dernière activité fait cependant l'objet d'une controverse (revu par Engel et Tanimoto, 2000). Dans certains cas de thalassémie et dans des modèles de souris transgéniques pour un locus humain partiel de la β -

globine, il y a bien disparition des sites hypersensibles aux nucléases. Mais lors d'expériences de délétion du LCR endogène murin, le locus reste malgré tout dans une structure de chromatine ouverte (Bender *et al.*, 2000, et revu par Bulger *et al.*, 2002). Il est toutefois possible que le locus endogène soit intégré dans une région chromosomique favorable à la transcription ; dans ce cas, le LCR ne serait pas indispensable pour l'ouverture de la chromatine (revu par Bulger et Groudine, 1999). D'ailleurs, dans les cas de thalassémie due à une délétion au niveau du LCR, il y a bien à la fois absence de transcription (Navas *et al.*, 2002) et défaut d'établissement d'une structure de chromatine ouverte (Forrester *et al.*, 1990).

Plusieurs études ont tenté de définir la séquence minimale pour obtenir une activation forte des gènes de β -globine, qui serait ainsi susceptible d'être contenue dans un vecteur de thérapie génique, d'où la dissection des différents HS ; cependant des études de délétion ont conduit à la conclusion que tous les HS seraient indispensables pour une activité de LCR, puisque la délétion d'un seul des HS suffit à rendre le transgène susceptible à l'effet de positionnement (Milot *et al.*, 1996, Li *et al.*, 1998), mais il y aurait aussi une redondance fonctionnelle entre certains éléments comme HS2 et HS3, HS3 et HS4 (Bungert *et al.*, 1995, 1999). Parmi les sites hypersensibles, HS2, HS3, HS4 seraient essentiels, possédant tous trois une activité d'enhancer, tandis que HS1 et HS5 joueraient un rôle moindre dans le processus d'activation du locus (Fraser *et al.*, 1990, 1993, Ellis *et al.*, 1996). Les sites HS2, HS3 et HS4 seraient essentiels à l'expression de la globine, via une interaction coopérative avec les différents gènes du locus (Jackson *et al.*, 2003).

1.2.2 LCR et activation de la transcription : mécanismes d'action

Plusieurs modèles ont été proposés pour tenter d'expliquer comment l'interaction entre le LCR et le promoteur, éléments séparés de plusieurs dizaines de kb, peuvent conduire à l'expression des gènes du locus de la β -globine à différents stades de développement :

Le *looping model* (Choi et Engel, 1988, Hanscombe *et al.*, 1991, Fraser *et al.*, 1993, Tolhuis *et al.*, 2002) décrit la formation d'un holocomplexe entre les différents HS du LCR et le promoteur du gène à activer, grâce à la formation d'une boucle d'ADN. La première étape consiste en la relocalisation du locus dans une structure de

chromatine permissive à la transcription, suivie d'une vague d'acétylation favorisant le recrutement de facteurs de transcription au niveau du promoteur. Ce modèle permet d'expliquer à la fois l'effet coopératif des HS et l'importance des séquences flanquantes des HS pour l'activation de la transcription des gènes de globine.

D'autres modèles ont également été proposés :

- Le *tracking/scanning model* suggère que des complexes protéiques contenant aussi des facteurs de transcription sont associés au niveau du LCR et glissent ou migrent sur l'hélice d'ADN jusqu'à ce qu'ils rencontrent le promoteur approprié selon le stade de développement (Tuan *et al.*, 1992, Ashe *et al.*, 1997).
- Le *linking model*, proposé par Bulger et Groudine (Bulger et Groudine, 1999), stipule que le LCR, via ses sites de liaison pour différents facteurs de transcription, conduit à la formation d'une chaîne protéique qui s'étend du LCR au promoteur du gène à activer, définissant ainsi un domaine de transcription (revu par Li *et al.*, 2002).

1.2.3 Spécificité des HS

Chaque élément du LCR serait donc important pour lui permettre d'exercer son activité d'*enhancer* et permettre l'ouverture de la chromatine. Nous allons maintenant voir les spécificités de chacun de ces HS au niveau du locus humain de la β -globine.

- HS1

Situé à environ 6 kb en amont du gène ϵ , le site HS1 n'exercerait pas d'activité forte d'*enhancer* (Pruzina *et al.*, 1991). Il conduit à une faible augmentation de la transcription de la globine, de façon équivalente à tous les stades de développement (Fraser *et al.*, 1993). Cependant, il permettrait d'augmenter l'effet de HS2, et HS3 lorsque l'un de ceux-ci lui est lié (Collis *et al.*, 1990). La délétion de HS1 rend le transgène susceptible à l'effet de positionnement dans des souris transgéniques (Milot *et al.*, 1996). Le site HS1 contient deux motifs de liaison pour le facteur de transcription GATA-1 (revu par Hardison *et al.*, 1997). Pasceri et collaborateurs ont confirmé par des expériences de *footprinting* que GATA-1 et Sp1 liaient bien le site HS1 dans des cellules MEL (Pasceri *et al.*, 1998).

- HS2

HS2 fonctionne comme un *enhancer* majeur tout au long du développement (c'est à dire autant avec les gènes ϵ , β , que γ) ; tant en transfection transitoire que stable, et aussi dans des souris transgéniques (Tuan *et al.*, 1987, Collis *et al.*, 1990). Cependant pour cette activité d'*enhancer* la présence d'un autre HS ou de plusieurs copies de HS2 est requise (Ellis *et al.*, 1993).

Au niveau du site HS2, on retrouve une répétition en tandem de sites MARE (*Maf Repeat Elements*). Ces sites MARE constituent des sites de liaison pour le facteur de transcription NF-E2, et jouent un rôle essentiel dans l'activation de la transcription (Talbot *et al.*, 1991) via le recrutement de l'Histone Acétyltransférase CBP et de l'ADN Polymérase II (Johnson *et al.*, 2002). Même si le motif MARE est primordial pour l'activation d'un transgène, il ne conduit cependant pas à une activation maximale, donc le recrutement d'autres protéines est également important pour l'activation de la transcription par HS2. Le site HS2 comporte aussi des sites de liaison pour GATA-1 (Talbot *et al.*, 1990), des E-Box qui sont des sites de liaison pour des facteurs de transcription de la famille b-HLH comme SCL/TAL1 (Elnitski *et al.*, 1997). La liaison de NF-E2 au niveau de HS2 permettrait également le déplacement de nucléosomes lors de l'activation de la globine (Armstrong et Emerson, 1996).

- HS3

Le site HS3 exerce une activité d'*enhancer* (Philipsen *et al.*, 1990) lorsqu'il est intégré à la chromatine, mais celle-ci serait moins importante que HS2, qui lui est également actif lors de transfections transitoires (Tuan *et al.*, 1989). Il joue un rôle important lors du développement embryonnaire (Fraser *et al.*, 1993) : pour l'expression des transgènes humains ϵ dans le sac vitellin et γ dans le foie fœtal de souris transgéniques (Peterson *et al.*, 1996, Navas *et al.*, 1998). Intégré en simple copie, le site HS3 est capable de conduire à une expression indépendante du site d'intégration, d'où la possibilité qu'il ne joue pas seulement un rôle d'*enhancer*, mais également d'ouverture de la chromatine (Ellis *et al.*, 1996).

Parmi les sites de liaison pour des facteurs de transcription retrouvés au niveau de HS3, nommons 4 sites GATA-1, importants pour l'activité du HS3 (Philipsen *et al.*, 1993), ainsi qu'un site de liaison pour NF-E2 et pour EKLF.

- HS4

Comme HS1, HS4 aurait une faible activité d'*enhancer* (Pruzina *et al.*, 1991). Comme pour le site HS3, cette activité est efficace seulement dans un contexte de chromatine. Des expériences de délétions de HS4 montrent qu'il joue un rôle pour l'expression du gène β -globine adulte, mais sa délétion a peu d'effet sur l'expression des gènes ϵ et γ (Fraser *et al.*, 1993, Navas *et al.*, 2001). La présence de HS4 permet une action synergique sur l'efficacité des autres HS, puisqu'il permet d'augmenter l'expression lorsqu'il est présent avec d'autres HS (Collis *et al.*, 1990, Bungert *et al.*, 1995).

HS4 comporte, entre autres, des sites de liaison pour NF-E2 et GATA-1 (Stamatoyannopoulos *et al.*, 1995), et pour les facteurs de transcription ubiquitaires Sp1 et YY1 (Goodwin *et al.*, 2001).

- HS5

Le site HS5 comporte une homologie de séquence avec les MAR (*Matrix attachment Region*) (Li et Stamatoyannopoulos, 1994). De par sa position à l'extrémité 5' du locus, on a longtemps postulé qu'il jouerait un rôle d'insulateur. C'est-à-dire qu'il serait capable de bloquer l'activité d'un *enhancer* situé à proximité, servant ainsi de jonction entre deux groupes de gènes juxtaposés, comme c'est le cas pour la β -globine et le locus de gènes olfactifs. Mais il serait également capable de servir de barrière entre deux domaines de chromatine, en particulier pour empêcher l'influence de structures de chromatine environnantes, comme cela a été démontré pour le site HS4 du locus de globine de poulet. Ces deux activités peuvent être dissociées en fonction de leur nécessité pour le facteur CTCF : l'activité de bloqueur d'*enhancer* est dépendante de CTCF, tandis que celle de bloqueur de l'effet de positionnement en est indépendante (Yao *et al.*, 2003).

Tandis que l'inversion du LCR peut conduire à une abolition de l'expression de la β -globine (Tanimoto *et al.*, 1999), l'inversion du seul HS5 en diminue l'expression (Tanimoto *et al.*, 2003), donc HS5 aurait bien une activité de bloqueur d'*enhancer*.

Le site HS5, hématopoïétique-spécifique (Li *et al.*, 2002b), comporte des sites de liaison pour les facteurs de transcription GATA-1 et NF-E2 (Li *et al.*, 1999b), mais aussi pour le facteur de transcription ubiquitaire CTCF (Farrel *et al.*, 2002). Cependant une récente étude par Wai et collaborateurs conclue que HS5 est plutôt érythroïde-

spécifique. De plus, il ne remplirait pas les conditions pour être qualifié d'insulateur *in vivo*, puisqu'il peut bloquer l'activité d'un *enhancer* dans des cellules érythroïdes embryonnaires, mais pas dans les cellules érythroïdes adultes (Wai *et al.*, 2003).

1.2.4 Facteurs de transcription au locus de la β -globine

- Facteurs Ubiquitaires importants dans les HSC (revu par Zhu *et al.*, 2002)

USF (*Upstream Stimulatory Factor*) est un facteur de transcription de la famille bHLH ; il reconnaît la séquence consensus *E-box* (CACGTG), et est impliqué dans l'activation d'une grande variété de gènes, dont la β -globine (Bresnick et Felsenfeld, 1993, Caterina *et al.*, 1994).

Sp1 est un facteur de transcription à motif en doigt de zinc, qui a pour séquence consensus la boîte GC et aussi dans une moindre mesure la boîte CACC reconnue par le facteur EKLF, au niveau des promoteurs de β -globine (Caterina *et al.*, 1994).

YY1 joue un rôle d'activateur et de répresseur selon le contexte, et est impliqué dans une variété de processus cellulaires comme la prolifération et la différenciation. Au niveau du locus de la β -globine, il interagit en particulier avec d'autres protéines, comme GATA-1 et Sp1 (Antoniou *et al.*, 1995).

- Facteurs de transcription érythroïdes-spécifiques

GATA-1 a été le premier facteur de transcription érythroïde spécifique identifié. Il reconnaît la séquence consensus (T/A)GATA(A/G). Ses sites de liaison sont extrêmement conservés, au niveau de HS1, HS2, HS3, et HS4, mais avec une liaison effectivement confirmée par *footprinting* au niveau de HS1 et HS2, ainsi qu'aux promoteurs des gènes de β -globine (revu par Hardison *et al.*, 1997). GATA-1 joue un rôle central dans l'érythropoïèse, et interagit avec de multiples facteurs de transcription, incluant EKLF, FOG1, Sp1, CBP/p300, Pu.1 (revu par Cantor et Orkin, 2002).

EKLF (*Erythroid Krüppel-Like Factor*) est un facteur de transcription à motif en doigt de zinc, dont la séquence consensus est CACCC (Donze *et al.*, 1995). Les

embryons déficients en EKLF montrent un développement normal jusqu'à la transition de l'érythropoïèse du sac vitellin vers le foie fœtal, au jour E11.5. Le *knock-out* est létal au jour E14.5, avec un défaut d'expression de la β -globine lors de l'hématopoïèse définitive (Nuez *et al.*, 1995). EKLF interagit avec les complexes de remodelage SWI/SNF (Armstrong *et al.*, 1998) d'où une implication dans le remodelage de la chromatine au niveau du locus de la β -globine. Il interagit aussi avec les facteurs Sp1 et GATA-1 (revu par Cantor et Orkin, 2002). Des sites de liaison pour EKLF sont présents à la fois au niveau du site HS3 et du promoteur du gène β -globine.

NF-E2 (*Nuclear Factor Erythroid-derived 2*), est un hétérodimère composé de deux sous-unités. La sous-unité p45, hématopoïétique-spécifique, est exprimée dans les lignées érythroïde et mégakaryocytaire, tandis que la sous-unité p18 est une protéine ubiquitaire de la famille MAF (revu par Andrews, 1998). NF-E2 est essentiel à la fonction d'*enhancer* exercée par le LCR de la β -globine, et sa liaison a été confirmée au niveau des sites HS2, HS3 et HS4 (Pomerantz *et al.*, 1998).

1.3 Régulation épigénétique

La régulation de l'expression des gènes est cruciale pour toute cellule ou organisme. Plusieurs moyens sont mis en œuvre pour parvenir à une régulation fine et spécifique du stade de développement, du cycle cellulaire ou encore du tissu considéré. La séquence de l'ADN est bien sûr très importante, mais les mécanismes de régulation épigénétique jouent aussi un rôle primordial. Plusieurs processus interdépendants sont impliqués pour permettre une régulation fiable et dynamique de l'activation des gènes. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer la méthylation de l'ADN, l'interférence de l'ARN, le remodelage de la chromatine, les modifications des histones (modifications covalentes ou variants des histones) ou encore l'interaction avec des complexes activateurs ou inhibiteurs de la transcription.

1.3.1 La méthylation de l'ADN

Le patron de méthylation de l'ADN est déterminant pour l'activation ou l'inactivation de gènes, et est donc lié à une régulation transcriptionnelle. La

méthylation de l'ADN a lieu au niveau des résidus cytosine de dinucléotides CpG, par des enzymes appelées DNMT (DNA-Méthyl-Transférase). Cette marque stable est transmise à chaque division cellulaire, et après la réplication de l'ADN. Parmi l'ensemble des dinucléotides CpG retrouvés au sein du génome, 70% sont méthylés, tandis que les 30% restants, appelés îlots CpG, restent non-méthylés et sont retrouvés à proximité des promoteurs des gènes domestiques (*housekeeping genes*). La méthylation de l'ADN est à la base de la répression des gènes lors de l'inactivation du double chromosome X chez les femelles de mammifères, mais aussi dans les phénomènes d'*imprinting* (revu par Bird, 2002).

Chez les mammifères, afin de rétablir le dosage de gènes entre les chromosomes X et Y, l'un des chromosomes X est inactivé chez la femelle. Ce processus, établi de façon aléatoire lors de la gamétogenèse et de l'embryogenèse, est ensuite transmis de façon stable aux cellules filles, et fait intervenir la méthylation de l'ADN en particulier au niveau du gène Xist (revu par Rakyan *et al.*, 2001).

Le phénomène d'*imprinting* désigne le fait que parmi les deux allèles d'un gène, l'un est exprimé tandis que l'autre, marqué d'une empreinte épigénétique, est réprimé. Certains gènes ont l'allèle paternel *imprimé*, c'est le cas du gène H19 qui est méthylé, tandis que pour d'autres c'est l'allèle maternel qui porte l'empreinte, cas du gène Igf2R (revu par Rakyan *et al.*, 2001).

Des expériences récentes montrent que la méthylation de l'ADN, via le recrutement de protéines liant l'ADN méthylé (MBP, *Methyl Binding Protein*) et d'histones déacetylases, permettrait de générer des structures de chromatine répressives à la transcription (Fuks *et al.*, 2000, et revu par Bird, 2002).

1.3.2 L'interférence d'ARN

L'interférence d'ARN est un phénomène de répression transcriptionnelle médié via la production de petits ARN non codants, complémentaires des ARN messagers (Hannon, 2002). Ce mécanisme de *silencing* conduit également à une altération du patron de méthylation de l'ADN dans le génome, et agit aussi en combinaison avec la modification des structures de la chromatine, en particulier dans la formation de structures d'hétérochromatine (revu par Vermaak *et al.*, 2003).

1.3.3 Les variations de structure de la chromatine

Le nucléosome, unité de base de la chromatine, est composé de 146 pb d'ADN enroulé autour d'un octamère de protéines histones H2A, H2B, H3, H4. Cet arrangement permet à l'ensemble du génome d'être compacté dans le noyau des cellules eukaryotes. Cette organisation de l'ADN joue aussi un rôle fonctionnel pour la cellule : elle permet à l'ensemble du génome d'être plus ou moins accessible à la machinerie de transcription, et aussi une régulation de l'expression des gènes (revu par Grunstein, 1997). La protéine histone H1 agit comme un pont pour stabiliser l'interaction entre deux nucléosomes, et permet d'ajouter un nouveau niveau de compaction à cette structure (revu par Brown, 2003).

Deux types de chromatine sont classiquement décrits, sous des caractères structuraux, mais aussi fonctionnels et moléculaires. L'euchromatine est caractérisée par une structure plutôt relâchée, accessible à divers complexes protéiques, et en particulier à la machinerie de transcription. On y retrouve préférentiellement l'ensemble des gènes actifs. Elle est caractérisée par une sensibilité à la digestion par des nucléases, comme la DNaseI. Par opposition, l'hétérochromatine apparaît comme une structure plus compacte dans le noyau des cellules en interphase, ce qui se traduit par une faible sensibilité à la digestion par des nucléases. Elle est également répliquée de façon plus tardive, et contient moins de gènes actifs, avec une forte proportion de séquences répétitives. Au niveau de l'hétérochromatine on retrouve également les régions centromériques, d'où le rôle essentiel joué par les structures de chromatine dans le maintien de la stabilité du génome, mais aussi dans la régulation de l'expression des gènes (revu par Richards et Elgin, 2002). On distingue par ailleurs l'hétérochromatine constitutive de l'hétérochromatine facultative, qui elle va être active selon le stade de développement ou dans une proportion de cellules.

Plusieurs modifications moléculaires sont associées à ces structures de chromatine, et vont en modifier l'accessibilité pour permettre ou non l'expression d'un gène. La chromatine n'est donc pas une structure rigide et statique dans le noyau des cellules, elle est au contraire en perpétuel remaniement pour permettre une expression

appropriée des gènes en fonction du cycle cellulaire, du stade de développement, ou du tissu considéré (revu par Felsenfeld et Groudine, 2003).

Parmi les mécanismes à l'origine des variations de structure de la chromatine, on peut citer le remodelage par les complexes ATP-dépendants, les modifications covalentes des histones, et le recrutement de divers cofacteurs, permissifs ou non à la transcription. Tous ces processus sont bien sûr importants pour la régulation de l'expression des gènes, mais ils sont également impliqués dans d'autres phénomènes cellulaires comme la réplication, la réparation ou la recombinaison (revu par Narlikar *et al.*, 2002). Les variants des histones, impliqués dans des mécanismes variés comme la réplication et la réparation, permettraient également d'influencer le niveau d'expression d'un gène (revu par Perche *et al.*, 2003).

Le remodelage de la chromatine fait intervenir des complexes de remodelage ATP-dépendants, et ce processus est conservé chez plusieurs organismes : *Saccharomyces*, *Drosophila*, et jusqu'aux mammifères. On distingue trois familles de complexes de remodelage de la chromatine, classées en fonction de l'homologie de la sous-unité ATPase du complexe : SWI-SNF, ISWI, et NuRD/Mi2/CHD. Ces larges complexes moléculaires utilisent l'énergie dégagée par l'hydrolyse de l'ATP pour perturber la liaison entre l'ADN et les histones, facilitant ainsi l'accès d'activateurs ou de répresseurs transcriptionnels (revu par Moazed, 2001). Ces complexes sont constitués de plusieurs sous-unités, et sont recrutés au niveau de promoteurs spécifiques via leur interaction avec des facteurs de transcription, ou bien encore avec des histone acétylases (HAT) ou des histone déacétylases (HDAC). On distingue deux types d'effets exercés par ces complexes de remodelage pour permettre une meilleure accessibilité de l'ADN : le glissement du nucléosome sur l'ADN (*sliding*) permet de varier la séquence d'ADN accessible, alors que le changement de conformation du nucléosome permet d'élargir de façon transitoire la séquence d'ADN exposée (revu par Narlikar *et al.*, 2002).

Un autre niveau de régulation épigénétique altérant la structure de la chromatine fait intervenir les modifications post-traductionnelles des histones. Ces

modifications covalentes apparaissent majoritairement au niveau des extrémités N-terminales (Nt) des histones, qui fournissent des sites potentiels de liaison pour de nombreuses protéines régulatrices. Parmi les modifications covalentes des histones, l'acétylation et la méthylation sont de loin les modifications les plus caractérisées dans la littérature (revu par Berger, 2001). D'autres modifications ont également été décrites, comme la phosphorylation de la Sérine 10 de l'histone H3, impliquée dans le contrôle de la prolifération (revu par Nowak et Corces, 2004), l'ubiquitination (revu par Zhang, 2003), l'ADP-ribosylation, ou encore la sumoylation (Shiio et Eisenman, 2003). Ces modifications peuvent exister en de multiples combinaisons sur les histones d'un même nucléosome, influencer l'apparition d'autres modifications ou encore être exclusives. Elles participent ainsi à l'élaboration d'un code des histones, qui non seulement influence la structure de la chromatine, mais facilite aussi le recrutement de cofacteurs transcriptionnels (revu par Strahl et Allis, 2000, Jenuwein et Allis, 2001, Agalioti *et al.*, 2002).

L'acétylation des histones par les Histones Acétyl-Transférases (HAT), se fait au niveau des lysines des extrémités Nt des histones. L'acétylation des histones est souvent associée à des zones de chromatine transcriptionnellement actives, tandis que les régions plus riches en histones déacétylées sous l'action des HDAC (Histones Déacétylases) se retrouvent plutôt au niveau de gènes inactifs (revu par Grunstein, 1997, et Fischle *et al.*, 2003).

On distingue un niveau global d'acétylation des histones au niveau du génome, qui résulte d'une balance entre acétylation et déacétylation, et une acétylation plus ponctuelle, associée aux promoteurs de certains gènes (Vogelauer *et al.*, 2000). Une étude récente montre que l'acétylation des histones au locus de la β -globine est importante pour la potentiation transcriptionnelle des progéniteurs hématopoïétiques et l'étape d'ouverture de la chromatine, mais ne serait plus requise lorsque le gène est actif, car pour ce qui est du maintien de l'activation d'un gène les facteurs de transcription viendraient prendre le relais (Bottardi *et al.*, 2003). Ainsi, ouverture de la chromatine et transcription constitueraient deux étapes distinctes dans l'activation d'un gène.

La déacétylation des histones constituerait un prérequis essentiel pour permettre d'autres modifications comme la méthylation des histones H3 sur la lysine 9, impliquée dans la répression transcriptionnelle (revu par Jenuwein et Allis, 2001). Divers agents peuvent être utilisés *in vitro* pour inhiber l'action de certaines HDAC, comme le TSA (Trichostatin A) ou le Sodium Butyrate. Ces traitements résultent en une augmentation de l'acétylation et parfois même en une activation transcriptionnelle (revu par Thiagalingam *et al.*, 2003).

La méthylation des histones joue également un rôle au niveau de l'accessibilité de la chromatine (revu par Zhang et Reinberg, 2001). On retrouve plusieurs résidus sur l'histone H3 pouvant être méthylés. La signification biologique de cette modification dépend du résidu méthylé : lysine (K4, K9, K27, K36, K79) ou arginine (R), mais aussi du degré de méthylation : on parle de mono-, di- ou tri-méthylation pour les lysines, tandis que les arginines peuvent être mono- ou di-méthylées (revu par Fischle *et al.*, 2003). Plusieurs enzymes responsables de la méthylation des histones ont été identifiées : les Histones Methyl Transférases (HMT). A ce jour, aucune déméthylase n'a été identifiée, ce qui suggère que la méthylation des histones est un phénomène important pour la mémoire épigénétique (revu par Hake *et al.*, 2004).

- Méthylation des histones et répression transcriptionnelle

La méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3K9) par l'enzyme HMT Suv39h1 (Rea *et al.*, 2000) est associée à une répression des gènes au niveau de l'hétérochromatine (Bannister *et al.*, 2001, Lachner *et al.*, 2001, Nakayama *et al.*, 2001) : en créant ainsi un site de liaison pour la protéine d'hétérochromatine HP1, cette modification pourrait conduire à la formation et au maintien d'une structure d'hétérochromatine stable.

La méthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27), médiée par le complexe *Polycomb* Esc-E(z) (Fischle *et al.*, 2003), est également impliquée dans la répression des gènes via le recrutement de la protéine *Polycomb* Pc.

Certaines enzymes sont capables de réaliser plusieurs modifications des histones ; ainsi, l'enzyme G9a est responsable de la méthylation de H3K27 (Tachibana *et al.*, 2001), mais aussi de H3K9 au niveau de l'euchromatine (Tachibana *et al.*, 2002).

- Méthylation des histones et activation transcriptionnelle

La méthylation de l'histone H3 aux résidus K4, K36, K79 est associée à une activation transcriptionnelle (revu par Fischle *et al.*, 2003).

La méthylation H3K4 par l'enzyme Set1p a tout d'abord été associée à une activation transcriptionnelle (Strahl *et al.*, 1999, Bernstein *et al.*, 2002), puis d'autres études ont montré que le niveau de méthylation est également important, et qu'en fait la diméthylation de H3K4 est retrouvée de façon générale dans l'euchromatine au niveau des gènes transcrits ou non transcrits, tandis que la triméthylation est spécifique des promoteurs de gènes transcriptionnellement actifs H3K4 (Santos-Rosa *et al.*, 2002, Schneider *et al.*, 2004).

1.3.4 Liaison de facteurs protéiques

La concentration relative en facteurs activant ou inhibant la transcription permet également d'influencer la structure de la chromatine au niveau d'un locus donné (revu par Dillon et Festenstein, 2002). On parle bien sûr des facteurs de transcription, qui peuvent être tissu-spécifiques ou encore ubiquitaires. Mais il s'agit également des facteurs pouvant inhiber la transcription, comme par exemple les protéines associées à l'hétérochromatine telles Polycomb (McMorrow *et al.*, 2000, Lavigne *et al.*, 2004) et HP1 (Festenstein *et al.*, 1999).

Les facteurs de transcription impliqués lors de hématopoïèse ont été décrits précédemment lors de l'introduction, aussi nous citons comme exemple le facteur de transcription EKLF et sa relation avec des complexes de remodelage de la chromatine. EKLF peut s'associer à la sous-unité BRG1 d'un complexe de remodelage SWI/SNF appelé E-RC1 (Armstrong *et al.*, 1998), dont l'activité est également régulée par l'interaction avec des HAT (Zhang *et al.*, 1998).

Parmi les facteurs impliqués dans la répression transcriptionnelle, nous pouvons citer la protéine d'hétérochromatine HP1. Découverte initialement chez *Drosophila*, elle est préférentiellement localisée au niveau de l'hétérochromatine péricentromérique (James et Elgin, 1986, Eissenberg *et al.*, 1990), où elle est capable de modifier l'expression d'un transgène : *miniwhite* (Eissenberg 1992, Wallrath, 1998). De même chez les mammifères, HP1 est associée à l'hétérochromatine péricentromérique (Minc *et al.*, 1999, Nielsen *et al.*, 1999). La protéine HP1 est également retrouvée chez plusieurs organismes, dont *Saccharomyces pombe* (Swi6). Chez les mammifères on décrit plusieurs isoformes ayant chacun une distribution particulière au niveau de la chromatine : HP1 α et HP1 β (MOD1/M31 chez la souris) sont retrouvées au niveau des zones péricentromériques, tandis que HP1 γ (MOD2/M32) est également retrouvée au niveau de zones d'euchromatine (Minc *et al.*, 2000).

La structure de la protéine est extrêmement conservée, avec en extrémité N-terminale le *chromo-domain* (*chromatin organisation modifier*), domaine commun aux protéines *Polycomb*, responsable de l'interaction avec H3K9 (revu par Hake *et al.*, 2004), et un *chromo-shadow-domain* en C-terminal, responsable des interactions protéiques ; ces deux domaines sont reliés par une région centrale, le *hinge*, qui serait capable de lier l'ADN et l'histone *linker* H1 (revu par Eissenberg, 2001).

HP1 serait un élément capital pour l'établissement de structures d'hétérochromatine, mais une étude récente suggère que d'autres molécules pourraient également être impliquées, notamment au niveau de l'hétérochromatine facultative (Gilbert *et al.*, 2003). Néanmoins, plusieurs travaux démontrent que la protéine HP1 est capable de modifier l'expression d'un transgène soumis à un effet de positionnement chez les mammifères (Festenstein *et al.*, 1999), mais également de réprimer des gènes situés dans des zones d'euchromatine (Nielsen *et al.*, 2001, Hwang *et al.*, 2001).

1.4 Résumé

1.4.1 Régulation épigénétique au locus de la β -globine lors de l'hématopoïèse

Différenciation et potentiation transcriptionnelle font intervenir l'activation de gènes selon un programme spécifique à chaque tissu, mais qui varie également en fonction du stade de développement. L'hématopoïèse constitue un bon modèle pour élucider les mécanismes impliqués dans l'activation d'un gène. De plus, elle peut être récapitulée *in vitro* à partir de cellules ES, en reproduisant fidèlement le patron d'expression des gènes lors du développement, et en particulier celui de la β -globine, dont l'expression est spécifique de la lignée érythroïde. Ce programme d'activation nécessite un contrôle fin pour activer l'expression d'un gène au moment approprié, et fait donc intervenir plusieurs niveaux de régulation. Si la séquence de l'ADN est importante pour permettre le recrutement de facteurs spécifiques, notamment au niveau du LCR et des promoteurs des gènes du locus, la régulation épigénétique permet d'ajouter un niveau de régulation supplémentaire. Les mécanismes de régulation épigénétique comprennent la méthylation de l'ADN, la répression par ARN interférence, le remodelage de la chromatine et les modifications des histones. De plus en plus d'études montrent à quel point ces mécanismes sont interdépendants et permettent également d'influencer la liaison de protéines régulatrices de la transcription.

1.4.2 Rationalisation

L'expression de gènes est soumise à leur régulation épigénétique via l'interaction de protéines impliquées dans la transcription avec des séquences cibles sur l'ADN. Plusieurs maladies découlent d'ailleurs d'une expression altérée de certains gènes lors du développement et/ou de la différenciation, d'où l'importance de mieux comprendre comment s'exerce cette régulation. Elucider les mécanismes de régulation épigénétique apparaît également important dans le cadre de développement de vecteurs pour la thérapie génique, puisque de son site d'intégration dépend le niveau d'expression d'un gène/transgène. De nombreuses études prennent comme modèle l'activation du gène de la β -globine lors de l'hématopoïèse. Cette régulation implique le LCR de la globine, dont la principale caractéristique est de permettre une

expression forte, tissu-spécifique du gène qui lui est lié (Grosveld *et al.*, 1987). Parmi les éléments du LCR, HS2 joue un rôle prépondérant dans l'activation de la β -globine, à tous les stades de différenciation, lorsqu'il est présent en copies multiples ou en la présence d'un autre HS (Ellis *et al.*, 1993).

L'objectif de ce projet est donc d'établir un modèle permettant d'élucider les mécanismes moléculaires associés à l'activation d'un gène lors de la différenciation. Puisque les modifications épigénétiques permettent d'influencer l'expression des gènes/transgènes, on se propose de caractériser les variations de structures de la chromatine conduisant à l'activation du gène de la β -globine lors de l'hématopoïèse, grâce à l'étude des variations de structures de la chromatine du transgène lors de la différenciation *in vitro* de cellules ES.

Tandis qu'un LCR complet conduit à une expression forte, indépendante du site d'intégration mais dépendante du nombre de copies (Grosveld *et al.*, 1987), un LCR partiel rend le transgène soumis aux effets de positionnement (revu par Li *et al.*, 2002a). L'étude d'un transgène est un bon indicateur de la structure de la chromatine au site d'intégration et sa caractérisation permet donc de mieux comprendre les mécanismes moléculaires liés à l'activation d'un gène.

Les sites HS2 et HS3 du LCR de la β -globine jouent un rôle d'*enhancer* prépondérant dans le LCR, mais HS2, seul, n'est pas capable de conduire à l'activation d'un transgène (Ellis *et al.*, 1993). On se propose donc d'utiliser comme construction un transgène comprenant un LCR partiel, susceptible de rendre le transgène soumis aux structure de chromatine au site d'intégration. Ce LCR partiel comprend les sites HS1 et HS2, pour permettre un bon niveau d'expression du transgène. Nous pourrons ainsi comparer le patron d'expression du transgène lors de la différenciation et les modifications épigénétiques qui y sont liées.

Afin de vérifier quand se prend la décision d'activer un gène lors de l'hématopoïèse, et si l'établissement et/ou le maintien de la régulation épigénétique est différent en fonction de la présence de HS2, nous allons suivre l'expression de ce

transgène au cours de la différenciation hématopoïétique. La culture *in vitro* des HSC, tout comme leur manipulation génétique, constitue un processus difficile, mais ces obstacles peuvent être contournés en utilisant comme modèle des cellules embryonnaires ES. En effet, la différenciation *in vitro* des cellules ES récapitule au moins partiellement les étapes précoces de l'érythropoïèse, ce qui en fait un bon modèle pour élucider le processus d'activation du transgène lors de la différenciation ou du développement, et les mécanismes de régulation épigénétique qui en sont à l'origine.

Enfin, plusieurs études ont montré qu'il est possible, grâce à la concentration en protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle, de modifier l'expression d'un transgène ; on pourra donc vérifier ce qu'il en est au cours de la différenciation, en quelle mesure on peut modifier le profil d'expression et l'ouverture de la chromatine, et comment celui-ci est maintenu lors de la différenciation.

1.4.3 Objectif

L'objectif du projet est donc d'établir des lignées de cellules ES contenant un gène humain de la β -globine sous le contrôle d'un LCR partiel, et de vérifier l'expression du transgène et le statut de la chromatine, à la fois lors de la prolifération et de la différenciation hématopoïétique.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Clonage

Le plasmide pEV-Puro (Wyatt *et al.*, 2000) contient le micro-LCR de la β -globine humaine, composés des domaines principaux (*core*) des sites hypersensibles HS1, HS2, HS3, HS4. Il contient également une région de 500 pb contenant le promoteur du gène β , et la séquence du gène β comprenant β IVS2 - exon 3 - polyA. Le plasmide comporte également un gène de résistance à la puromycine (puro^R), permettant une sélection dans les cellules de mammifères.

Le fragment GFP est extrait du plasmide pEGFP-N1 (*Clontech*) par une digestion avec les enzymes *Bgl II* et *Not I* (*New England Biolab*, ou *NEB*) et purifié par électrophorèse sur gel d'agarose, puis inséré dans le vecteur pEV-Puro en aval du promoteur grâce à l'enzyme *T4 DNA ligase* (*NEB*). On réalise ensuite l'insertion d'une séquence LoxP (34 pb) en amont du promoteur de β -globine.

Après digestion par *Alw44 I* (*Promega*), on isole par électrophorèse un fragment de 8.6 kb, comprenant HS2-HS1, β -promoteur, GFP, β -globine (β IVS2-exon 3-polyA) et pgk-puro^R. Ce fragment sera désormais appelé **HS12GFP**.

2.2 Culture cellulaire

Les cellules ES de la lignée R1 sont cultivées sur 0.1% gélatine dans un milieu de culture ES composé de DMEM (*Gibco BRL*) avec 10% de FBS caractérisé (*Hyclone*) et de milieu conditionné par des cellules BRL, supplémenté avec 1% d'acides aminés non-essentiels (*Gibco BRL*), 1% de β -mercaptoéthanol (*Sigma*), et 1 U/ml de LIF recombinant. Les cellules sont passées aux 2 jours, selon la confluence. La confluence maximale utilisée pour toutes les expériences n'excède pas 70%, afin d'éviter toute induction d'une différenciation spontanée.

Pour la transfection, 5×10^6 cellules R1 resuspendues dans 400 μ l de PBS sont électroporées avec 20 μ g d'ADN, à 400 V, 1200 μ F (*EC100 Electroporator*, *E-C Apparatus Corporation*), puis incubées 10 minutes sur glace. Les cellules sont ensuite remises en culture dans du milieu de culture ES. Après 24 heures, elles sont mises en sélection en présence de puromycine (*Sigma*) à une concentration finale de 2 μ g/ml.

2.3 Production de LIF recombinant et titration

On réalise une transfection transitoire de cellules Cos-7 par électroporation à 200 V, 960 μ F, 200 Ω (*Gene Pulser, BioRad*), avec 4×10^6 cellules et 20 μ g d'ADN plasmidique LIF (don de Dr David Lohnes). Le milieu est changé 24 heures après l'électroporation. Cinq jours après électroporation, le milieu contenant le LIF sécrété est récolté et filtré et on teste l'efficacité du LIF ainsi produit sur la lignée myéloïde M1.

Le LIF induit la différenciation de cellules M1 en macrophages, caractérisée par une augmentation de l'expression du marqueur Mac-1 à la surface des cellules M1. Brièvement, les cellules (50 000 cellules / ml) sont incubées pendant 5 jours avec des concentrations variées de LIF recombinant ou de LIF commercial qui sert de référence, en diluant les cellules chaque jour à 50 000 cellules viables / ml.

Puis les cellules sont marquées successivement pendant 30 minutes sur glace avec l'anticorps anti-Mac-1 isolé à partir d'un hybridome, puis d'un anticorps secondaire Goat anti-Rat-PE (*Pharmingen*). Par FACS, on analyse le pourcentage de cellules qui expriment Mac-1 à leur surface, ainsi que l'intensité de fluorescence obtenue, et on compare avec les résultats obtenus avec du LIF déjà titré, afin d'en déterminer l'efficacité.

2.4 Southern blot

L'ADN génomique est extrait à partir des différents clones de cellules ES sélectionnés, et digéré pendant 18 heures avec les enzymes de restriction (*Eco RI, Bgl II ou Asp 718*). Puis, après migration sur gel d'agarose 0.8%, l'ADN digéré est transféré sur membrane de nylon (*Hybond N+, Amersham Biosciences*). Cette membrane est hybridée avec une sonde spécifique pour le transgène (HS1, β IVS2) ou pour un endogène (Ca-II) afin de déterminer le nombre de copies dans chaque clone. Le marquage des sondes est réalisé par *random priming* (Sambrook *et al.*, 1989). Les résultats sont scannés sur *Phosphor-Imager (Storm 540, Amersham Pharmacia Biotech)*, et analysés à l'aide du logiciel *ImageQuant5.2*.

2.5 Cytométrie en flux

Afin de détecter l'expression du transgène via la fluorescence émise par la protéine GFP, les cellules sont trypsinisées, resuspendues dans du PBS et analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un *FACScan* (*Becton Dickinson*). Les résultats sont analysés avec le logiciel *CellQuest*.

Le tri cellulaire est réalisé sur un appareil *FACStar* (*Becton Dickinson*).

2.6 Sensibilité à la DNaseI

Un culot cellulaire est resuspendu dans une solution de RSB (100 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 30 mM MgCl₂) à laquelle on rajoute 0.5 % de NP40 pour perméabiliser les cellules. Pour chaque échantillon, 4x10⁵ cellules sont digérées pendant 30 minutes sur glace avec des concentrations croissantes de DNaseI (*Roche*). Après 18 heures d'incubation à 55°C en présence de Protéinase K, l'ADN est purifié et resuspendu dans 40 µl d'H₂O.

La taille moyenne des fragments obtenus est déterminée par buvardage de type *Southern* avec 2 µl de chaque échantillon, et hybridation avec une sonde d'ADN génomique de cellules ES digéré par *Eco RI*.

Les résultats sont ensuite obtenus en réalisant des PCR radioactives semi-quantitatives en duplex. Ces réactions amplifient simultanément deux régions d'ADN : la première se situe au niveau du transgène (HS1) ; la seconde amplifie une séquence endogène, au niveau du promoteur du gène *gapdh*. Les amorces utilisées sont les suivantes :

HS1	sens	CAG AAT GCT CCT GCT ATT GCC
	antisens	CTG GTC ACT TTA GCC CTC ACG
<i>gapdh</i> -promoteur	sens	CAG CTA CTC GCG GCT TTA C
	antisens	CTG GCA CTG CAC AAG AAG A

Les conditions de PCR sont les suivantes : dénaturation de 3 min à 94°C, puis 31 cycles d'amplification : 45 sec à 94°C, 45 sec à 60°C et 45 sec à 72°C, suivis d'une élongation finale de 10 min à 72°C.

Pour toutes les réactions de PCR, on vérifie que l'amplification est linéaire pour une concentration croissante d'ADN. L'intensité des bandes obtenues est quantifiée par *Phosphor-Imager*, en normalisant le signal obtenu pour HS1 par rapport à celui de *gapdh* dans chaque réaction. Le ratio sensibilité/insensibilité est établi à partir d'échantillons d'ADN non-traités à la DNaseI.

Les résultats sont représentés sous forme de graphes montrant le ratio d'amplification HS1/*gapdh* obtenu par PCR (i.e. sensibilité à la DNaseI) en fonction de concentrations de DNaseI croissantes.

2.7 Différenciation *in vitro* de cellules ES

Avant d'amorcer la différenciation des cellules ES, celles-ci sont passées dans du milieu ES contenant de l'IMDM (*Gibco BRL*) supplémenté en LIF, pour deux jours. Puis on réalise une dilution des cellules à 50 000 cellules/ml dans du milieu EB composé d'IMDM, 10% FBS, 1% d'acides aminés non-essentiels (*Gibco BRL*), 1% de β -mercapto-éthanol (*Sigma*), et supplémenté avec 10 ng/ml d'IL-3 recombinante murine, 1 U/ml d'EPO, et 450 μ M de Monothioglycérol (MTG, *Sigma*). Les corps embryonnaires (EB) se forment par gravité dans des gouttes de 20 μ l sur le couvercle d'un *petri* bactériologique, ou encore par agrégation des cellules en milieu liquide. Après 2 jours, les EB sont récoltés et incubés en suspension dans 15 ml de milieu EB pendant 4 jours. Puis ils sont récoltés, lavés deux fois dans du PBS, et dissociés par l'action de trypsine-EDTA (*Gibco BRL*) lors de passages répétés dans une seringue stérile avec une aiguille 18 ^{1/2}G (*Becton Dickinson*). Les cellules issues de ces EB sont ensuite utilisées pour analyse au FACS, ou encore pour réaliser des essais clonogéniques.

2.8 Essai clonogénique

On enseme 1 ml de méthylcellulose (*M3231, Stem Cell Technologies*) supplémentée avec 10 ng/ml d'IL-3 recombinante murine, 50 ng/ml de SCF recombinant murin, 10 μ g/ml d'insuline recombinante humaine, et 10^{-4} M de β -

mercapto-éthanol (*Sigma*) avec 50 000 cellules issues de EB au jour 6 de différenciation.

L'apparition de colonies est décomptée visuellement chaque jour, et au jour 10 après ensemencement les colonies sont récoltées et analysées par FACS afin d'évaluer le pourcentage d'expression du transgène.

2.9 Traitement des cellules ES et des EB au TSA ou 5-aza-Cytidine

Le Trichostatin A (TSA, *Sigma*) est dilué dans de l'éthanol, et le 5-aza-Cytidine (5aza-C, *Sigma*) dans du PBS.

Les cellules ES sont traitées au TSA à une concentration de 50 à 300 nM ou avec un volume équivalent d'éthanol, pour une période de 16h, suivie d'un temps de récupération des cellules de 4 heures ; alternativement, les cellules issues des EB sont traitées avec 20 nM de TSA pendant 48h.

Pour les EB, du TSA à la concentration finale de 20 nM est ajouté au milieu de culture aux jours 2 ou 4 de différenciation, et les cellules sont analysées par FACS au jour 6 de différenciation.

Le traitement au 5aza-C est initié 24 heures après le passage des cellules. Ces dernières sont traitées pour 48 heures à des concentrations de 0.5, 1, 2, et 4 μ M de 5aza-C ou d'un volume équivalent de PBS, puis elles sont passées et cultivées pendant 3 jours avant d'être récoltées pour l'analyse par FACS.

3 RESULTATS

3.1 Stratégie de clonage

La présence du LCR de la β -globine conduit à une expression forte, tissu-spécifique et indépendante du site d'intégration du transgène qui lui est lié. Cependant, dans le LCR tous les sites HS semblent importants pour exercer à la fois cet effet d'enhancer et d'ouverture de la chromatine, et la délétion d'un site parmi HS2, HS3 ou HS4 rend le transgène susceptible à l'effet de positionnement (Bungert *et al.*, 1995, Milot *et al.*, 1996). Afin d'élucider les mécanismes conduisant à l'activation du gène de β -globine lors de la différenciation, nous avons décidé d'intégrer à notre construction un LCR partiel. Ceci afin de faciliter l'obtention de clones où le transgène montre une expression variée et dépendante des structures de chromatine au niveau de son site d'intégration.

Le plasmide de départ contient un micro-LCR, (Whyatt *et al.*, 2000), composé des domaines *core* des sites hypersensibles HS1, HS2, HS3 et HS4. Une séquence comprenant 18 pb de l'exon 2, l'intron 2 (β IVS2), l'exon 3 et la queue poly-A du gène humain de la β -globine est placée sous le contrôle d'un promoteur de β -globine (environ 500 pb) ; cette séquence, appelée par la suite β IVS2, est comprise entre les sites *Bam*HI et *Xba*I. Le vecteur comporte un gène de résistance à la puromycine, sous le contrôle du promoteur *pgk*, pour permettre une sélection dans les cellules de mammifères.

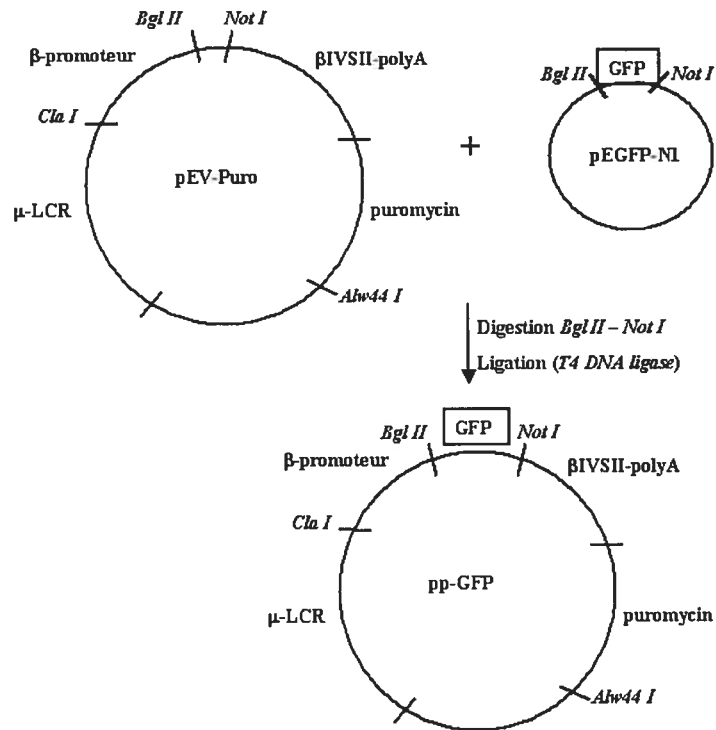
Nous avons décidé d'intégrer à notre construction un rapporteur GFP (*Green Fluorescent Protein*), placé sous le contrôle du promoteur de la β -globine. La protéine GFP, provenant de l'organisme *Aequorea victoria*, est un outil de plus en plus utilisé puisqu'elle permet la sélection des cellules exprimant le transgène sans faire intervenir de réaction chimique : visible au microscope fluorescent et identifiable par cytométrie en flux, elle permet également de trier les cellules par FACS selon leur niveau d'expression du transgène (revu par Hadjantonakis et Nagy, 2001).

Grâce au rapporteur GFP, placé sous le contrôle du promoteur de la β -globine dans notre construction, on peut donc visualiser l'expression du transgène et la variation de cette expression lors de la différenciation des cellules ES. On peut également sélectionner par FACS les cellules exprimant ou non le transgène, sur la base de leur statut GFP+ ou GFP-. Cet outil nous permettra ainsi d'approfondir l'étude sur des populations plus spécifiques, en fonction de leur profil d'expression du transgène, et de vérifier les différences à l'origine de cette variation d'expression.

Afin d'insérer le rapporteur GFP dans notre construction, on a donc procédé à une digestion du vecteur pEGFP-N1 (*Clontech*) avec les enzymes *Bgl II* et *Not I*, ce qui nous a permis d'isoler par électrophorèse un fragment de 766 pb correspondant à la séquence codante de la GFP. Ces sites de restriction sont uniques pour les deux vecteurs pEVpuro et pEGFP-N1. Le fragment GFP a ensuite été inséré dans le vecteur pEVpuro, linéarisé avec les mêmes enzymes, et lié en présence de T4 DNA ligase. Le schéma de ce clonage est représenté en figure 3, ainsi que le résultat de la digestion par électrophorèse. Une digestion avec les enzymes *Cla I* et *Not I* permet de confirmer l'intégration en simple copie de la séquence GFP au niveau du site d'intégration préalablement décrit, entre le promoteur de la β -globine et la séquence β IVS2. En effet, le gel d'agarose, après une digestion avec ces deux enzymes, montre bien que l'on passe d'un fragment de environ 500 pb, correspondant à la taille du promoteur de la β -globine, à un fragment de 1.3 kb.

De nombreuses études dans la littérature rapportent le phénomène de *repeat-induced-gene-silencing*, c'est-à-dire de répression transcriptionnelle induite par l'intégration d'un transgène en multi-copies (Dorer *et al.*, 1994, Garrick *et al.*, 1998, et revu par Henikoff, 1998). On s'attend donc à ce qu'une intégration en multi-copies conduise à une répression de l'expression du transgène. Cependant, d'autres études montrent que l'intégration en plusieurs copies n'aboutit pas nécessairement au *silencing* (Pikaart *et al.*, 1998, Mustkov *et al.*, 2004). De plus, le site HS2 du LCR de la β -globine n'est capable d'exercer son activité d'enhancer que lorsqu'il est présent en multi-copies (Ellis *et al.*, 1993). D'où l'intérêt de vérifier éventuellement l'effet d'une intégration de notre transgène en multicopies, versus une intégration en simple copie,

A.



B.

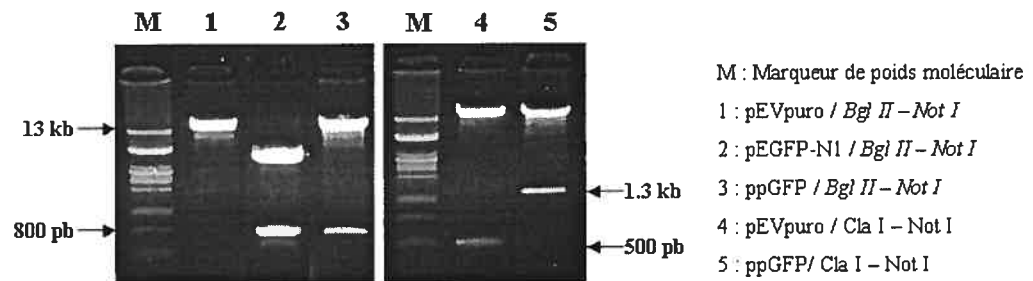


Figure 3 : Clonage du fragment GFP dans le vecteur pEV-Puro

A. Schéma du clonage du rapporteur GFP provenant de pEGFP-N1 dans le vecteur pEVpuro

B. Gel d'électrophorèse montrant la digestion des plasmides de départ pEGFP-N1 et pEVpuro par les enzymes *Bgl* II et *Not* I, et confirmation de l'insertion de GFP dans pEVpuro (ppGFP) par une digestion *Cla* I – *Not* I

sur le niveau d'expression du transgène, et de voir quels mécanismes en sont à l'origine. L'ajout d'une séquence *LoxP* unique au niveau du transgène permet donc de comparer ces données pour le même site d'intégration. En effet, cette séquence est reconnue par l'enzyme *Cre*, permettant ainsi l'excision par recombinaison de la séquence située entre deux sites *LoxP* adjacents.

Afin de réaliser l'insertion du site *LoxP* dans la construction, nous avons isolé une séquence *LoxP*. Ce fragment a ensuite été inséré dans le vecteur pEV-puro-GFP, au niveau d'un site unique *Cla I* situé en amont du promoteur de la β -globine. Comme la séquence *LoxP* ne comporte que 34 pb, nous avons ensuite réalisé une digestion du vecteur final par l'enzyme *Nco I* afin de confirmer l'intégration de la séquence *LoxP*. Le site *LoxP* comporte un site *Nco I*, qui vient donc remplacer le site *Cla I* du vecteur original et permet de confirmer son intégration par digestion. Le résultat de cette étape de clonage est illustré à la figure 4.

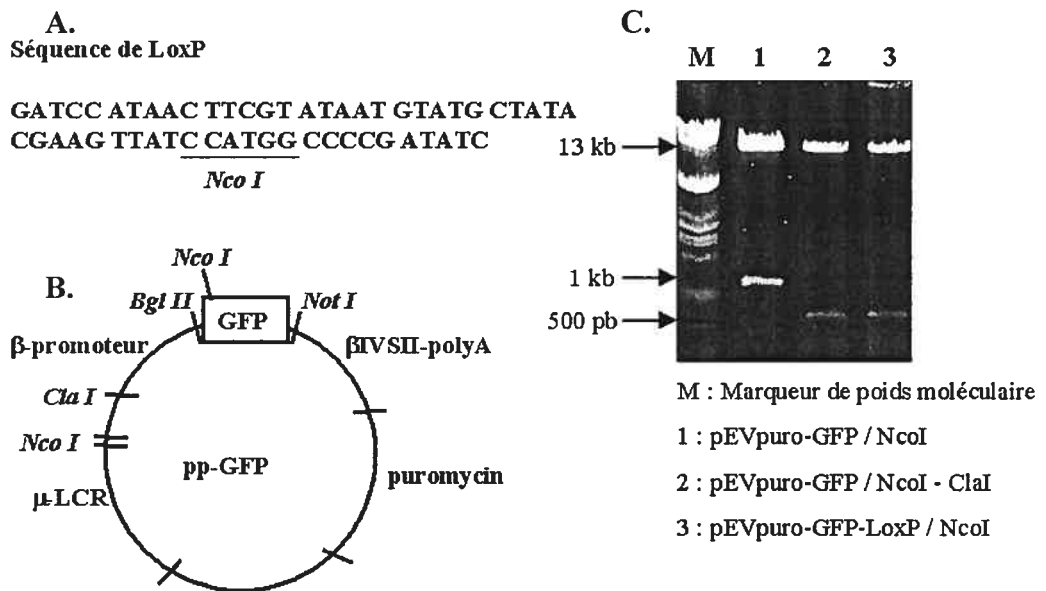


Figure 4 : Clonage du fragment *LoxP* dans le vecteur pEV-Puro – GFP

- Séquence *loxP*
- Schéma du plasmide pEVpuro-GFP, avec les sites de restriction *Cla I* et *Nco I*
- Confirmation de l'insertion du fragment *loxP* au niveau du site *Cla I*, par une digestion avec les enzymes *Nco I* et/ou *Cla I*

Notre construction comporte donc également un site *loxP*, qui peut être reconnu par l'enzyme Recombinase *Cre*. Le système *Cre/Lox* est un système de recombinaison isolé à partir du bactériophage P1, où l'enzyme *Cre* est capable de réaliser des événements de recombinaison entre deux séquences *LoxP* adjacentes (revu par *Kuhn et al.*, 2002). Le site *LoxP* introduit dans notre construction va donc permettre éventuellement de diminuer le nombre de copies du transgène, et aussi de vérifier l'influence d'une intégration en multi-copies versus simple-copie sur l'expression du transgène.

Enfin, une digestion de notre vecteur final par l'enzyme *Alw44 I* permet d'isoler le fragment d'intérêt HS12GFP de 8.3 kb, qui est prêt à être introduit de façon stable dans les cellules ES. Nous avons choisi d'inclure à notre construction un LCR partiel, puisque de nombreux travaux prédisent qu'il augmente les chances d'obtenir un effet de positionnement. Le site HS2 joue un rôle d'enhancer majeur (*Tuan et al.*, 1987, *Collis et al.*, 1990), et devrait donc permettre d'obtenir un bon niveau d'expression du transgène. Comme les sites HS2, HS3 et HS4 sont partiellement redondants (*Bungert et al.*, 1995 et 1999), nous avons décidé de nous concentrer sur l'effet de HS2 sur l'expression du transgène lors de la différenciation. Le site HS1 n'a, quant à lui, pas d'effet dominant sur l'activation du gène β , cependant son activité est importante puisqu'en son absence on n'obtient pas 100% d'activation de l'expression d'un transgène de β -globine (*Collis et al.*, 1990, et *Pasceri et al.*, 1998). De plus, comme dans un contexte génomique, l'activité d'enhancer du site HS2 n'est observée qu'en présence d'autres HS, ou encore lorsque le transgène est présent en plusieurs copies (*Ellis et al.*, 1993), nous avons décidé d'inclure le site HS1 à notre construction.

En résumé, la construction réalisée comporte un LCR partiel du locus humain de la β -globine, composé des sites HS1 et HS2. Une séquence du gène de β -globine, composée de 18 pb de l'exon 2, de l'intron 2 (β IVS2) et de l'exon 3, est sous le contrôle du promoteur du gène de β -globine. On a réalisé l'insertion d'un rapporteur GFP entre le promoteur et la séquence du gène β -globine. La construction comporte également un site *loxP* en amont du promoteur. Enfin, une séquence de résistance à la

puromycine, sous le contrôle du promoteur *pgk*, permet de sélectionner les clones contenant le transgène. Le schéma de cette construction est représenté à la figure 5.

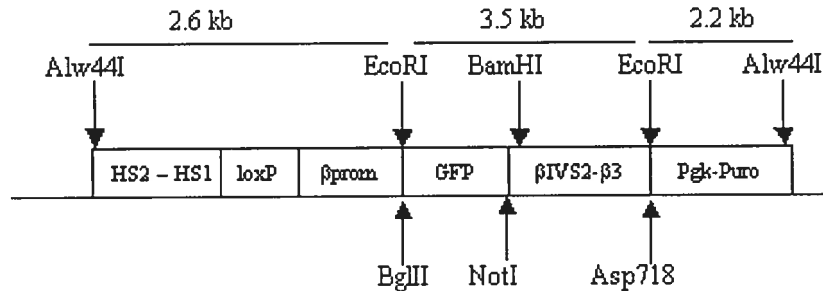


Figure 5 : Schéma de la construction HS12GFP

3.2 Obtention et caractérisation des clones de ES

3.2.1 Obtention des clones de cellules ES

Les cellules ES de souris sont des cellules embryonnaires pluripotentes, qui permettent de régénérer des animaux transgéniques après avoir été modifiées et cultivées *in vitro*, grâce à leur caryotype normal. De plus, sous des conditions de culture particulières, elles peuvent récapituler la différenciation de plusieurs lignées cellulaires, dont la lignée hématopoïétique. Ces caractéristiques font des lignées de cellules ES un outil de choix pour étudier les mécanismes de régulation épigénétique conduisant à l'activation ou à l'inactivation d'un gène lors de la différenciation, mais également *in vivo* après l'établissement de lignées de souris transgéniques à partir de ces cellules ES.

Parmi les différentes lignées de cellules ES disponibles, nous avons opté pour la lignée R1, établie en Août 1991 à partir de blastocystes au jour E 3.5, sur un fond génétique 129/Sv x 129/Sv-CP. La pluripotentialité de ces cellules a été confirmée par des expériences de génération d'embryons tétraploïdes (Nagy *et al.*, 1993, Wood *et al.*, 1993). Des cellules ES R1 ont été transfectées par électroporation avec le fragment HS12GFP. Après une semaine de sélection en présence de puromycine (2 µg/ml), les

clones sont repiqués dans une plaque à 96 puits en présence de puromycine, puis propagés pour les expériences suivantes.

3.2.2 Détermination du nombre de copies par hybridation Southern

Afin de vérifier la présence du transgène dans les clones de ES obtenus, et l'intégrité de la construction dans les clones sélectionnés, nous avons réalisé des hybridations de type *Southern* sur l'ADN isolé à partir des différents clones. Cet ADN génomique est digéré avec différentes enzymes de restriction (*Eco RI*, *BamHI*, *Bgl II*, *Asp 718*). L'hybridation de la membrane avec différentes sondes (HS1, GFP ou β IVS2 pour le transgène, Ca-II comme contrôle endogène) permet de déterminer le nombre de copies du transgène dans chacun des clones.

Le contrôle positif utilisé est de l'ADN génomique provenant d'une souris In2 hétérozygote, transgénique pour le locus humain complet de la β -globine. Les souris In2 ont une copie unique du locus humain de la β -globine (Strouboulis *et al.*, 1992). De l'ADN isolé à partir de cellules ES R1 *wild-type* sert de contrôle négatif.

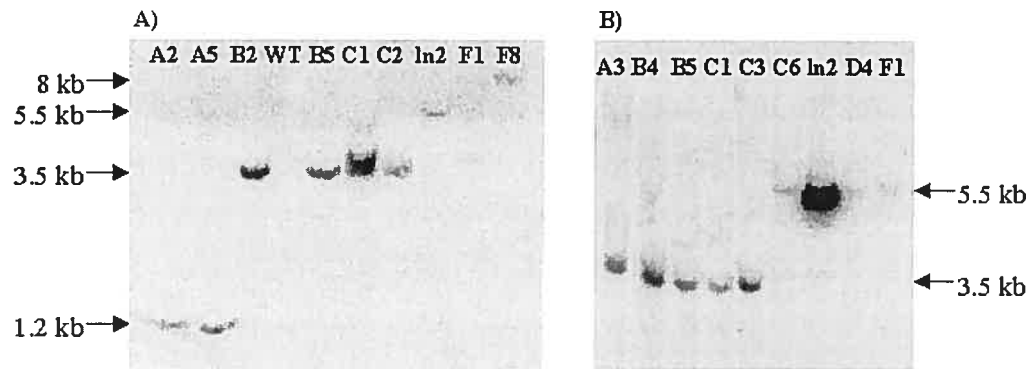


Figure 6 : Exemple d'hybridation Southern (Digestion *Eco RI* – Sonde β IVS2)

- A) Réarrangement des clones A2, A5, F8
- B) Réarrangement des clones C6, D4, F1

Lors d'une hybridation avec la sonde β -IVS2, après digestion par *EcoRI*, le fragment attendu pour le transgène est de 3.5 kb. Dans ces conditions, le fragment attendu pour In2 est de 5.5 kb. Comme il est montré à la figure 6, les clones B2, B5, C1 et C2 (figure 6a) d'une part et A3, B4 et C3 (figure 6b) d'autre part, montrent bien une hybridation spécifique avec β -IVS2 à 3.5 kb. Cependant les clones A2, A5, C6, D4, F1 et F8 présentent tous un réarrangement au niveau du fragment interne, avec des tailles de 1.2 kb pour les clones A2 et A5, de 5.5kb pour les clones C6, D4 et F1, ou encore 8 kb pour le clone F8.

Comme la sonde utilisée provient du locus complet de la β -globine, elle est totalement identique à la séquence contenue dans les souris In2. Ceci explique pourquoi nous obtenons une très forte hybridation pour notre contrôle positif (figure 6). La qualité de l'hybridation varie également avec la quantité d'ADN chargée sur le gel, qui dans ce cas est plus importante pour In2. Nous avons donc utilisé une hybridation complémentaire avec la sonde *Ca-II* pour normaliser les résultats, et aider à la quantification du nombre de copies du transgène pour les différents clones obtenus.

D'autres digestions (avec les enzymes *BamHI*, *Bgl II*, *Asp 718*), et des hybridations avec d'autres sondes (HS1, GFP), ont été réalisées afin de vérifier l'intégrité du transgène. Elles ont également permis de donner une estimation du nombre de copies du transgène HS12GFP intégré dans les différents clones de ES. Pour chacun de ces clones, il semble que le nombre de copies du transgène soit faible, avec en moyenne environ 3 copies par clone.

3.3 Expression du transgène au stade de cellules ES

3.3.1 Expression du transgène dans les clones HS12GFP

Afin de vérifier l'expression du transgène dans les clones HS12GFP, les cellules de chaque clone sont récoltées, resuspendues en une suspension unicellulaire dans du PBS et analysées en cytométrie en flux par détection de la fluorescence de la protéine GFP.

Le niveau d'expression de la GFP dans les clones nous permet de les classer en trois groupes, comme il est montré dans la figure 7 :

- le clone A3 a une expression forte du transgène, dans une proportion des cellules ;
- B2, B4, B5, C1, C2, et C3 expriment fortement le transgène (> 85 %) ;
- les clones A2, A5, C6, D4, F1, et F8 n'expriment pas le transgène (< 1 %).

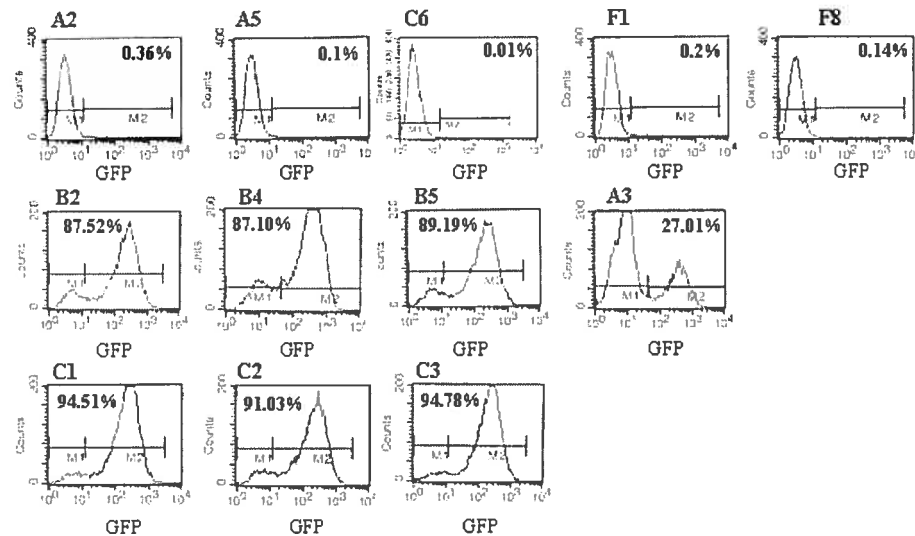


Figure 7 : Cytofluorimétrie en flux - Expression du transgène dans les clones HS12GFP au stade ES

Les cellules ES indifférenciées des différents clones sont resuspendues dans du PBS, et analysées par FACS afin de vérifier le pourcentage de cellules exprimant la GFP pour chaque clone. Les graphes représentent le nombre de cellules en fonction de leur intensité de fluorescence lors d'une expérience représentative.

Ces résultats concordent avec les résultats de *Southern*, puisque les clones qui présentaient un réarrangement au niveau interne du transgène n'expriment pas la GFP. Nous ne poursuivrons donc pas la caractérisation des clones réarrangés. Le clone A3 montre un pourcentage intermédiaire de cellules GFP+, et les autres clones montrent tous un fort pourcentage de cellules GFP+. Nous avons donc décidé de nous concentrer sur l'analyse de quatre clones, soient les clones A3, B4, C1 et C3 afin de poursuivre leur caractérisation.

Le LCR de la globine est capable de conférer une expression forte, tissu-spécifique des gènes de β -globine, au niveau des cellules érythroïdes. Or, ici, les clones B2, B4, B5, C1, C2, C3 montrent tous un pourcentage élevé de cellules exprimant le transgène, au stade de cellules ES. Le site HS2 se comporte comme un *enhancer* fort, ce qui pourrait être à l'origine du haut niveau d'expression du transgène observé dans ces clones au stade cellules ES. Cependant, dans la littérature il y a peu d'exemple d'expression de globine au stade ES, ce qui suggère que ce profil d'expression pourrait constituer une particularité de notre construction. Ainsi, une étude récente réalisée avec un transgène comprenant un micro-LCR et un promoteur β -globine montre une expression de globine au niveau de progéniteurs hématopoïétiques, mais qui demeure plus faible que dans les cellules érythroïdes qui en dérivent (Papayannopoulou *et al.*, 2000).

L'expression forte observée dans ces clones au stade de cellules ES pourrait cependant être attribuée à un effet *enhancer* du gène de résistance à la puromycine. En effet, l'agent de sélection présent dans le milieu de culture pourrait avoir comme effet de favoriser la sélection de clones dans lesquels le transgène est intégré dans une structure de chromatine favorable à la transcription. Ce biais dans la sélection de clones constitue un des aspects négatifs des transfections stables. Cependant, une étude montre que différents gènes de résistance n'exercent pas le même effet d'*enhancer*, ce qui pourrait d'ailleurs expliquer la disparité de résultats obtenus avec plusieurs agents de sélection (Mei *et al.*, 2000).

3.3.2 Expression du transgène HS12GFP dans le clone A3

Les cellules du clone A3 ont initialement montré une expression variable de la GFP, avec environ 20% des cellules seulement exprimant le transgène. Cependant, des acquisitions successives au FACS ont rapidement révélé que le pourcentage de cellules GFP+ détectées dans ce clone n'était pas constant selon les expériences. Nous avons alors analysé de façon plus précise cette variation d'expression de la GFP, et pour cela nous avons régulièrement vérifié par FACS le pourcentage de cellules exprimant la protéine GFP. Ce pourcentage semblait diminuer rapidement lors de la prolifération, ce qui laissait supposer que le clone A3 était soumis à un mécanisme d'extinction de l'expression du transgène HS12GFP. Ce phénomène d'extinction a déjà été décrit dans des cellules exprimant initialement un transgène, mais dont l'expression diminue lors de la prolifération ou de la différenciation (Laker *et al.*, 1998, et revu par Pannel et Ellis, 2001). Par opposition, le mécanisme de silencing implique une répression immédiate de l'expression du transgène dans les cellules qui l'ont malgré tout intégré de façon stable.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons trié les cellules GFP+ et GFP- à partir du clone A3, afin de les maintenir en culture et de vérifier s'il y avait ou non maintien du statut d'expression du transgène β -globine-GFP lors de la prolifération des cellules ES. En effet, si le statut d'expression du transgène demeure identique suite à la division des cellules ES, les cellules GFP- resteront GFP- après plusieurs divisions cellulaires. De même, les cellules GFP+ resteront GFP+. Par contre, s'il y a plasticité du statut d'expression, alors après plusieurs divisions cellulaires, nous devrions observer une population mixte contenant à la fois des cellules GFP+ et des cellules GFP-.

Le résultat de deux expériences, dont la pureté de tris était respectivement de 100 % et de 97.3 %, est illustré à la figure 8. Dans les deux cas, le pourcentage de cellules GFP+ diminue lors de la prolifération. De plus, la cinétique d'inactivation du transgène est relativement rapide, et complète en 15 passages.

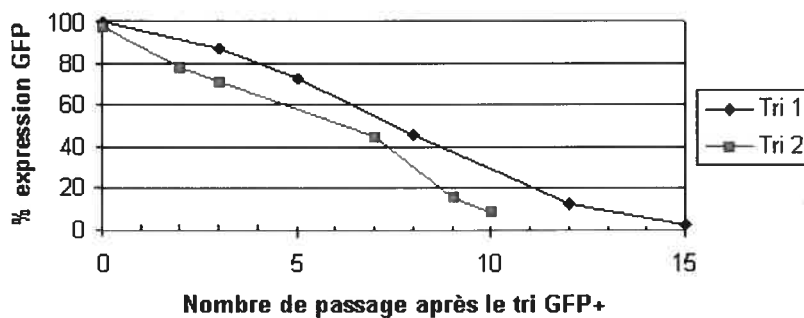


Figure 8 : Extinction du transgène HS12GFP dans le clone A3 lors de la prolifération

Les cellules GFP+ du clone A3 ont été triées par FACS à deux reprises. La population sélectionnée a ensuite été maintenue en culture avec ou sans puromycine, et analysée régulièrement par FACS afin de vérifier la variation d'expression du transgène lors de la prolifération.

Une autre possibilité permettant d'expliquer la diminution du pourcentage de cellules exprimant la GFP dans le clone A3 est que celui-ci subit une perte du transgène lors de la prolifération. Cependant, cette hypothèse semble peu vraisemblable, puisque le clone reste résistant à la puromycine, et ce quel que soit le pourcentage de cellules exprimant la GFP. De plus, une PCR et un Southern Blot réalisés avec de l'ADN issu du clone à différents moments montrent un signal positif pour le transgène, même dans le cas de cellules GFP-. Donc la variation dans le nombre de cellules du clone A3 exprimant le transgène lors de la prolifération semble bien être due à un phénomène d'extinction du transgène HS12GFP.

La population GFP- issue des tris de ce même clone A3 semble, par contre, stable lors de la prolifération : nous n'observons aucune réversion dans le statut d'expression de la GFP à partir de la population de cellules GFP- issue du clone A3.

3.3.3 Stabilité de l'expression du transgène dans les autres clones

Puisque le clone A3 montre une extinction du transgène lors de la prolifération, nous avons vérifié s'il en était de même pour les clones qui exprimaient fortement le transgène. Pour chacun d'eux, nous avons conservé ces clones en culture pendant au moins 15 passages, en vérifiant régulièrement par FACS le pourcentage de cellules

exprimant le transgène HS12GFP. Ces cultures ont été réalisées en duplicata, avec ou sans puromycine, afin de discriminer l'éventualité d'une perte du transgène.

Le résultat de cette expérience est présenté dans le tableau 1, et montre qu'il n'y a pas de variation dans l'expression du transgène au cours de la prolifération pour les clones B2, B4, B5, C1, C2 et C3. Donc, parmi les clones sélectionnés, seul le clone A3 montre une extinction du transgène.

Clone	B2	B4	B5	C1	C2	C3
% GFP	86.05	86.22	87.28	90.34	89.66	89.68
	± 6.59	±5.86	±4.84	±5.53	±1.3	±6.85

Tableau 1 : Bilan de l'expression du transgène dans les clones HS12GFP lors de la prolifération des cellules ES suite aux analyses par cytométrie en flux.

3.3.4 Extinction du transgène HS12GFP dans le clone A3 : Résistance aux traitements TSA et 5-aza-Cytidine

Les patrons de modification covalentes des histones ainsi que les patrons de méthylation de l'ADN participent à la régulation épigénétique des gènes. Une inhibition transcriptionnelle peut ainsi être induite par l'action d'Histone Déacetylases (HDAC) ou encore de DNA Méthyl-Transférases (DNMT), et des traitements avec des inhibiteurs de ces enzymes permettent de réactiver l'expression d'un transgène (Pikaart *et al.*, 1998). Une inhibition des HDAC ou des DNMT pourrait donc permettre de prévenir l'extinction du transgène HS12GFP dans le clone A3.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons traité les cellules en prolifération avec des concentrations croissantes de TSA (20 à 200 nM), un inhibiteur de HDAC, ou de 5-aza-Cytidine (0.5 à 4 µM), inhibiteur des DNMT. Nous avons ensuite analysé le pourcentage de cellules exprimant le transgène par la détection de la protéine GFP pour chaque échantillon.

Comme le montrent les figures 9 et 10, ni le traitement des cellules à la TSA, ni le traitement au 5-aza-Cytidine n'ont permis de réactiver l'expression du transgène lors de la prolifération des cellules ES issues du clone A3. Ils ne permettent pas non plus d'empêcher le mécanisme d'extinction, puisque le pourcentage de cellules GFP+ dans les échantillons traités est comparable à celui des contrôles réalisés en présence d'éthanol pour le TSA, ou de PBS pour le 5-aza-Cytidine. Le clone A3 a été soumis à cette expérience à différents stades d'expression de la GFP. Les résultats sont identiques, quel que soit le pourcentage de cellules exprimant le transgène lorsque le traitement au TSA ou au 5-aza-Cytidine est initié : dans aucun cas ces traitements ne permettent de freiner l'extinction du transgène.

Ceci suggère que le mécanisme d'extinction du transgène observé dans ce clone ne fait pas intervenir la déacétylation des histones. Cependant, il existe plusieurs classes d'inhibiteurs de HDAC, qui ont des spectres d'activité plus ou moins variés, aussi nous ne pouvons pas exclure une contribution des HDAC au mécanisme d'extinction du transgène observé lors de la prolifération du clone A3.

La méthylation de l'ADN sous l'action de DNMT (DNA-Méthyl-Transférase) est également fréquemment impliquée dans les mécanismes de répression transcriptionnelle. Le 5-aza-Cytidine agit en bloquant l'action de DNMT, ce qui a pour conséquence d'inhiber la méthylation *de novo* souvent associée à la répression d'un transgène (Chen et Townes, 2000, Lorincz *et al.*, 2000). Cependant, lors de notre étude, ce traitement ne permet pas non plus de réactiver l'expression du transgène dans le clone A3, ni d'en prévenir l'extinction.

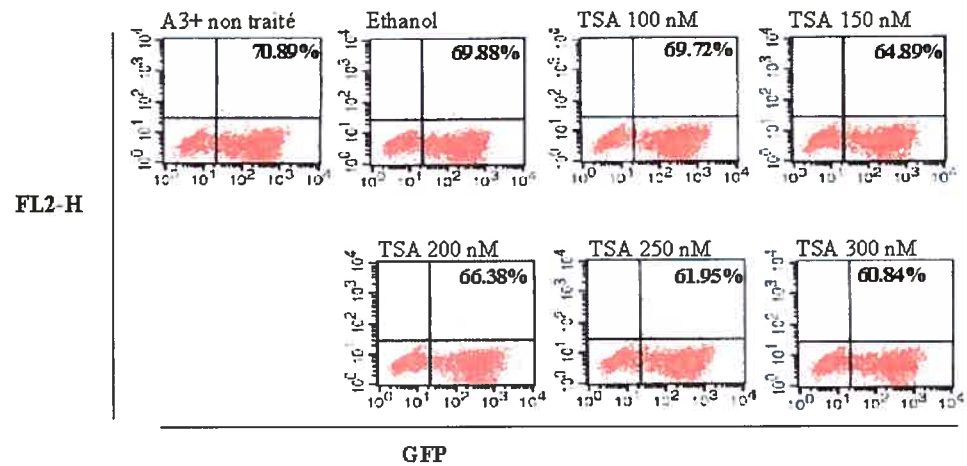


Figure 9 : L'extinction du transgène HS12GFP dans le clone A3 est résistante à un traitement au TSA

Les cellules GFP+ provenant d'un tri du clone A3 sont maintenues en culture et traitées au TSA (16 h) afin d'en vérifier l'effet sur le niveau d'expression du transgène par cytométrie en flux. La figure représente le résultat d'une expérience, initiée au 3e passage après le tri des cellules GFP+.

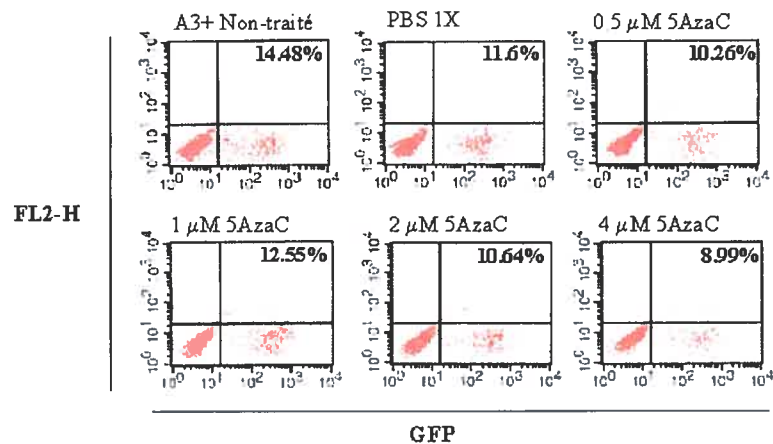


Figure 10 : L'extinction du transgène HS12GFP dans le clone A3 est résistante à un traitement au 5-aza-Cytidine

Les cellules GFP+ provenant d'un tri du clone A3 sont maintenues en culture et traitées au 5-aza-Cytidine pendant 48 h, afin d'en vérifier l'effet sur le niveau d'expression du transgène, par cytométrie en flux. La figure représente le résultat d'une expérience, initiée au 9e passage après le tri des cellules GFP+.

3.4 Structure de la chromatine du transgène : Sensibilité à la DNaseI

Puisque certains clones expriment déjà le transgène au stade de cellules ES, nous avons vérifié l'état de la chromatine au niveau du transgène à ce stade. Les structures de chromatine sont importantes pour le patron d'expression d'un gène, et les zones d'euchromatine, sensibles à la digestion par la DNaseI, renferment de nombreux gènes exprimés. Par opposition, les gènes dont l'expression est réprimée sont caractérisés par une structure de chromatine fermée, résistante ou insensible à la digestion par des nucléases comme la DNaseI. La présence de sites hypersensibles (HS) à la digestion par des nucléases révèle en effet une accessibilité de la chromatine à différents facteurs protéiques impliqués dans la régulation transcriptionnelle. Ces sites hypersensibles constituent donc des structures favorables à la transcription, dont l'état est caractéristique des zones d'euchromatine.

Afin de vérifier la présence des sites HS dans les clones de ES obtenus avec la construction HS12GFP, on a purifié l'ADN dans sa conformation de chromatine native, puis digéré avec des concentrations croissantes de DNaseI. Un total de 4×10^5 cellules a été utilisé pour chaque digestion. Après détermination de la taille moyenne des fragments obtenus par hybridation Southern (figure 11), les échantillons obtenus ont été soumis à des réactions de PCR semi-quantitatives, afin d'analyser l'accessibilité du transgène au site HS1. Les réactions de PCR sont réalisées en duplex, afin de normaliser l'accessibilité au niveau du transgène par rapport à l'accessibilité au niveau du promoteur d'un endogène (*gapdh*). On vérifie également que la réaction de PCR est réalisée en phase linéaire d'amplification en utilisant des concentrations croissantes d'ADN (exemple en figure 11), avant de réaliser les PCR en triplicata.

Le gène *gapdh* a une expression ubiquitaire, il est donc dans une structure de chromatine permissive pour la transcription dans les cellules ES. En conséquence, la sensibilité à la DNaseI est relativement grande au niveau de *gapdh*. Ainsi, lorsqu'on normalise la sensibilité à la DNaseI de notre transgène par rapport à *gapdh*, un ratio HS1/*gapdh* voisin de 1 signifie que le site HS1 se trouve dans une chromatine sensible

à la digestion par la DNaseI. Lorsque HS1 se trouve dans une chromatine insensible, on obtient au contraire un ratio $HS1/gapdh > 1$.

Le clone C1 exprime le transgène de façon stable, dans 90.34% des cellules. Il peut donc être utilisé comme référence d'accessibilité à la DNaseI. Comme le montre la figure 12, le site HS1 montre une bonne sensibilité à la digestion par la DNaseI. Le haut niveau d'expression du transgène observé dans ce clone est donc corrélé à une accessibilité de la chromatine au niveau du site HS1.

Le clone A3 est soumis à une extinction de l'expression du transgène lors de la prolifération. Nous avons donc voulu vérifier les structures de la chromatine au niveau du transgène, et en particulier si une variation de la sensibilité à la DNaseI était impliquée dans le mécanisme de répression transcriptionnelle observé. Pour cela, nous avons donc isolé des cellules du clone A3, à différents passages après un tri GFP, selon que ce clone exprimait la GFP dans 80% ou 20% des cellules, au stade de cellules ES. Ces populations de cellules ES issues du clone A3 ont alors été soumises à une digestion par la DNaseI, afin de vérifier l'accessibilité de la chromatine en fonction du niveau d'expression du transgène.

Comme il est illustré dans la figure 12, le ratio $HS1/gapdh$ est plus élevé dans le cas du clone A3 exprimant le transgène dans seulement 20% des cellules. Lorsque les cellules de ce même clones sont isolées à un passage plus précoce, c'est-à dire lorsque 80% des cellules expriment le transgène, le ratio $HS1/gapdh$ est proche de 1, et comparable au patron de sensibilité obtenu pour le clone C1. On peut donc en conclure que lorsque le clone A3 exprime le transgène à 80%, il montre une plus grande sensibilité à la DNaseI que lorsqu'il exprime le transgène à seulement 20%. Donc le niveau d'expression du transgène au niveau du clone A3 semble corrélérer à une plus grande accessibilité de la chromatine, au moins au niveau de la région testée : le site HS1. L'extinction du transgène lors de la prolifération dans le clone A3 semble donc être reliée à une modification des structures de chromatine. Cependant, les expériences de TSA ou 5-aza-Cytidine n'ont pas permis de déterminer si l'extinction du transgène est corrélée à l'action de HDAC ou de DNMT, puisque les traitements

des cellules ES avec les inhibiteurs de ces enzymes ne permettent pas d'intervenir ou de modifier cette extinction. Une variation de structure de la chromatine est donc bien impliquée dans le processus d'extinction du transgène dans le clone A3, comme le montrent les expériences de DNaseI, mais il reste à déterminer quelles modifications épigénétiques en sont à l'origine.

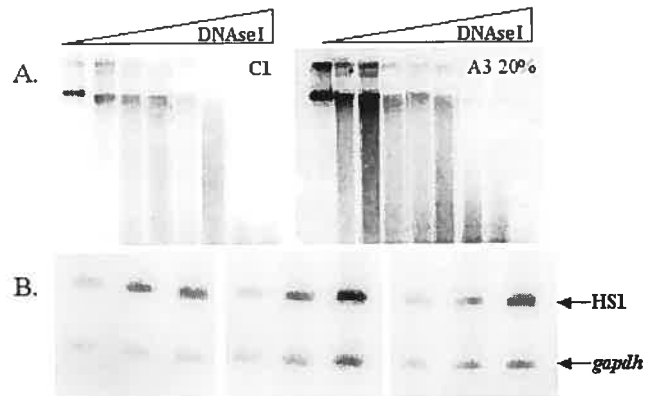


Figure 11 : Sensibilité à la DNaseI

A. Exemples de profils de digestion à la DNase I, obtenus avec les clones C1 et A3 (20% GFP+). Les noyaux des cellules ont été digérés avec des concentrations croissantes de DNaseI ; après extraction de l'ADN, 2 μ l de chaque échantillon ont été chargés sur gel d'agarose 0.8%, et transférés sur membrane. Une hybridation Southern a ensuite été réalisée avec une sonde d'ADN génomique, afin de déterminer la taille moyenne des fragments obtenus pour chaque concentration de DNaseI.

B. Exemple d'échantillons de PCR en phase linéaire d'amplification

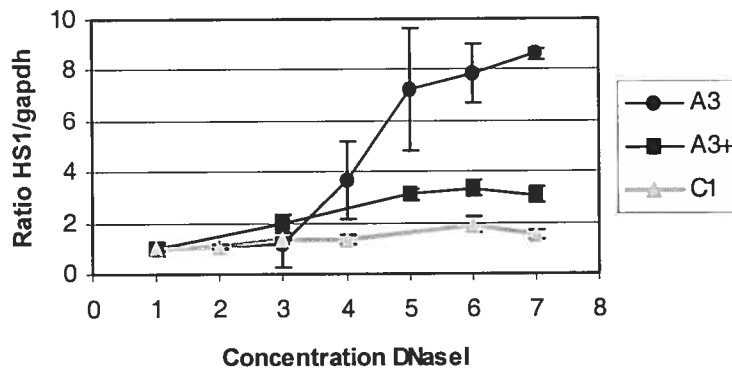


Figure 12 : Accessibilité de la chromatine au site HS1

Sensibilité du transgène à la digestion par la DNaseI dans le clone A3 et le clone C1, au stade de cellules ES. A3 désigne le clone A3 quand 20% des cellules expriment le transgène, et A3+ quand 80 % des cellules expriment le transgène. La sensibilité du transgène est évaluée en comparant les ratio HS1/gapdh, pour des concentrations croissantes de DNaseI.

3.5 Différenciation *in vitro* des cellules ES

Afin de poursuivre la caractérisation des clones HS12GFP, nous avons ensuite voulu vérifier le niveau d'expression du transgène lors de la différenciation hématopoïétique de ces clones. La procédure utilisée se décompose en deux étapes, la première permettant de générer des corps embryonnaires (EB) constitués de divers précurseurs précoces et de progéniteurs érythroïdes primitifs, tandis qu'au cours de la seconde étape sont formés des précurseurs hématopoïétiques définitifs, dont on peut évaluer le potentiel grâce à un essai clonogénique. Cet essai clonogénique est réalisé en ensemençant un milieu semi-solide contenant de la méthylcellulose avec une population de cellules contenant des progéniteurs hématopoïétiques. Le milieu comporte une concentration définie de facteurs de croissance spécifiques, afin de supporter une différenciation hématopoïétique appropriée. Cette méthode permet donc d'évaluer le potentiel de différenciation des progéniteurs contenus dans la populationensemencée, en comptabilisant les colonies formées.

3.5.1 Différenciation des ES en EB – différenciation primaire

Lorsque le clone A3 est soumis à la différenciation, il montre une expression variable de la GFP, c'est-à-dire que le nombre de cellules GFP+ dans les EB varie, mais est toujours inférieur au nombre de cellules GFP+ de la population de cellules ES non-différenciées. Si des cellules GFP- provenant du clone A3 sont soumises à la différenciation, les EB obtenus sont tous GFP-. Ceci illustre encore une fois la grande stabilité du statut GFP- par rapport à celui de la population GFP+, qui varie non seulement lors de la prolifération, mais aussi lors de la différenciation. Dans cette expérience, les EB totaux sont considérés : la proportion de EB hémoglobinisés n'a pas été déterminée.

Les clones exprimant fortement la GFP (dans lesquels plus de 90% des cellules ES sont GFP+) montrent également une diminution de l'expression du transgène au cours de la différenciation, comme il est illustré à la figure 13. Nous avons vérifié si cet effet est spécifique de la différenciation, ou bien si cette diminution du nombre de cellules exprimant le transgène pouvait être associée à la division cellulaire.

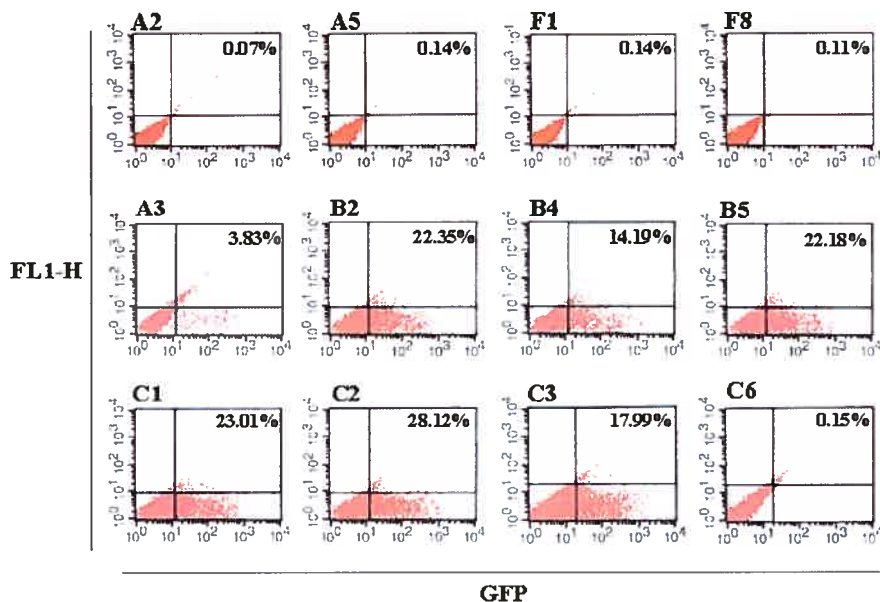


Figure 13 : Expression du transgène HS12GFP au stade EB (EB totaux)

Exemple de profil d'expression du transgène obtenu par détection de la protéine GFP par cytométrie en flux, à partir de cellules issues des EB totaux au jour 6 de différenciation. Les clones HS12GFP obtenus sont soumis à une différenciation hématopoïétique, au cours de laquelle on observe une diminution de l'expression du transgène.

Pour déterminer si cette variation dans le pourcentage de cellules exprimant le transgène est spécifique à la différenciation, des cellules ES indifférenciées issues des différents clones ont été cultivées pendant la même période que la procédure de différenciation. Ces dernières ne montrent pas de diminution dans l'expression du transgène. Ceci suggère qu'il y a bien répression de l'expression du transgène HS12GFP dans ces clones lors de la différenciation des cellules ES. Ce phénomène d'extinction de l'expression d'un transgène lors de la différenciation de cellules ES a déjà été reporté dans la littérature, notamment dans le cas de rétrovirus (Laker *et al.*, 1998, Hamaguchi *et al.*, 2000, Yao *et al.*, 2004).

Comme l'expression du transgène varie lors de la différenciation, nous avons voulu vérifier si cette variation d'expression pouvait être induite par des variations de structure de la chromatine. Pour cela, nous avons traité des EB provenant des clones B4, C1 et C3 avec du TSA. Le traitement est effectué aux jours 2 et 4 de différenciation, avec du TSA à une concentration de 20 nM, ou encore un volume

équivalent d'éthanol (solvant du TSA) dans le contrôle. Puis nous avons récolté ces EB au jour 6 de différenciation, et nous avons analysé par cytométrie en flux l'expression de la GFP dans les cellules issues de ces EB.

Lorsque les EB sont traités avec du TSA au jour 2, on observe une diminution de la taille et du nombre de EB formés, comparé aux échantillons traités avec du TSA au jour 4, ou aux contrôles traités avec de l'éthanol. De plus, le traitement au TSA – jour 2 semble inhiber la diminution d'expression du transgène observée lors de la différenciation (figure 14). Par contre, le traitement au TSA au jour 4 de différenciation n'a pas d'effet notable sur l'expression du transgène, puisque le pourcentage de cellules exprimant la GFP est semblable dans les contrôles traités à l'éthanol et dans les échantillons traités au TSA au jour 4 de différenciation. Donc l'inactivation du transgène lors de la différenciation peut être modifiée en traitant les cellules lors de la différenciation avec 20 nM TSA au jour 2 de différenciation, mais pas au jour 4.

Ceci suggère tout d'abord que la diminution d'expression du transgène observée lors de la différenciation des ES est causée par une modification du patron d'acétylation des histones. De plus, l'inhibition des HDAC par le traitement au TSA au jour 2 de différenciation inhibe en majeure partie l'inactivation du transgène HS12GFP qui se produit lors de différenciation des cellules ES en EB. Le traitement TSA au jour 2 permet donc d'augmenter l'expression du transgène, soit en réactivant son expression dans les cellules des EB, soit en ralentissant le mécanisme de répression du transgène associé à la différenciation.

Mais le traitement au TSA au jour 4 ne permet pas d'inhiber l'inactivation du transgène, ce qui suggère qu'à ce stade, le processus de différenciation est déjà engagé ou que d'autres modifications des histones ont eu lieu, ne permettant pas la modification de l'extinction du transgène. Il a déjà été reporté dans la littérature qu'un traitement au TSA permet de moduler les structures de chromatine et l'expression d'un transgène lorsqu'on agit au stade de progéniteurs, mais pas quand on traite les cellules érythroïdes (Bottardi *et al.*, 2003).

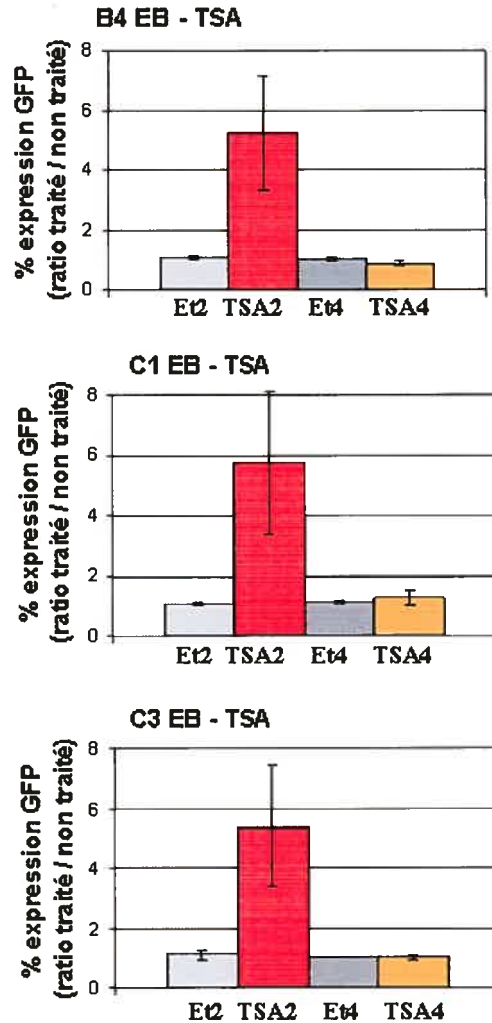


Figure 14 : L'expression du transgène lors de la différenciation en EB est modifiée suite à un traitement au TSA

Du TSA (20 nM) est ajouté au milieu de culture des EB des clones B4, C1 et C3, au jour 2 ou au jour 4 de différenciation, jusqu'à épuisement dans le milieu. L'effet de ce traitement sur l'expression du transgène est vérifié par FACS (pourcentage de cellules GFP+) au jour 6 de différenciation.

Et2 et Et4 : traitement éthanol aux jours 2 et 4, respectivement.

TSA2 et TSA4 : traitement TSA aux jours 2 et 4, respectivement.

3.5.2 Différenciation secondaire en Méthylcellulose

La différenciation *in vitro* de cellules ES se fait en deux temps, avec une différenciation primaire qui favorise la formation de EB, composés majoritairement de progéniteurs érythroïdes primitifs, suivie d'une différenciation secondaire au cours de

laquelle sont formés les précurseurs hématopoïétiques définitifs. Plusieurs clones obtenus avec la construction HS12GFP expriment le transgène au stade ES et au stade EB, mais cette expression varie lors de la différenciation. Nous avons donc voulu vérifier le niveau d'expression du transgène à des stades plus tardifs de la différenciation (différenciation secondaire), en réalisant des essais clonogéniques.

Pour cela, nous avonsensemencé, avec des cellules issues de EB au jour 6 de différenciation, des milieux semi-solides de méthylcellulose, supplémentés en facteurs de croissance et en cytokines favorisant la détection de progéniteurs hématopoïétiques : SCF, IL3, IL6, EPO, Insuline et Transferrine (Rebel *et al.*, 1996). La différenciation secondaire permet de générer des érythroïdes primitifs, dès le jour 3 de différenciation, et des érythroïdes définitifs dès le jour 7 ; dans cette expérience, le nombre total de colonies, et pas seulement les colonies érythroïdes, est analysé.

Le nombre de colonies obtenues à partir de EB issus de nos différents clones est toujours faible, et comparable au nombre de colonies obtenues avec des cellules ES *wild-type*.

Comme la différenciation des cellules ES conduit à une variation d'expression du transgène, nous avons voulu vérifier s'il y a une différence dans le nombre total de colonies générées à partir de cellules GFP+ par rapport aux cellules GFP-. Nous avons donc trié les cellules GFP+ ou GFP- issues de EB au jour 6 de différenciation, et nous avons ensuiteensemencé des milieux semi-solides, à raison de 30 000 cellules par ml de méthylcellulose. Les colonies sont visibles dès le jour 3 de différenciation, décomptées chaque jour, et récoltées au jour 10 après ensemencement.

Une première expérience réalisée avec le clone B5 a montré que le nombre de colonies formées est plus important dans la culture issues de cellules GFP+, comparativement aux cultures de cellules WT ou de cellules GFP- ou de cellules non triées provenant du même clone. Ceci suggère qu'en sélectionnant pour les cellules GFP+ issues de EB jour 6, on enrichit notre population en progéniteurs hématopoïétiques. Ces résultats ont été répétés et confirmés avec le clone C1, et sont

résumés dans le tableau 2. Nous avons choisi d'étudier le clone C1, puisque son profil d'expression semble être représentatif des autres clones exprimant fortement le transgène au stade de cellules ES, et que pour ce clone nous disposons déjà des données sur l'accessibilité de la chromatine à la DNaseI.

Un traitement TSA au jour 2 de différenciation primaire des ES en EB permet d'augmenter la proportion de cellules GFP+ dans ces EB. De plus, un tri des cellules GFP+ issues des EB permet d'enrichir en progéniteurs, puisque le nombre de colonies formées à partir de cellules GFP+ est supérieur à celui obtenu à partir de la population totale des cellules issues de EB. Nous nous sommes donc demandé si l'augmentation de l'expression du transgène suite à un traitement TSA au jour 2 de différenciation pouvait avoir un effet sur le nombre de colonies formées, et en particulier si ce traitement permettait d'augmenter encore plus la proportion de progéniteurs dans les EB. Pour cela, nous avons doncensemencé 1 ml de méthylcellulose avec 30 000 cellules provenant de EB (jour 6) traités ou non au TSA. De plus, ces cellules sont issues soit de la population totale, soit de la population de cellules GFP+, à la suite d'un tri par FACS.

On observe alors, comme le résume le tableau 2, que le nombre de colonies obtenues après un traitement au TSA est plus important que le nombre de cellules obtenues à partir de l'échantillon non traité. Donc un traitement au TSA semble permettre d'augmenter le nombre de progéniteurs, soit en réactivant le programme spécifique de progéniteurs contenus dans les EB, soit en retardant l'extinction de gènes caractéristiques du stade progéniteur.

Cependant, il ne semble pas y avoir de différence entre le nombre de colonies générées à partir de cellules traitées au TSA, qu'elles soient ou non sélectionnées pour l'expression de la GFP. De plus, si le nombre de colonies obtenues suite à un traitement au TSA est supérieur à celui obtenu sans traitement, il est quand même inférieur au nombre de colonies générées à partir des cellules GFP+ d'un échantillon non traité. Ceci suggère que le traitement au TSA ne permet pas d'induire une activation maximale du transgène dans les progéniteurs, puisqu'il ne permet pas de

générer de colonies hématopoïétiques définitives. L'effet du TSA serait donc trop transitoire pour permettre de générer autant de progéniteurs qu'à la suite d'un tri GFP+.

	WT	C1	C1 GFP+	C1 TSA	C1 TSA GFP+
d5	20	39	251	86	83
	13		206	64	103
d6	24	30	282	100	97
	18		237	81	133
d8	35	63	464		130
	11				162
d9	33	65	539	133	147
	17		493	158	152
d10	32	70	521	123	135
	46		494	159	175

Tableau 2 : Essai clonogénique sur le clone C1

L'essai clonogénique est initié avec 30 000 cellules issues de EB jour 6. Les cellulesensemencées sont issues soit de l'ensemble de la population, soit d'une population de cellules GFP+ triée par FACS, et sont soumises à un traitement TSA initié au jour 2 de différenciation. Les colonies totales sont décomptées aux jours indiqués.

On compare le nombre de colonies formées en fonction du pourcentage de cellules GFP+ contenues dans les EB ayant servi à initier la différenciation secondaire (C1 versus C1 GFP+), et soumis ou non à un traitement au TSA 20 nM (C1 versus C1 TSA).

3.6 Etude in vivo

Les cellules ES on servi à générer des souris transgéniques : deux lignées ont été établies, l'une à partir du clone A3 et l'autre à partir du clone C1. Des analyses préliminaires par FACS et par microscopie fluorescente révèlent que ces lignées transgéniques n'expriment le transgène ni dans le sang ni au niveau de la moelle osseuse. Cependant, l'expression du transgène à des stades plus précoces du développement, par exemple dans le foie fœtal, ou encore plus tôt au niveau du sac vitellin, devra être vérifiée.

4 DISCUSSION

4.1 Construction du transgène HS12GFP

L'expression d'un transgène est soumise à l'effet de positionnement, c'est-à-dire qu'elle dépend souvent des patrons de méthylation de l'ADN et des structures de chromatine environnantes au niveau du site d'intégration. Le fait d'étudier les régulations épigénétiques au niveau d'un transgène soumis à un effet de positionnement est donc très informatif pour caractériser les mécanismes à l'origine de l'établissement de structures de chromatine permissives ou non à la transcription.

De plus, le locus humain de la β -globine est très bien caractérisé, et son expression est spécifique de la lignée érythroïde. Plusieurs études ont montré qu'un transgène β -globine est, comme tout transgène, soumis à un effet de positionnement, mais ce phénomène disparaît lors de la présence d'un LCR complet en amont du gène (revu par Li *et al.*, 2002a). Parmi les sites hypersensibles du locus humain de la β -globine, le site HS2 joue en particulier un rôle d'*enhancer*, ce qui permet d'obtenir un bon niveau d'expression du transgène dans des cellules transfectées, tant en transfection stable que transitoire. Plusieurs études montrent que l'absence d'un site HS dans la construction favorise l'effet de positionnement (Bungert *et al.*, 1995, Milot *et al.*, 1996), alors qu'un transgène comprenant un LCR normal montre une expression forte, tissu-spécifique, dépendante du nombre de copies mais indépendante du site d'intégration.

Nous avons donc pensé qu'étudier l'activation du gène de β -globine sous le contrôle d'un LCR partiel constituerait un bon modèle pour mieux comprendre l'établissement de la régulation épigénétique lors de la différenciation de cellules ES.

4.2 Sélection des clones et caractérisation de l'expression du transgène

Comme le montrent les analyses de cytométrie en flux sur les différents clones obtenus avec la construction HS12GFP, la moitié des clones expriment le transgène au stade de cellules ES. Les clones qui n'expriment pas le transgène présentent un réarrangement au niveau du fragment interne du transgène. Un seul clone, le clone A3,

exprime le transgène à un niveau intermédiaire, qui varie en fonction de la division cellulaire, tandis que pour les 6 clones restants le transgène est exprimé dans plus de 85% des cellules.

Donc la construction réalisée, comportant un LCR partiel avec les sites HS1 et HS2, permet d'obtenir un haut niveau d'expression, même au stade de cellules souches embryonnaires. D'autres expériences, réalisées avec des LCR partiels contenant différentes combinaisons de sites HS du locus humain de la β -globine, ne permettraient cependant pas d'obtenir une expression au stade de cellules souches (Papayannopoulou *et al.*, 2000). Donc cette expression forte semble être une particularité de notre construction, qui comprend les sites HS1 et HS2. On pourrait vérifier cette hypothèse en isolant des clones de cellules ES transfectés avec une construction légèrement différente, comprenant par exemple les sites HS123 ou HS23.

L'expression d'un gène de globine est spécifique des cellules érythroïdes. Cependant plusieurs travaux prédisent qu'au stade de cellules souches, la chromatine se trouve dans une structure ouverte, potente, permettant ainsi l'expression à un niveau de base de plusieurs gènes (Jimenez *et al.*, 1992) ; le patron d'expression se restreint par la suite, et devient spécifique selon la lignée cellulaire (Hu *et al.*, 1997, Kontaraki *et al.*, 2000, Akashi *et al.*, 2003). Il pourrait donc être intéressant de quantifier dans les différents clones le niveau d'expression du transgène au stade de cellules ES, afin de déterminer si effectivement cette expression reflète un niveau de base, et est modifiée lors de la différenciation vers la lignée érythroïde. En effet, la technique de cytométrie en flux détecte la fluorescence de la protéine GFP contenue dans la construction, ce qui constitue un bon outil pour évaluer de façon globale le pourcentage de cellules qui expriment le transgène dans chaque clone. Mais pour des analyses plus précises, la technique de protection à la nucléase S1 permet de comparer et de quantifier les niveaux d'ARNm matures, donc le niveau d'expression du transgène dans une population de cellules. Ainsi, on pourrait déterminer le niveau d'expression du transgène HS12GFP par rapport à celui de la globine endogène (forme murine), qui est induite lors de la différenciation de cellules ES comme il a déjà été démontré par RT-PCR (Keller *et al.*, 1993).

Parmi les clones n'exprimant pas le transgène, il est intéressant d'observer que tous montrent un réarrangement au niveau du fragment interne. Bien que nous n'ayons vérifié qu'un faible nombre de clones, il semble que les événements de *silencing* complet du transgène HS12GFP soient rares au stade de cellules ES pluripotentes. Avec la construction HS12GFP, nous n'avons donc pas obtenu de clones n'exprimant pas le transgène au stade de cellules ES. Comme la construction contient le site HS2 du LCR de la β -globine, décrit dans la littérature comme un *enhancer* fort, nous nous attendions effectivement à observer un bon niveau d'expression du transgène. Cependant, la présence d'un LCR partiel permettait d'envisager que cette expression serait variable selon les clones obtenus, et que nous obtiendrions des clones dont l'expression du transgène serait soumise à un effet de positionnement, comme il a déjà été observé dans des souris transgéniques (Bungert *et al.*, 1995, Milot *et al.*, 1996), ou encore soumise à une extinction du transgène, comme c'est souvent le cas avec des vecteurs rétroviraux.

Donc notre construction présente un bon avantage par rapport à des vecteurs rétroviraux, puisque dans la majorité des cas on observe une expression forte du transgène au stade de cellules ES. Cependant ces travaux préliminaires nécessitent des études complémentaires pour vérifier l'expression du transgène aux stades plus tardifs lors de la différenciation.

4.3 Mécanisme d'extinction lors de la prolifération (clone A3)

Lorsque le clone A3 est maintenu en culture, il montre une grande variation dans le pourcentage de cellules exprimant le transgène au stade de cellules ES. Il semble donc que le clone A3 soit soumis à un mécanisme d'extinction, comme il a déjà été décrit dans la littérature, notamment dans le cas de rétrovirus (revu par Pannell et Ellis, 2001). Après un tri par FACS de la population de cellules GFP+ issue du clone A3, le pourcentage de cellules exprimant le transgène (GFP+) diminue au cours du temps. Par contre, la sous-population de cellules n'exprimant pas le transgène (GFP-) montre une très grande stabilité lors de la prolifération.

Une autre hypothèse pouvant expliquer la variabilité du nombre de cellules exprimant le transgène dans le clone A3 est une perte du transgène lors de la mise en culture de ce clone. Cependant, les cellules GFP- du clone A3 sont toujours résistantes à la puromycine. Afin d'éliminer cette hypothèse, nous avons également isolé de l'ADN à partir des cellules GFP- issues du clone A3, ou à partir de ce clone exprimant le transgène à différents niveaux. Cet ADN a ensuite été amplifié avec des amorces spécifiques pour le transgène, ou encore analysé par *Southern blot*. Dans les deux cas, un signal positif confirmant la présence du transgène a été obtenu. La diminution du pourcentage de cellules exprimant le transgène n'est donc vraisemblablement pas associée à une perte du transgène, mais plutôt à une extinction du transgène lors de la prolifération.

Le clone A3 montre donc une extinction rapide du transgène lors de la prolifération des cellules ES. Ce phénomène d'extinction est relativement rapide, puisque seulement 15 passages permettent de revenir à un pourcentage de cellules exprimant le transgène inférieur à 3 %. L'extinction du transgène n'est pas liée à l'absence de sélection des cellules par la puromycine, puisque les résultats obtenus sont les mêmes, que le milieu de culture contienne de la puromycine ou non.

Vraisemblablement, cette variation d'expression du transgène lors de la prolifération du clone A3 est due à un effet de positionnement, puisqu'elle n'est pas observée dans les autres clones. Il pourrait donc être intéressant de vérifier si le site d'intégration du transgène est différent selon les clones, en utilisant la technique de DNA FISH par exemple. En effet, une intégration péricentromérique peut conduire à une expression variable d'un transgène, tandis que l'intégration au niveau de zones d'euchromatine favorise un bon niveau d'expression. Ce phénomène d'extinction du transgène est souvent observé dans le cas de vecteurs rétroviraux. Même si les mécanismes sont mal compris, méthylation de l'ADN et variations de structure de la chromatine au site d'intégration en sont des acteurs importants.

Les structures de la chromatine au site d'intégration d'un transgène permettent d'influencer son expression. Nous avons donc voulu vérifier si, en inhibant l'action de

HDAC par l'action de TSA, nous pouvions empêcher ou ralentir cette extinction. En effet, plusieurs exemples dans la littérature montrent que l'inhibition des HDAC peut conduire à une augmentation globale du niveau d'acétylation des histones, et éventuellement à la réactivation de l'expression d'un gène ou transgène (Chen *et al.*, 1997). Cependant, les résultats obtenus dans la présente étude suggèrent que le phénomène d'extinction dans le clone A3 est résistant à l'action de TSA, et qu'une variation dans le niveau d'acétylation des histones au niveau du transgène n'est pas impliquée dans l'extinction. Une analyse du niveau d'acétylation du transgène par Immunoprécipitation de la chromatine, avant et après extinction du transgène, permettrait de confirmer que l'action de HDAC n'est pas impliquée dans le phénomène d'extinction observée. Par ailleurs, plusieurs études montrent qu'une combinaison d'inhibiteurs de HDAC (HDACi) permet d'observer la réactivation d'un gène : il existe en effet plusieurs inhibiteurs de HDAC, ayant des cibles plus ou moins spécifiques. Cependant, le TSA est connu comme étant un inhibiteur non spécifique des HDAC, contrairement au Sodium Butyrate, par exemple, qui est un inhibiteur plus spécifique. On s'attendrait donc à avoir plus de chances de réactiver l'expression du transgène par un traitement au TSA, mais on pourrait envisager de vérifier l'influence d'un traitement avec une combinaison de HDACi sur le maintien de l'expression du transgène dans le clone A3.

Cependant, l'acétylation des histones n'est pas la seule modification impliquée lors de la régulation épigénétique. On pourrait donc commencer par vérifier le code des histones au niveau des cellules du clone A3, à différents niveaux d'expression du transgène. En particulier, on pourrait vérifier la présence de H3meK9 ou de l'histone H1, qui sont spécifiques de régions transcriptionnellement inactives (revu par Hake *et al.*, 2004), ou encore l'absence de H3-trimeK4, caractéristique de plusieurs gènes transcriptionnellement actifs (Schneider *et al.*, 2004).

Les DNMT (DNA Méthyl Transférase) sont également fréquemment impliquées dans les mécanismes de répression transcriptionnelle : elles sont responsables en particulier de la méthylation *de novo* souvent associée à la répression d'un transgène (Chen et Townes, 2000, Lorincz *et al.*, 2000). Cependant, lors de notre

étude, un traitement au 5-aza-Cytidine, un inhibiteur des DNMT, n'induit pas non plus de changement dans le profil d'expression du transgène du clone A3. D'autres techniques permettent d'étudier le patron de méthylation de l'ADN. Afin de confirmer que l'extinction du transgène dans le clone A3 n'est pas reliée à la méthylation de l'ADN, mais également de vérifier l'efficacité du traitement au 5-aza-Cytidine, on pourrait soumettre cet ADN à une digestion par les enzymes de restriction *HpaII* ou *MspI*, différenciellement sensibles au degré de méthylation de l'ADN, ou encore à un traitement bisulfite, permettant de convertir les résidus cytosine non-méthylés en uracile.

Comme HDAC et DNMT coopèrent pour l'établissement d'une empreinte épigénétique défavorable à la transcription (revu par Momparler, 2003), plusieurs études utilisent une combinaison d'inhibiteurs de HDAC et de DNMT pour permettre une réactivation transcriptionnelle : par exemple, une combinaison de TSA et de 5-aza-Cytidine est nécessaire pour permettre la réactivation de l'expression de plusieurs gènes ou transgènes, impliquant un mécanisme d'action synergétique (Cameron *et al.*, 1999). Nous pourrions donc répéter l'expérience en traitant le clone A3 à la fois avec le TSA et le 5-aza-Cytidine, et vérifier ainsi si cette combinaison est capable d'altérer le mécanisme d'extinction du transgène lors de la prolifération.

Une autre étude récente montre que le patron de méthylation de l'ADN n'interviendrait que dans l'étape de maintien d'une répression transcriptionnelle, et non dans son établissement (Mutskov *et al.*, 2004). Nos résultats concordent avec cette analyse, puisqu'un traitement au 5-aza-Cytidine ne permet pas de réactiver l'expression du transgène. Cependant, dans cette étude, les auteurs montrent que la diminution d'acétylation des histones H3 et H4 au niveau du transgène est corrélée à une diminution de l'expression. Il pourrait donc être intéressant de vérifier l'effet d'un traitement continu au TSA lors de la prolifération du clone A3, plutôt qu'un traitement ponctuel comme nous l'avons réalisé, et de vérifier si ces conditions permettent d'altérer l'extinction du transgène.

D'autres mécanismes pourraient être à l'origine de ce phénomène d'extinction. En effet, la méthylation de l'ADN et l'action de déacétylases ne sont pas suffisantes pour expliquer tous les phénomènes de répression transcriptionnelle. Ainsi, l'extinction de vecteurs rétroviraux a été observée même en présence d'inhibiteurs de DNMT, ou encore dans des cellules déficientes en DNMT (revu par Pannell et Ellis, 2001). Une autre étude, portant sur le phénomène de répression suite à l'intégration de rétrovirus dans des lignées hématopoïétiques, dissocie deux états de *silencing* : l'un, à court terme, peut être modifié sous l'action d'inhibiteurs de HDAC et ou de DNMT, et l'autre, à long terme, est résistant au traitement TSA et 5-aza-Cytidine (McInerney *et al.*, 2000). Ainsi, une répression à long terme de vecteurs rétroviraux ferait intervenir des mécanismes autres que la déacétylation des histones et la méthylation de l'ADN. D'autres études récentes suggèrent une implication de la machinerie d'interférence d'ARN dans le phénomène de *silencing* (revu par Grewal et Moazed, 2003, Matzke *et al.*, 2004).

Enfin, plusieurs études suggèrent que la présence de plusieurs copies d'un transgène favorise sa répression transcriptionnelle (Garrick *et al.*, 1998, McBurney *et al.*, 2001). Cependant, Mutskov et collaborateurs obtiennent également un effet de *silencing* avec des lignées cellulaires possédant un faible nombre de copies du transgène (Mutskov *et al.*, 2004). D'ailleurs, les expériences de *Southern blot* réalisées avec le clone A3 montrent que celui-ci contient une copie unique du transgène.

4.4 Accessibilité de la chromatine

Une sensibilité à la digestion par la DNaseI révèle un bon niveau d'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription, caractéristique d'une structure de chromatine ouverte, permissive à la transcription. Afin de poursuivre la caractérisation des clones de ES transfectés avec la construction HS12GFP, nous avons donc vérifié la sensibilité du transgène à la DNaseI. Les sites HS1 à HS4 du locus humain de la β -globine sont spécifiques des cellules érythroïdes (revu par Li *et al.*, 2002a). Lors de la différenciation de progéniteurs dérivés de cellules FDCP-mix, le site HS1 endogène

est le premier perdu lors du *commitment* vers une autre lignée (Jimenez *et al.*, 1992). C'est donc à ce site que nous avons d'abord regardé la sensibilité à la DNaseI.

Les expériences de digestion par la DNaseI révèlent que la chromatine au niveau du site HS1 est plus ouverte dans le clone A3-80 % et le clone C1, que dans le clone A3-20 %. Nos résultats indiquent que la sensibilité du transgène à la DNaseI dans le clone A3 est corrélée au niveau d'expression du transgène, puisque le clone A3 exprimant la GFP à 80% montre une plus grande sensibilité à la DNaseI que lorsqu'il exprime la GFP à seulement 20%. De plus, les cellules du clone C1 expriment le transgène à environ 90 % ; ce pourcentage est comparable à celui du clone A3-80 %. Or A3-80 % et C1 montrent bien des niveaux comparables d'accessibilité de la chromatine au site HS1.

Le profil de sensibilité à la DNaseI obtenu pour le clone C1 montre une bonne sensibilité de la chromatine, comparable à celle obtenue pour le clone A3-80%. Ainsi, la chromatine au niveau du site HS1 est ouverte lorsque les cellules expriment le transgène, mais une inhibition de l'expression du transgène semble être liée à une fermeture de la chromatine, du moins à ce site. La sensibilité du transgène a été évaluée dans cette étude au site HS1 seulement. Il faudrait également vérifier ce qui se passe au niveau du promoteur du gène β , et aussi au niveau de la séquence codante, par exemple au niveau de l'exon 3, afin de pouvoir conclure sur l'ouverture de la chromatine au niveau du transgène HS12GFP. De plus, le site HS2, contrairement au site HS1, fonctionne comme un *enhancer* majeur, ce qui pourrait apporter des différences selon l'état d'activation du transgène.

Des modifications du code des histones permettent d'influencer l'activité transcriptionnelle d'un gène. Cependant, les traitements du clone A3 au TSA ne permettent pas de réactiver l'expression du transgène. L'acétylation des histones est liée à une activation transcriptionnelle, mais n'est pas la seule modification touchant les histones ; on pourrait donc investiguer le niveau d'acétylation dans ce clone, selon le niveau d'expression du transgène, et vérifier également le patron de méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, dont la tri-méthylation est liée à une activation

transcriptionnelle (Schneider *et al.*, 2004). Ceci permettrait alors de mieux caractériser les modifications associées à la différence de sensibilité de la chromatine lors de l'extinction du transgène dans le clone A3.

Les cellules ES peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires, et plusieurs études suggèrent que la plupart des gènes spécifiques de certaines lignées cellulaires seraient déjà ouverts et transcrits à un niveau de base au stade de cellules souches, pour se restreindre par la suite (Jimenez *et al.*, 1992, Papayannopoulou *et al.*, 2000, et Bottardi *et al.*, 2003). Donc le choix du gène servant à normaliser l'accessibilité du site HS1 devait nécessairement être un gène dont l'expression ne varie pas, ou peu, lors de la différenciation. Nous avons donc porté notre choix sur un gène *housekeeping*, qui est exprimé dans toutes les cellules. Lors d'expériences visant à vérifier l'induction de l'expression d'un gène, le contrôle utilisé est souvent *hprt*. Cependant, une étude récente montre que le choix d'un gène comme *hprt* n'est pas une bonne référence, puisque son expression varie beaucoup lors de la différenciation *in vitro* de cellules ES, et que *gapdh* lui est préférable (Murphy *et al.*, 2002). Nous avons donc décidé d'utiliser le gène *gapdh* comme référence lors de nos expériences.

D'autre part, le choix d'un seul gène *housekeeping* comme contrôle n'est pas suffisant lorsque l'on analyse une population de cellules en différenciation. Pour compléter notre étude, il serait important de répéter les expériences de PCR en comparant et normalisant par rapport à un deuxième gène de référence, comme la β -actine par exemple.

Enfin, l'induction des gènes de globine lors de la différenciation *in vitro* de cellules ES ont déjà été répertoriés (Keller *et al.*, 1993, Kennedy *et al.*, 1997, Perlingeiro *et al.*, 2001). Il pourrait donc être intéressant de comparer le profil d'accessibilité à la DNaseI de notre transgène par rapport au locus murin, en particulier afin de déterminer si le locus murin se trouve déjà dans une structure de chromatine ouverte au stade de cellules ES, et si l'effet que nous observons pour le transgène est spécifique à notre construction.

4.5 Variation de l'expression du transgène lors de la différenciation

Les résultats montrent que le pourcentage de cellules exprimant le transgène varie lors de la différenciation du clone A3 par rapport à des cellules ES cultivées pendant la même durée. L'expression du transgène dans ce clone varie donc non seulement lors de la prolifération, mais aussi lors de la différenciation. Même si le clone A3 est le seul à montrer un mécanisme d'extinction lors de la prolifération cellulaire, il montre, comme les autres clones, une diminution du pourcentage de cellules exprimant le transgène au cours de la différenciation. Un traitement du clone A3 au TSA ne permet pas d'altérer l'extinction du transgène au stade ES. Mais nous n'avons pas regardé l'influence de ce traitement sur l'expression du transgène lors de la différenciation. On pourrait donc traiter des cellules au stade ES au TSA, et vérifier l'influence de ce traitement sur l'expression du transgène au cours de la différenciation subséquente. En effet, une étude réalisée avec des cellules ES transduites avec un rétrovirus montre que le mécanisme d'extinction observé lors de leur différenciation peut être partiellement inhibé grâce à un pré-traitement des cellules au stade ES (Yao *et al.*, 2004).

Pour les clones exprimant le transgène, soient les clones B2, B4, B5, C1, C2, C3, il n'y a pas de variation du nombre de cellule exprimant le transgène HS12GFP au cours de la prolifération cellulaire, mais en revanche le nombre de cellules exprimant le transgène diminue au cours de la différenciation. Ces clones expriment le transgène de façon stable lors de la prolifération, dans plus de 85 % des cellules, même en absence d'agent de sélection. Par contre, lors de la différenciation hématopoïétique, le pourcentage de cellules exprimant le transgène tombe à 15-20%, de façon semblable pour tous ces clones. Cette variation d'expression du transgène lors de la différenciation ne semble pas liée au nombre de copies du transgène, puisqu'on obtient le même résultat pour tous ces clones. Il semble donc qu'une particularité de notre construction est de permettre une bonne expression au stade pluripotent de cellules ES, mais par la suite l'expression se restreint à une sous-population de cellules, qu'il faut déterminer.

La variation d'expression du transgène observée lors de la différenciation pourrait s'expliquer par différents mécanismes. Le premier serait un effet de positionnement, correspondant à l'état de la chromatine au site d'intégration du transgène, qui varie lors de la différenciation, et par conséquent cause la variation d'expression du transgène. Le deuxième mécanisme correspondrait à une diminution du niveau d'expression basal des ES lorsqu'on les différencie en EB ; dans ce cas, l'expression serait maintenue seulement dans les progéniteurs de la lignée érythroïde, mais réprimée dans les progéniteurs des autres lignées contenus dans les EB. Le fait que tous les clones obtenus montrent une diminution du pourcentage de cellules exprimant le transgène lors de la différenciation suggère que cette variation d'expression constitue plutôt une particularité de notre construction.

Cependant il faut tenir compte du fait que pour notre expérience, les EB totaux, et non seulement les EB hémoglobinisés, ont été considérés. Or il est attendu que lors de la différenciation des cellules ES, les EB produiront différents types de cellules, hématopoïétiques ou non. Il est donc logique d'observer une diminution du nombre de cellules exprimant le transgène au cours de la différenciation : étant donné que l'expression de la globine est érythroïde-spécifique, on peut en effet s'attendre à ce que l'expression du transgène se retienne à la seule lignée érythroïde. Il pourrait par ailleurs s'avérer très intéressant de poursuivre l'étude en déterminant le pourcentage de cellules GFP+ pour chaque EB, selon qu'il soit hémoglobinisé ou non.

Afin de mieux comprendre cette diminution du pourcentage de cellules exprimant le transgène lors de la différenciation, les structures de la chromatine au niveau du transgène après la différenciation pourraient être vérifiées, dans les cellules exprimant ou non le transgène. Ceci permettrait de voir s'il y a une différence dans l'accessibilité de la chromatine, entre les deux populations GFP+ et GFP- issues des EB, et aussi par rapport au stade de cellules ES. En effet, puisque dans les clones GFP+ le pourcentage de cellules exprimant le transgène diminue au cours de la différenciation primaire en EB, celle-ci est-elle corrélée à une diminution de l'accessibilité de la chromatine au locus ? Cependant l'analyse de la structure de la chromatine d'un transgène β -globine dans des souris transgéniques montre que le

locus est ouvert au niveau des progéniteurs érythroïdes et tout au long de la différenciation (Bottardi *et al.*, 2003). De plus, les modifications des histones sont caractéristiques d'une chromatine potente, favorable à la transcription des gènes de globine, comme en atteste un plus haut niveau d'acétylation et de di- et tri-méthylation H3K4 des histones dans les progéniteurs par rapport aux cellules érythroïdes (Bottardi *et al.*, 2003). Ainsi, malgré la variation d'expression du transgène lors de la différenciation, les structures de chromatine pourraient malgré tout rester dans une configuration ouverte.

Le niveau d'expression du transgène varie lors de la différenciation des ES en EB, mais cette diminution pourrait avoir pour origine une variation de l'expression dans toutes les cellules, ou bien une diminution du nombre de cellules exprimant le transgène. On pourrait le vérifier en quantifiant le niveau d'expression dans chaque population de cellules issues de EB après tri des cellules exprimant le transgène, par un essai de protection à la nucléase S1.

Lors de la différenciation des clones HS12GFP, nous avons observé que certaines cellules de certains EB expriment toujours le transgène, mais pas toutes. Nous pouvons en effet distinguer des EB GFP+, des EB GFP-, et également des EB contenant à la fois des cellules GFP+ et des cellules GFP-. Il pourrait donc être intéressant de mieux caractériser les cellules qui expriment le transgène au cours de la différenciation, et en particulier d'identifier les populations GFP+ versus GFP- dans les EB. Pour cela on peut utiliser des marqueurs de différenciation afin de déterminer les différentes populations (progéniteurs primitifs versus définitifs). En effet, dès le jour 2.5 de différenciation, les EB contiennent des hémangioblastes, caractérisés par l'expression de Flk1 (Kabrun *et al.*, 1997). L'expression de SCL/Tal1 marque l'apparition des premiers précurseurs hématopoïétiques, au jour 3 de différenciation (Robertson *et al.*, 2000), suivie peu après par l'expression de GATA-1 au jour 4 (Fujimoto *et al.*, 2001). Entre le jour 3 et le jour 4, il y a apparition d'une population transitoire d'érythroïdes primitifs, exprimant la forme embryonnaire de globine, β H1 ; cette population transitoire persiste jusqu'au jour 10 de différenciation (Kennedy *et al.*, 1997). Les précurseurs érythroïdes définitifs apparaissent dès le jour 4 de

différenciation, tandis qu'au jour 6 les EB contiennent les précurseurs des différentes lignées hématopoïétiques, exprimant le marqueur CD41 (Mitjavila-Garcia *et al.*, 2002, Mikkola *et al.*, 2003). L'identification de ces populations pourrait se faire par la détection par FACS de marqueurs de surface, ou en vérifiant l'expression de ces différentes molécules par RT-PCR.

Un traitement des EB au TSA au jour 2 de différenciation permet de réactiver l'expression du transgène au stade EB, ce qui suggère que des variations de structure de la chromatine sont bien à l'origine d'une variation dans l'expression du transgène, et que le code des histones au niveau du transgène varie au cours de la différenciation. Il pourrait être intéressant de déterminer quelles modifications des histones permettent d'influencer cette expression, par exemple en réalisant des expériences d'Immuno-Précipitation de la Chromatine contre les H3 ou H4 acétylées, ou encore H3K4 di/tri-méthylée, puisque ces modifications sont caractéristiques d'une bonne expression.

Le traitement au TSA au jour 2 de différenciation conduit à un nombre restreint de EB, qui sont également de plus petite taille. Une étude récente sur la régulation épigénétique lors de la différenciation *in vitro* de cellules ES montre que l'activité des histones déacétylases est indispensable au processus de différenciation, et que leur inhibition conduit à une altération de la structure de la chromatine, à un niveau global, mais également au niveau de gènes spécifiques (Lee *et al.*, 2004).

Un traitement au TSA, inhibiteur non-spécifique des HDAC, peut également conduire à un patron altéré de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération ou la différenciation cellulaire, même si cet effet est réversible. Plusieurs cancers ont d'ailleurs pour origine une régulation épigénétique anormale ; c'est le cas par exemple de la fusion AML-ETO, résultant d'une translocation, qui conduit à une interaction de AML avec les partenaires de ETO, et en particulier des HDAC, et résulte ainsi en un blocage dans la lignée myéloïde, et au développement de leucémies (revu par Hake *et al.*, 2004).

Par contre, le traitement au TSA au jour 4 de la différenciation ne permet pas de réactiver l'expression du transgène. Or, c'est entre le jour 4 et le jour 6 de différenciation que la lignée primitive émerge des hémangioblastes contenus dans les EB (Perlingeiro *et al.*, 2001). Il est donc possible qu'au moment où le traitement TSA est réalisé, au jour 4, des progéniteurs plus tardifs soient déjà présents dans les EB, et engagés dans une voie de différenciation. Ceci limiterait donc la possibilité de réactiver l'expression du transgène dans ces progéniteurs plus tardifs, déjà commis vers une autre lignée, ou du moins d'en retarder l'extinction, ou du moins d'en retarder l'extinction.

On sait également que les modifications des histones peuvent être exclusives ou additives, pour participer à l'élaboration d'un code des histones (Jenuwein et Allis, 2001). Une autre hypothèse à vérifier serait que la déacétylation se produit dans les progéniteurs au jour 2 de différenciation, et qu'au jour 4 les histones déacétylées aient subi d'autres modifications post-transcriptionnelles, empêchant la réactivation du transgène à ce stade avec un traitement au TSA. En identifiant les différentes modifications des histones lors de la différenciation des cellules ES par Immunoprécipitation de la chromatine, on pourrait donc mieux comprendre quelles modifications épigénétiques sont associées à cette répression du transgène lors de la différenciation.

Enfin, les expériences de différenciation secondaire des EB en méthylcellulose indiquent que le fait de réactiver l'expression du transgène au stade EB permet d'augmenter le nombre de colonies par rapport à l'échantillon non-traité, mais dans une moindre mesure que le tri GFP+. Ceci suggère que la réactivation du transgène est transitoire, et pourrait être expliquée par le fait qu'une vague de déacétylation suite à l'épuisement du TSA permet d'enlever l'empreinte lors de la différenciation secondaire. Une autre explication pourrait être que la réactivation du transgène suite au traitement TSA se fait également dans des cellules autres que des progéniteurs définitifs, incapables de générer des colonies selon les conditions de notre essai (ou encore non détectés dans les conditions de notre essai). Le traitement au TSA jour 2 permettrait donc de réactiver l'expression du transgène dans la majorité des cellules, et

en particulier dans les érythroïdes primitifs, qui ne forment pas de colonies lors de la différenciation secondaire (trop tardif, cette population est transitoire), mais aussi dans des progéniteurs hématopoïétiques non érythroïdes. L'identification des différentes populations contenues dans les EB serait donc encore une fois informative pour mieux comprendre ces résultats.

Cependant, le tri des cellules GFP+ suite au traitement TSA donne le même nombre de colonies que les cellules non triées, traitées au TSA, suggérant que la réactivation du transgène se fait en majorité dans des cellules autres que des progéniteurs hématopoïétiques définitifs. Or on sait que HS2 est efficace quel que soit le stade de développement (Fraser *et al.*, 1993), tandis que HS3 par exemple est plus important pour l'expression de la globine au stades foetal et embryonnaire (Peterson *et al.*, 1996, Navas *et al.*, 1998), ce qui suggère effectivement que HS2 ne serait pas impliqué dans l'activation de la transcription chez les progéniteurs primitifs.

4.6 Etude in vivo

A partir des clones A3 et C1, deux lignées de souris transgéniques ont été établies. L'expression du transgène a été vérifiée pour ces deux lignées au niveau du sang et de la moëlle osseuse des animaux. Aucune trace de cellules GFP+ n'a été trouvée suite à l'analyse par FACS et/ou par microscopie fluorescente. Ce résultat très préliminaire pourrait être mis en relation avec la diminution de l'expression du transgène observée lors de la différenciation *in vitro* des cellules ES. Cependant, l'expression du transgène à des stades plus précoces du développement, par exemple dans le foie foetal, ou encore plus tôt au niveau du sac vitellin, devra être vérifiée avant de conclure que l'expression du transgène se restreint lors de la différenciation.

4.7 Conclusion

Ce projet a permis d'élaborer un modèle pour l'étude *in vitro* des régulations épigénétiques au locus humain de la β -globine lors de la différenciation de cellules ES.

Nous avons isolé à partir de la construction HS12GFP un clone à extinction rapide du transgène lors de la prolifération ; cependant nous ne connaissons pas le mécanisme à l'origine de cette extinction. Nous pourrions vérifier le patron de modification des histones, ou l'enrichissement en protéines connues pour médier une répression génique, afin de mieux caractériser le phénomène d'extinction observé dans ce clone.

Nous avons également isolé plusieurs clones ayant une forte expression du transgène au stade ES, mais dont l'expression varie au cours de la différenciation. Il pourrait être intéressant de pousser plus avant dans la caractérisation des précurseurs hématopoïétiques contenus dans les EB, afin de déterminer la nature des cellules capables d'exprimer le transgène. Et aussi de déterminer quelle population est présente dans ces EB : avons-nous affaire à des progéniteurs primitifs ou définitifs, et si cette dernière classe est majoritaire, alors quel est le pourcentage de progéniteurs érythroïdes ?

Enfin plusieurs études montrent que l'influence de co-activateurs ou co-répresseurs de la transcription est déterminante pour l'établissement et le maintien de structures de la chromatine favorable à la transcription (Festenstein *et al.*, 1999, McMorro *et al.*, 2000). Ainsi il pourrait être intéressant de voir si la surexpression d'un de ces facteurs est capable de modifier la structure de la chromatine et/ou le patron d'expression du transgène lors de la différenciation. Dans cette optique, nous avons commencé à réaliser une construction inductible pour la protéine d'hétérochromatine M31. L'expression inductible permettra de vérifier l'effet de la surexpression à différents stades de la différenciation, en réalisant des inductions ponctuelles, ou encore tout au long de la différenciation. Ce modèle permettra donc de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de l'établissement et/ou du maintien de la régulation épigénétique à un locus donné. Le travail portant sur cette dernière partie est présenté en annexe.

5 ANNEXE :

Construction d'un surexpresseur inductible de M31

5.1 Introduction

M31 est l'homologue murin de la protéine d'hétérochromatine HP1 β . Elle joue un rôle important dans le maintien de structures d'hétérochromatine, et sa localisation est évidente en particulier au niveau des zones péricentromériques. Différents partenaires de M31 ont été identifiés, en particulier Suv39h1, une Histone MéthylTransférase qui vient méthyler la lysine 9 de l'histone H3 (Bannister *et al.*, 2001, Lachner *et al.*, 2001). Cette modification H3K9 est caractéristique des zones d'hétérochromatine.

Plusieurs études ont montré que M31/HP1 β était capable de réprimer l'activation de gènes, qu'ils soient localisés au niveau de zones d'hétérochromatine (revu par Eissenberg et Elgin, 2000) ou d'euchromatine (Hwang *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2003). Elle est également capable de réprimer l'expression d'un transgène soumis à un effet de positionnement (Festenstein *et al.*, 1999).

Afin de mieux comprendre les mécanismes conduisant au maintien de régulation épigénétique lors de la différenciation, nous proposons donc de réaliser un surexpresser inductible de M31. Ce vecteur sera ensuite introduit dans les clones de cellules ES obtenus suite à la transfection avec le transgène HS12GFP, pour vérifier l'effet de la surexpression de M31 sur l'expression du transgène et les structures de la chromatine.

5.2 Matériel et Méthodes

5.2.1 Clonage

Le cDNA de M31 est un don du Dr Prim Singh. Il a été modifié par PCR afin de permettre une insertion dans le vecteur pEYFP-N1 (Clontech), d'ajouter une séquence Kozak en 5', et des sites de restrictions *Bam HI* pour l'amorce 5' ou *Hind III* pour l'amorce 3', permettant de faciliter les étapes de clonage suivantes. L'amplicon obtenu suite à l'amplification à l'aide de la *Pfu Polymérase (Promega)* a une taille de 587 pb. Les conditions d'amplification sont les suivantes : dénaturation de 5 min à 94°C, puis 30 cycles d'amplification : 1 min à 94°C, 1 min à 55°C et 1 min à 72°C, suivis d'une élongation finale de 10 min à 72°C. La réaction de PCR est réalisée dans

un volume total de 50 μ l comprenant l'ADN à amplifier, dilué dans le tampon de PCR (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1 % Triton X100, 1 mg/ml BSA), 0.2 mM dNTP, 25 pmol de chaque amorce, 0.5 U de *Pfu*.

Les amorces utilisées sont :

M31-sens (5') : ATA AAG CTT GCC ACC CGC ATG GGG AAA

M31-antisens (3') : GGA GGA TCC GGG TAA TTC TTG TCG TC

Le fragment M31-YFP de 1 400 pb a ensuite été isolé pour être cloné dans un vecteur inductible Tet-O, don de Dre Nathalie Labrecque.

5.2.2 Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a été réalisée avec le kit *Quick Change (Stratagène)* selon les instructions du manufacturier. Brièvement, l'ADN est amplifié par PCR avec les amorces suivantes :

M31sdm sens : CGC ATG GGG AAG AAG CAA AAC AAG AAG AAA GTG GA

M31sdm antisens : TC CAC TTT CTT CTT GTT TTG CTT CTT CCC CAT GCG

L'amplicon obtenu est ensuite digéré par l'enzyme de restriction *Dpn I (Stratagène)*, qui permet d'éliminer les molécules d'ADN non modifiées par PCR (parce qu'elles sont méthylées), puis transformé dans des bactéries compétentes. Après sélection de colonies, on a vérifié par séquençage la correction de la mutation dans l'ADN issu de plusieurs clones.

5.2.3 Séquençage

Le séquençage de M31 est réalisé par la méthode de Sanger, grâce au kit *Circumvent Thermal Cycle Dideoxy DNA Sequencing (NEB)* selon les instructions du manufacturier. Brièvement, 125 fmol d'ADN purifié est amplifié par PCR dans 4 tubes contenant chacun une solution de d/ddNTP, 0.75 pmol d'amorce appropriée, 1.25 μ l de tampon, 1.25 μ Ci $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP (*Amersham Biosciences*), 1.25 U de *Taq Polymerase (Sequencing Grade Taq DNA Polymerase, Promega)*.

L'amplification est réalisée par une dénaturation de 5 min à 95°C, suivie de 30 cycles décomposés comme suit : 1 min à 95°C, 45 sec à 55°C et 30 sec à 70°C.

Les échantillons sont ensuite chargés sur gel d'acrylamide 6% pour une migration à 40 W. Le gel est ensuite exposé sur un autoradiogramme.

5.2.4 Transfection

Des cellules Cos-7 ($5 \cdot 10^6$ cellules) sont cultivées dans du milieu DMEM (*Gibco BRL*) contenant 10% de FBS (*Sigma*). $4 \cdot 10^6$ cellules sont transfectées par électroporation à 200 V, 960 μ F, 200 Ω (*Gene Pulser, Biorad*) avec 20 μ g de plasmide pEYFP-M31.

5.2.5 Coloration DAPI

Les cellules sont fixées sur lames recouverte de PolyLysine-L (*Sigma*) par un traitement de 30 minutes dans une solution de formaldéhyde. Après lavage et déshydratation des lames, on réalise une coloration DAPI (*Sigma*).

5.3 Résultats

5.3.1 Stratégie de clonage

M31, homologue murin de la protéine d'hétérochromatine HP1, est capable de modifier l'expression d'un transgène soumis à un effet de positionnement (Festenstein *et al.*, 1999). Nous voulons donc vérifier si la surexpression de M31 peut modifier l'expression du transgène HS12GFP dans les cellules ES et au cours de la différenciation. Cependant une surexpression de protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle peut amener à des phénomènes de néoplasies. De plus, nous voulons vérifier l'effet d'une surexpression ponctuelle de M31, pour voir s'il y a maintien ou mémoire des modifications épigénétiques reliées à sa surexpression. Il nous a donc paru important de réaliser un surexpresseur inducible de M31. Toutes les étapes de clonage réalisées pour la construction de ce vecteur inducible sont illustrées à la figure 15.

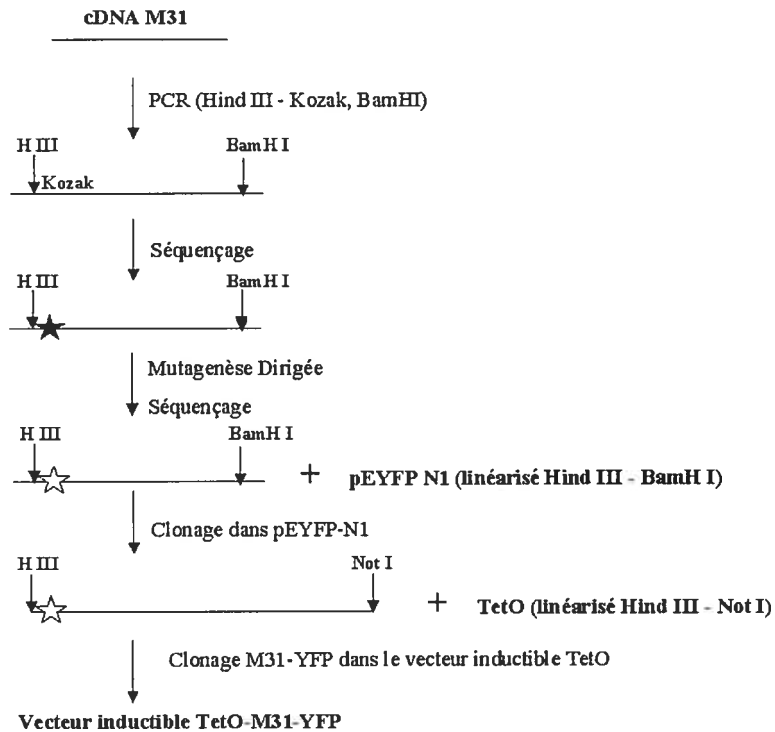


Figure 15 : Etapes de clonage réalisées pour la construction du vecteur inducible M31-YFP

Le cDNA de M31 a d'abord été modifié par PCR afin d'y introduire une séquence Kozak (séquence GCC ACC CGC ATG, Kozak *et al.*, 1987) pour améliorer l'expression dans les cellules de mammifères. Cette PCR permet également de modifier le cadre de lecture de la protéine, permettant d'obtenir une protéine de fusion avec YFP suite à une intégration dans le vecteur pEYFP-N1. Les amorces contiennent également des sites de restriction *Hind III* et *Bam HI*, permettant de faciliter les étapes de clonage subséquentes.

A la suite de cette PCR, nous avons voulu confirmer par séquençage que le cDNA de M31 n'était pas muté. Cependant, comme le montre la figure 16, nous avons trouvé 2 mutations ponctuelles dans la séquence du cDNA. La première mutation, au niveau du codon 6, remplaçait AAC (Asparagine) par ACC (Thréonine), tandis que la seconde était une mutation silencieuse au niveau du codon 3 (AAG au lieu de AAA). Afin de corriger la mutation de l'exon 6, nous avons réalisé la mutagenèse dirigée sur le plasmide contenant le cDNA de M31. Puis nous avons confirmé par séquençage la

correction de la mutation ponctuelle dans l'ADN des transformants obtenus. La figure 16 présente le résultat de séquençage avant et après la mutagenèse, et confirme que nous avons bien corrigé par cette procédure la mutation du cDNA de M31 au niveau de l'exon 6.

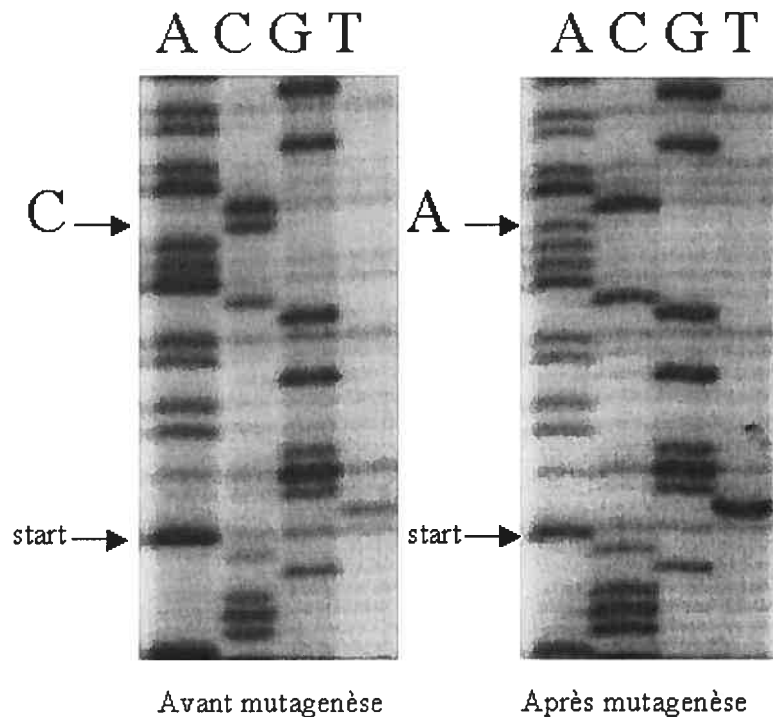


Figure 16 : Séquençage du cDNA de M31, avant et après fixation de la mutation de l'exon 3 par mutagenèse dirigée

Le système Tet (Gossen et Bujard, 1992) est un système composé de deux vecteurs permettant d'induire l'expression d'un gène cible. En présence de doxycycline, un analogue de la Tétracycline, la séquence RtTA (*Reverse trans-activator*) du plasmide régulateur se lie au plasmide réponse au niveau d'un promoteur minimal et active ainsi l'expression des gènes placés sous son contrôle. Alternativement, on peut utiliser un trans-activateur tTA qui se fixe au niveau du promoteur seulement en l'absence de doxycycline.

5.3.2 Distribution de la protéine de fusion M31-YFP

La protéine YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) est un variant de la protéine GFP obtenue à partir de l'organisme *Aequorea victoria*. Lorsqu'elle est excitée à une

longueur d'onde de 513 nm, elle émet une fluorescence à 527 nm. Son spectre d'émission est presque semblable à celui de la GFP, mais on peut cependant distinguer entre les deux variants GFP et YFP par FACS à l'aide d'un filtre (Lybarger *et al.*, 1998). C'est donc pourquoi nous avons choisi de coupler notre protéine M31 à la protéine YFP, tandis que le premier transgène impliqué dans notre étude est, lui, couplé à de la GFP.

La protéine YFP a une distribution cytoplasmique dans la cellule, alors que la protéine M31 a, quant à elle, une distribution nucléaire, et plus particulièrement péricentromérique (revu par Eissenberg et Elgin, 2000). Afin de vérifier si la protéine de fusion M31-YFP est fonctionnelle, nous avons voulu vérifier sa localisation cellulaire. Nous avons donc raisonné que puisque le rôle de M31 se jouait au niveau de l'établissement de structures d'hétérochromatine, si la protéine de fusion conservait une localisation péricentromérique ceci suggérerait fortement que la protéine de fusion est fonctionnelle.

Pour cela, nous avons transfecté des cellules Cos 7 avec le plasmide pEYFP-N1- M31, et sous microscope à fluorescence nous avons regardé la distribution de YFP. Nous avons également fixé ces cellules sur lame et réalisé des colorations DAPI. En effet, le DAPI colore spécifiquement le noyau des cellules, et une coloration intense au DAPI est spécifique des zones d'hétérochromatine.

Comme on le voit à la figure 17, lorsque la protéine YFP seule est introduite dans les cellules Cos 7, on observe une localisation de la protéine YFP dans toute la cellule, tandis que pour les cellules transfectées avec M31-YFP, seule la zone nucléaire montre des petits foci qui colocalisent avec les zones intenses de la coloration DAPI. Ceci suggère que notre protéine de fusion M31-YFP est fonctionnelle.

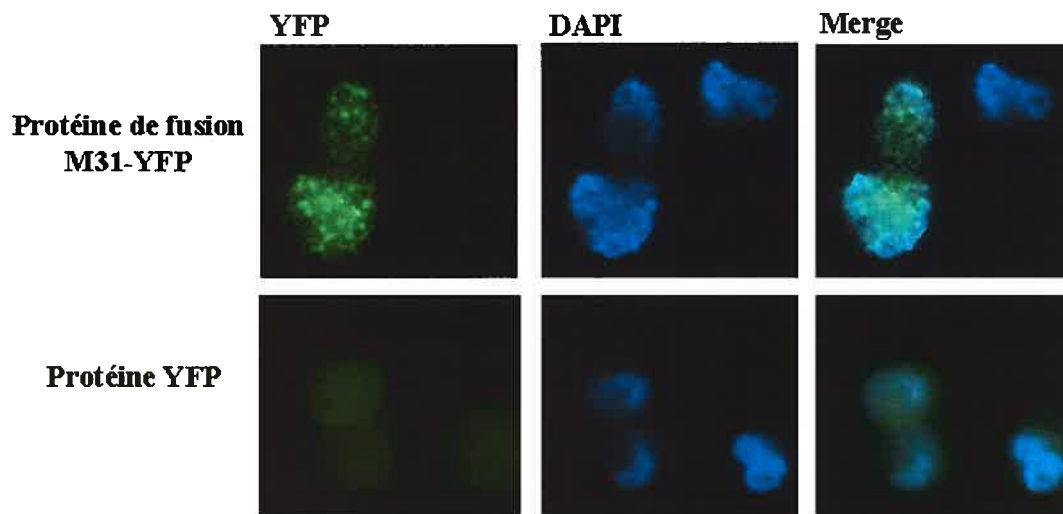


Figure 17 : Localisation cellulaire des protéines YFP et M31-YFP

La protéine YFP a une localisation cytoplasmique (panneau du bas), tandis que la protéine de fusion M31-YFP a une localisation nucléaire (panneau du haut), prédominante au niveau des zones d'hétérochromatine péricentromérique, caractérisée par une colocalisation avec les zones de coloration intense au DAPI.

5.4 Discussion

Nous avons donc à notre disposition un système inductible pour la surexpression de la protéine d'hétérochromatine M31. Le cDNA de M31 comportait une mutation ponctuelle au niveau de l'exon 6, mais cette mutation a pu être corrigée par mutagenèse dirigée. La séquence du cDNA de M31 a ensuite été vérifiée par séquençage.

Dans la construction réalisée, M31 forme une protéine de fusion avec le rapporteur YFP, ce qui nous permet de suivre la cinétique d'induction de notre protéine en fonction du temps et de la dose de doxycycline. Ceci est un bon outil qui va nous permettre de suivre la cinétique d'induction de M31, et est particulièrement intéressant dans le cas d'inductions ponctuelles. Aussi cela va nous permettre de vérifier la cinétique d'inactivation de la protéine suite au retrait de la doxycycline dans le milieu.

La fusion de protéines peut conduire à une mauvaise conformation de l'un des facteurs protéiques. En effet, il arrive lors de la réalisation de protéines de fusion que l'un des épitopes masque un domaine de la protéine d'intérêt, altérant ainsi sa fonction.

Nous avons donc vérifié que la fusion de la protéine YFP en portion C-terminale de la protéine M31 n'altère pas sa localisation cellulaire. La protéine M31-YFP a bien une localisation nucléaire, coïncidant avec les zones péri-centromériques, comme il est décrit dans la littérature. Ceci suggère donc que la protéine de fusion M31-YFP est fonctionnelle.

D'autres expériences sont cependant nécessaires pour confirmer la fonctionnalité de la protéine de fusion. Comme M31 est recrutée au niveau de sites méthylés sur la lysine 9 de l'histone H3, et qu'elle contribue à la formation de structures d'hétérochromatine, nous pourrions vérifier par immuno-précipitation de chromatine l'enrichissement en M31GFP au niveau de zones d'hétérochromatine, grâce à des anticorps pour GFP ou pour M31. On pourrait également envisager de réaliser un *Western blot* avec un anticorps spécifique pour GFP suite à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-H3K9.

Finalement, cette construction inductible est prête à être introduite dans les clones de cellules ES isolés afin d'y vérifier l'effet d'une surexpression de M31 sur l'expression du transgène β -globine-GFP, au stade de cellules ES, mais aussi au cours de la différenciation.

6 REFERENCES

Agalioti T, Chen G, Thanos D, *Deciphering the Transcriptional Histone Acetylation Code for a Human Gene*, *Cell*, Vol.11 pp 381-392, 2002

Akashi K, He X, Chen J, Iwasaki H, Niu C, Steenhard B, Zhang J, Haug J, Li L, *Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis*, *Blood*, Vol. 101 No 2 pp 383-389, 2003

Andrews NC, *The NF-E2 transcription factor*, *Int J Biochem Cell Biol*, Vol. 30 No 4 pp 429-432, 1998

Antoniou M, de Boer E, Spanopoulou E, Imam A, Grosveld F, *TBP binding and the rate of transcription initiation from the human beta-globin gene*, *Nucleic Acids Res*, Vol. 23 No 17 pp 3473-3480, 1995

Armstrong JA, Emerson BM, *NF-E2 disrupts chromatin structure at human β -globin locus control region HS 2 in vitro*, *Mol Cell Biol*, Vol. 16 No10 pp5634-5644, 1996

Armstrong JA, Bieker JJ, Emerson BM, *A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro*, *Cell*, Vol. 95 No 1 pp 93-104, 1998

Ashe HL, Monks J, Wijgerde M, Fraser P, Proudfoot NJ, *Intergenic transcription and transinduction of the human β -globin locus*, *Genes Dev*, Vol. 11 pp 2494-2509, 1997

Audet J, Zandstra PW, Eaves CJ, Piret JM, *Advances in hematopoietic stem cell culture*, *Curr Opin Biotechnol*, Vol. 9 No 2 pp 146-151, 1998

Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T, *Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain*, *Nature*, Vol. 410 No 6824 pp 120-124, 2001

Bender MA, Bulger M, Close J, Groudine M, *Beta-globin gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous beta-globin locus in mice do not require the locus control region*, *Mol Cell*, Vol. 5 No 2 pp 387-393, 2000

Berger SL, *An embarrassment of niches: the many covalent modifications of histones in transcriptional regulation*, *Oncogene*, Vol. 20 No 24 pp 3007-3013, 2001

Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Kouzarides T, Schreiber SL, *Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes*, *PNAS*, Vol. 99 No 13 pp 8695-8700, 2002

Bird A, *DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory*, *Genes Dev*, Vol. 16 pp 6-21, 2002

Bottardi S, Aumont A, Grosveld F, Milot E, *Developmental stage-specific epigenetic control of human beta-globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation*, *Blood*, Vol. 102 No 12 pp 3989-3997, 2003

Bresnick EH and Felsenfeld G, *Evidence that the transcription factor USF is a component of the human b-globin locus control region heteromeric protein complex*, *J Biol Chem*, Vol. 268, pp 18824–18834, 1993

Brown DT, *Histone H1 and the dynamic regulation of chromatin function*, *Biochem Cell Biol*, Vol. 81 No 3 pp 221-227, 2003

Bulger M, Groudine M, *Looping versus Linking : Towards a Model for long-distance gene Activation*, *Genes Dev*, Vol. 13, pp 2465-2477, 1999

Bulger M, Sawado T, Schubeler D, Groudine M, *ChIPs of the β -globin locus: unravelling gene regulation within an active domain*, *Curr Opin Gen Dev*, Vol.12 pp 1170-1177, 2002

Bungert J, Dave U, Lim KC, Kieuw KH, Shavit JA, Liu Q, Engel JD, *Synergistic Regulation of human β -globin Gene Switching By Locus Control Region Elements HS3 and HS4*, *Genes Dev*, Vol. 9 pp 3083-3096, 1995

Bungert J, Tanimoto K, Patel S, Lui Q, Fear M, Engel JD, *Hypersensitive Site 2 specifies a unique function within the human β -globin Locus Control Region to stimulate globin gene transcription*, *Mol Cell Biol*, Vol. 19 pp 3062-3072, 1999

Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB, *Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer*, *Nature Genetics*, Vol. 21 No 1 pp 103-107, 1999

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

Caterina JJ, Ciavatta DJ, Donze D, Behringer RR, Townes TM, *Multiple elements in human beta-globin locus control region 5' HS 2 are involved in enhancer activity and position-independent, transgene expression*, *Nucleic Acids Res*, Vol. 22 No 6 pp 1006-1011, 1994

Chen WY, Bailey EC, McCune SL, Dong JY, Townes TM, *Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase*, *PNAS*, Vol. 94 No 11 pp 5798-5803, 1997

Chen WY, Townes TM, *Molecular mechanism for silencing virally transduced genes involves histone deacetylation and chromatin condensation*, *PNAS*, Vol. 97 No 1 pp 377-382, 2000

Choi OR, Engel JD, *Developmental regulation of beta-globin gene switching*, *Cell*, Vol. 55 No 1 pp 17-26, 1988

Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G, *A common precursor for hematopoietic and endothelial cells, Development*, Vol. 125 No 4 pp 725-732, 1998

Collis P, Antoniou M, Grosveld F, *Definition of the Minimal Requirements within the human β -globin gene and the dominant Control Region for High Level Expression, EMBO*, Vol. 9 pp 233-240, 1990

Dillon N et Festenstein R, *Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility, Trends Genet*, Vol. 18 pp 252-258, 2002

Domen J and Weissman IL, *Self-renewal, Differentiation or Death : Regulation and Manipulation of Hematopoietic Stem Cell Fate, Molecular Medicine Today*, Vol. 5 pp 201-208, 1999

Donze D, Townes TM, Bieker JJ, *Role of erythroid Kruppel-like factor in human gamma- to beta-globin gene switching, J Biol Chem*, Vol. 270 No 4 pp 1955-1959, 1995

Dorer DR, Henikoff S, *Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in Drosophila, Cell*, Vol. 77 No 7 pp 993-1002, 1994

Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V and Elgin, SC, *Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in Drosophila melanogaster, PNAS*, Vol. 87 pp 9923-9927, 1990

Eissenberg JC, Morris GD, Reuter G, Hartnett T, *The heterochromatin-associated protein HP1 is an essential protein in Drosophila with dosage-dependent effects on position-effect variegation, Genetics*, Vol. 131 No 2 pp 345-352, 1992

Eissenberg JC, Elgin SC, *The HP1 protein family : getting a grip on chromatin*, *Curr Opin Genet Dev*, Vol. 10 No 2 pp 204-210, 2000

Eissenberg JC, *Molecular biology of the chromo domain : an ancient chromatin module comes of age*, *Gene*, Vol. 275 No 1 pp 19-29, 2001

Ellis J, Talbot D, Dillon N, Grosveld F, *Synthetic human beta-globin 5'HS2 constructs function as locus control regions only in multicopy transgene concatamers*, *EMBO*, Vol. 12 No 1 pp 127-134, 1993

Ellis J, Tan-Un 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*, Vol. 15 No 3 pp 562-568, 1996

Elnitski L, Miller W, Hardison R, *Conserved E-boxes function as part of the enhancer in Hypersensitive Site 2 of the β -globin Locus Control Region : Role of basic helix-loop-helix Proteins*, *J Biol Chem*, Vol. 272 pp 369-378, 1997

Engel JD, Tanimoto K, *Looping, linking, and chromatin activity : new insights into beta-globin locus regulation*, *Cell*, Vol. 100 No 5 pp 499-502, 2000

Farrell C, West A and Felsenfeld G, *Conserved CTCF insulator elements flank the mouse and human β -globin loci*, *Mol Cell Biol*, Vol. 22 pp 3820-3831, 2002

Felsenfeld G, Groudine M, *Controlling the double helix*, *Nature*, Vol. 421 pp 448-453, 2003

Festenstein R, *Heterochromatin Protein 1 modifies mammalian PEV in a dose- and chromosomal-context-dependant-manner*, *Nature Genetics*, Vol. 23, 1999

Fischle W, Wang Y, Allis CD, *Histone and chromatin cross-talk*, *Curr Opin Cell Biol*, Vol. 15 No 2 pp 172-183, 2003

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*, Vol. 4 No 10 pp 1637-1649, 1990

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*, *Nucleic Acids Res*, Vol. 18 No 12 pp 3503-3508, 1990

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*, Vol. 7 No 1 pp 106-113, 1993

Fujimoto, Tetsuhiro, Ogawa, Minetaro, Minegishi, Naoko, Yoshida, Hisahiro, Yokomizo, Tomomasa, Yamamoto, Masayuki & Nishikawa, Shin-ichi, *Step-wise divergence of primitive and definitive haematopoietic and endothelial cell lineages during embryonic stem cell differentiation*, *Genes to Cells*, Vol. 6 No 12 pp 1113-1127, 2001

Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T, *DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity*, *Nature Genetics*, Vol. 24 pp 88-91, 2000

Garrick D, Fiering S, Martin DI, Whitelaw E, *Repeat-induced gene silencing in mammals*, *Nature Genetics*, Vol. 18 No 1 pp 56-59, 1998

Gilbert N, Boyle S, Sutherland H, de Las Heras J, Allan J, Jenuwein T, Bickmore WA, *Formation of facultative heterochromatin in the absence of HPI*, *EMBO*, Vol. 22 No 20 pp 5540-5550, 2003

Goodwin AJ, McInerney JM, Glander MA, Pomerantz O, Lowrey CH, *In vivo* formation of a human beta-globin locus control region core element requires binding sites for multiple factors including GATA-1, NF-E2, erythroid Kruppel-like factor, and Sp1, *J Biol Chem*, Vol. 276 No 29 pp 26883-26892, 2001

Gossen M, Bujard H, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*, *PNAS*, Vol. 89 No 12 pp 5547-5551, 1992

Grewal SIS and Moazed D, *Heterochromatin and Epigenetic Control of Gene expression*, *Science*, Vol. 301 pp 798-802, 2003

Grosveld F, van Assendelft GB, Greaves DR, Kollias G, *Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice*, *Cell*, Vol. 51 No 6 pp 975-985, 1987

Grosveld F, *Activation by Locus Control Regions?*, *Current Opin Genet Dev*, Vol. 9 pp 152-157, 1999

Groudine M, Kohwi-Shigematsu T, Gelinis R, Stamatoyannopoulos G, Papayannopoulou T, *Human Fetal to Adult Hemoglobin switching : changes in chromatin structure of the human β -globin locus*, *PNAS*, Vol. 80 pp 7551-7555, 1983

Grunstein M, *Histone Acetylation in chromatin Structure and Transcription*, *Nature*, Vol. 389 pp 349-352, 1997

Hadjantonakis AK et Nagy A, *The color of mice : in the light of GFP-variant reporters*, *Histochem Cell Biol*, Vol. 115 pp 49-58, 2001

Hake SB, Xiao A, Allis CD, *Linking the Epigenetic Language of covalent histone modifications to cancer*, *British Journal of Cancer*, Vol. 90 pp 761-769, 2004

Hamaguchi I, Woods NB, Panagopoulos I, Andersson E, Mikkola H, Fahlman C, Zufferey R, Carlsson L, Trono D, Karlsson S, *Lentivirus vector gene expression in ES cell-derived hematopoietic development in vitro*, *J Virol*, Vol. 74 No 22 pp 10778-10784, 2000

Hannon G, *RNA interference*, *Nature*, Vol. 418 pp 244, 2002

Hanscombe O, Whyatt D, Fraser P, Yannoutsos N, Greaves D, Dillon N, Grosveld F, *Importance of globin gene order for correct developmental expression*, *Genes Dev*, Vol. 5 No 8 pp 1387-1394, 1991

Hardison R, Slightom JL, Gumucio DL, Goodman M, Stojanovic N, Miller W, *Locus control regions of mammalian beta-globin gene clusters : combining phylogenetic analyses and experimental results to gain functional insights*, *Gene*, Vol. 205 No 1-2 pp 73-94, 1997

Henikoff S, *Conspiracy of silence among repeated transgenes*, *Bioessays*, Vol. 20 No 7 pp 532-535, 1998

Hu M, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C, Enver T, *Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system*, *Genes Dev*, Vol. 11 No 6 pp 774-785, 1997

Hwang KK, Eissenberg JC and Worman HJ, *Transcriptional repression of euchromatic genes by Drosophila heterochromatin protein 1 and histone modifiers*, *PNAS*, Vol. 98 pp 11423–11427, 2001

Jackson DA, McDowell JC, Dean A, *β -globin Locus Control Region HS2 and HS3 interact structurally and functionally*, *Nucleic Acids Res*, Vol. 31 No 4 pp 1180-1190, 2003

James TC, Elgin SC, *Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in Drosophila melanogaster and its gene*, *Mol Cell Biol*, Vol. 6 No 11 pp 3862-3872, 1986

Jenuwein T, Allis CD, *Translating the histone code*, *Science*, Vol. 293 No 5532 pp 1074-1080, 2001

Jimenez G, Griffiths SD, Ford AM, Greaves MF, Enver T, *Activation of the β -globin Locus Control Region precedes Commitment to the Erythroid Lineage*, *PNAS*, Vol. 89 pp 10618-10622, 1992

Johnson KD, Norton JE, Bresnick EH, *Requirements for utilization of CREB binding protein by hypersensitive site two of the beta-globin locus control region*, *Nucleic Acids Res*, Vol. 30 No 7 pp 1522-1530, 2002

Johnson KD, Grass JA, Boyer ME, Kiekhäfer CM, Blobel GA, Weiss MJ, Bresnick EH, *Cooperative activities of hematopoietic regulators recruit RNA polymerase II to a tissue-specific chromatin domain*, *PNAS*, Vol. 99 No 18 pp 11760-11765, 2002

Kabrun N, Buhning HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G, *Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors*, *Development*, Vol. 124 No 10 pp 2039-2048, 1997

Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV, *Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture*, *Mol Cell Biol*, Vol.13 No 1 pp 473-486, 1993

Keller GM, *In vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells*, *Curr Opin Cell Biol*, Vol. 7 No 6 pp 862-869, 1995

Keller G, Lacaud G, Robertson S, *Development of the hematopoietic system in the mouse*, *Exp Hematol*, Vol. 27 No 5 pp 777-787, 1999

Kennedy M, Firpo M, Choi K, Wall C, Robertson S, Kabrun N, Keller G, *A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive hematopoiesis, Nature*, Vol. 386 No 6624 pp 488-493, 1997

Kioussis D, Vanin E, deLange T, Flavell RA, Grosveld FG, *Beta-globin gene inactivation by DNA translocation in gamma beta-thalassaemia, Nature*, Vol. 306 No 5944 pp 662-666, 1983

Kollias G, Hurst J, deBoer E, Grosveld F, *The human beta-globin gene contains a downstream developmental specific enhancer, Nucleic Acids Res*, Vol. 15 No 14 pp 5739-5747, 1987

Kondo M, Wagers Aj, Manz MG, Prohaska SS, Sherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA, Weissman IL, *Biology of Hematopoietic Stem Cells and Progenitors : implication for clinical application, Ann Rev Immunol*, Vol. 21 pp 759-806, 2003

Kontaraki J, Chen HH, Riggs A, Bonifer C, *Chromatin fine structure profiles for a developmentally regulated gene: reorganization of the lysozyme locus before transactivator binding and gene expression, Genes Dev*, Vol. 14 No 16 pp 2106-2122, 2000

Kozak M, *An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs, Nucleic Acids Res*, Vol. 15 No 20 pp 8125-8148, 1987

Kuhn R, Torres RM, *Cre/loxP Recombination System and Gene Targeting, Methods Mol Biol*, Vol. 180 pp 175-204, 2002

Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ, *HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors, Cell*, Vol. 109 No 1 pp 29-37, 2002

Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T, *Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins, Nature*, Vol. 410 No 6824 pp 116-120, 2001

Laker C, Meyer J, Schopen A, Friel J, Heberlein C, Ostertag W, Stocking C, *Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in Embryonal Stem cells during differentiation, J Virol*, Vol. 72 No 1 pp 339-348, 1998

Lavigne M, Francis NJ, King IF, Kingston RE, *Propagation of silencing; recruitment and repression of naive chromatin in trans by polycomb repressed chromatin, Mol Cell*, Vol. 13 No 3 pp 415-425, 2004

Lee JH, Hart SRL, Skalnik DG, *Histone Deacetylase Activity is required for Embryonic Stem Cell Differentiation, Genesis*, Vol. 38 pp 32-38, 2004

Li Q et Stamatoyannopoulos G, *Hypersensitive Site 5 of the human β Locus Control Region functions as a Chromatin Insulator, Blood*, Vol. 84 pp 1399-1401, 1994

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*, Vol. 3 No 7 pp 415-429, 1998

Li Q, Harju S, Peterson KR, *Locus Control Regions - coming of age at a decade plus, TIG*, Vol. 15 No 10 pp 403-408, 1999 (a)

Li Q, Zhang M, Duan Z, Stamatoyannopoulos G, *Structural analysis and mapping of DNase I hypersensitivity of HS5 of the beta-globin locus control region, Genomics*, Vol. 61 No 2 pp 183-193, 1999 (b)

Li Q, Peterson QR, Fang X, Stamatoyannopoulos G, *Locus Control Regions, Blood*, Vol. 100 No 9 pp 3077-3086, 2002 (a)

Li Q, Zhang M, Rohde A, Stamatoyannopoulos G, *Evidence that DNase I Hypersensitive Site 5 of the human β -globin Locus Control Region functions as a chromosomal insulator in transgenic mice*, *Nucleic Acids Research*, Vol. 30 No 11 pp 2484-2491, 2002 (b)

Li Y, Danzer JR, Alvarez P, Belmont AS, Wallrath LL, *Effects of tethering HP1 to euchromatic regions of the Drosophila genome*, *Development*, Vol. 130 No 9 pp 1817-1824, 2003

Lorincz MC, Schubeler D, Goeke SC, Walters M, Groudine M, Martin DI, *Dynamic analysis of proviral induction and De Novo methylation: implications for a histone deacetylase-independent, methylation density-dependent mechanism of transcriptional repression*, *Mol Cell Biol*, Vol. 20 No 3 pp 842-850, 2000

Lybarger L, Dempsey D, Patterson GH, Piston DW, Kain SR, Chervenak R, *Dual-color flow cytometric detection of fluorescent proteins using single-laser (488-nm) excitation*, *Cytometry*, Vol. 31 No 3 pp 147-52, 1998

Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF, Matzke AJ, *Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing*, *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1677 No 1-3 pp 129-141, 2004

McBurney MW, Lau S, Jardine K, Yang X, Davies B, *Reexpression of a cluster of silenced transgenes is associated with their rearrangement*, *Genes Chromosomes Cancer*, Vol. 32 No 4 pp 311-323, 2001

McInerney JM, Nawrocki JR, Lowrey CH, *Long-term silencing of retroviral vectors is resistant to reversal by trichostatin A and 5-azacytidine*, *Gene Ther*, Vol. 7 No 8 pp 653-663, 2000

McMorrow T, van den Wijngaard A, Wollenschlaeger A, van de Corput M, Monkhorst K, Trimborn T, Fraser P, van Lohuizen M, Jenuwein T, Djabali M,

Philipsen S, Grosveld F, Milot E, *Activation of the beta globin locus by transcription factors and chromatin modifiers*, *EMBO*, Vol. 19 No 18 pp 4986-4996, 2000

Mei Q, Kothary R, Wall L, *The tkNeo gene, but not the pgkPuro gene, can influence the ability of the β -globin LCR to enhance and confer position-independent expression onto the β -globin gene*, *Exp Cell Research*, Vol. 260 pp304-312, 2000

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*, Vol. 87 pp 105-114, 1996

Mikkola HK, Orkin SH, *The search for the hemangioblast*, *J Hematother Stem Cell Res*, Vol. 11 No 1 pp 9-17, 2002

Mikkola HK, Fujiwara Y, Schlaeger TM, Traver D, Orkin SH, *Expression of CD41 marks the initiation of definitive hematopoiesis in the mouse embryo*, *Blood*, Vol. 101 No 2 pp 508-516, 2003

Minc E, Allory Y, Worman HJ, Courvalin JC, Buendia B, *Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells*, *Chromosoma*, Vol. 108 No 4 pp 220-234, 1999

Minc E, Courvalin JC, Buendia B, *HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes*, *Cytogenet Cell Genet*, Vol. 90 No 3-4 pp 279-284, 2000

Mitjavila-Garcia MT, Cailleret M, Godin I, Nogueira MM, Cohen-Solal K, Schiavon V, Lecluse Y, Le Pesteur F, Lagrue AH, Vainchenker W, *Expression of CD41 on hematopoietic progenitors derived from embryonic hematopoietic cells*, *Development*, Vol. 129 No 8 pp 2003-2013, 2002

Moazed D, *Common Themes on Mechanisms of Gene Silencing, Molecular Cell*, Vol. 8 pp 489-498, 2001

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*, Vol. 21 pp 2969-2980, 2001

Momparler RL, *Cancer epigenetics, Oncogene*, Vol. 22 No 42 pp 6479-6483, 2003

Murphy CL, Polak JM, *Differentiating embryonic stem cells : GAPDH, but neither HPRT nor beta-tubulin is suitable as an internal standard for measuring RNA levels, Tissue Eng*, Vol. 8 No 4 pp 551-559, 2002

Mutskov V, Felsenfeld G, *Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9, EMBO*, Vol. 23 No 1 pp 138-149, 2004

Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W and Roder J, *Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells, PNAS*, Vol. 90 pp 8424-8428, 1993

Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI, *Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly, Science*, Vol. 292 No 5514 pp 110-113, 2001

Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE, *Cooperation between Complexes that Regulate Chromatin Structure and Transcription, Cell*, Vol. 108 pp 475-487, 2002

Navas PA, Peterson KR, Li Q, Skarpidi E, Rohde A, Shaw SE, Clegg CH, Asano H, Stamatoyannopoulos G, *Developmental specificity of the interaction between the locus control region and embryonic or fetal globin genes in transgenic mice with an HS3 core deletion, Mol Cell Biol*, Vol. 18 No 7 pp 4188-4196, 1998

Navas PA, Peterson KR, Li Q, McArthur M, Stamatoyannopoulos G, *The 5'HS4 Core Element of the human β -globin Locus Control Region is Required for High-level Globin Gene Expression in Definitive but not in Primitive Erythropoiesis*, *J. Mol. Biol.*, Vol. 312 pp 17-26, 2001

Navas PA, Li Q, Peterson KR, Swank RA, Rohde A, Roy J, Stamatoyannopoulos G, *Activation of the β -like globin genes in transgenic mice is dependent on the presence of the β -Locus Control Region*, *Human Molecular Genetics*, Vol. 11 pp 893-903, 2002

Nielsen AL, Ortiz JA, You J, Oulad-Abdelghani M, Khechumian R, Gansmuller A, Chambon P, Losson R, *Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family*, *EMBO*, Vol. 18 No 22 pp 6385-6395, 1999

Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R, *Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins*, *Mol Cell*, Vol. 7 No 4 pp 729-739, 2001

Nowak SJ et Corces VG, *Phosphorylation of Histone H3 : a Balancing Act between Chromosome Condensation and transcriptional Activation*, *Trends Genet*, Vol. 20 No 4 pp 214-220, 2004

Nuez et al. *Defective Hematopoiesis on Fetal Liver resulting from the Inactivation of the EKLf gene*, *Nature*, Vol. 375 No 6529 pp 316-318, 1995

Ohneda K, Yamamoto M, *Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage*, *Acta Haematol*, Vol. 108 No 4 pp 237-245, 2002

Orkin SH, Zon LI, *Genetics of erythropoiesis : induced mutations in mice and zebrafish*, *Annu Rev Genet*, Vol. 31 pp 33-60, 1997

Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G, *Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse*, *Development*, Vol. 126 No 22 pp 5073-5084, 1999

Palis J, Yoder MC, *Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man*, *Exp Hematol*, Vol. 29 No 8 pp 927-936, 2001

Pannell D, Ellis J, *Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors*, *Rev Med Virol*, Vol. 11 No 4 pp 205-217, 2001

Palstra RJ, Tolhuis B, Splinter E, Nijmeijer R, Grosveld F, de Laat W, *The β -globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation*, *Nature Genetics*, Vol. 35 No 2, 2003

Pannell D, Ellis J, *Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors*, *Rev Med Virol*, Vol. 11 No 4 pp 205-217, 2001.

Papayannopoulou T, Priestley GV, Rohde A, Peterson KR, Nakomoto B, *Hemopoietic lineage commitment decisions : in vivo evidence from a transgenic mouse model harbouring microLCR – betapro – LacZ as a transgene*, *Blood*, Vol. 95 No 4 pp 1274-1282, 2000

Pasceri P, Pannell D, Wu X, Ellis J, *Full activity from human beta-globin locus control region transgenes requires 5'HS1, distal beta-globin promoter, and 3' beta-globin sequences*, *Blood*, Vol. 92 No 2 pp 653-663, 1998

Perche PY, Robert-Nicoud M, Khochbin S, Vourc'h C, *Nucleosome differentiation: role of histone H2A variants*, *Med Sci*, Vol. 19 No 11 pp 1137-1145, 2003

Perlingeiro RC, Kyba M, Daley GQ, *Clonal analysis of differentiating embryonic stem cells reveals a hematopoietic progenitor with primitive erythroid and adult lymphoid-myeloid potential*, *Development*, Vol. 128 No 22 pp 4597-4604, 2001

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 locus control region on the developmental regulation of globin gene expression in beta-globin locus yeast artificial chromosome transgenic mice*, *PNAS*, Vol. 93 No 13 pp 6605-6609, 1996

Philipsen S, Talbot D, Fraser P, Grosveld F, *The β -globin Dominant Control Region : Hypersensitive site 2*, *EMBO*, Vol. 9 pp 2159-2167, 1990

Philipsen S, Pruzina S, Grosveld F, *The minimal requirements for activity in transgenic mice of Hypersensitive Site 3 of the β -globin Locus Control Region*, *EMBO*, Vol. 12 pp 1077-1085, 1993

Pikaart MJ, Recillas-Targa F, Felsenfeld G, *Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators*, *Genes Dev*, Vol. 12 No 18 pp 2852-62, 1998

Pomerantz O, Goodwin AJ, Joyce T, Lowrey CH, *Conserved elements containing NF-E2 and tandem GATA binding sites are required for erythroid-specific chromatin structure reorganization within the human beta-globin locus control region*, *Nucleic Acids Res*, Vol. 26 No 24 pp 5684-5691, 1998

Pruzina S, Hanscombe O, Whyatt D, Grosveld F, Philipsen S, *Hypersensitive Site 4 of the human β -globin Locus Control Region*, *Nucleic Acids Res*, Vol. 19 pp 1413-1419, 1991

Rakyan VK, Preis J, Morgan HD, Whitelaw E, *The Marks, Mechanisms and Memory of Epigenetic States in Mammals*, *Biochem J*, Vol. 356 pp 1-10, 2001

Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T, *Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases*, *Nature*, Vol. 406 No 6796 pp 593-599, 2000

Rebel VI, Miller CL, Thornbury GR, Dragowska WH, Eaves CJ, Lansdorp PM, *A comparison of long-term repopulating hematopoietic stem cells in fetal liver and adult bone marrow from the mouse, Exp Hematol*, Vol. 24 No 5 pp 638-648, 1996

Richards EJ et Elgin SCR, *Epigenetic Codes for Heterochromatin Formation and Silencing : Rounding up the Usual Suspects, Cell*, Vol. 108 pp 489-500, 2002

Robb L, Lyons I, Li R, Hartley L, Kontgen F, Harvey RP, Metcalf D, Begley CG, *Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene, PNAS*, Vol. 92 No 15 pp 7075-7079, 1995

Robertson S, Kennedy M, Keller G, *Hematopoietic commitment during embryogenesis, Ann N Y Acad Sci*, Vol. 87 pp 9-15, 1999

Robertson SM, Kennedy M, Shannon JM, Keller G, *A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor SCL/tal-1, Development*, Vol. 127 No 11 pp 2447-2459, 2000

Rubin JE, Pasceri P, Wu X, Leboulch P, Ellis J, *Locus Control Region activity by 5'HS3 requires a functional interaction with β -globin gene Regulatory Elements : Expression of novel β/γ -globin hybrid transgenes, Blood*, Vol. 95 No 10 pp 3242-3249, 2000

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, *Molecular cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY, 1989

Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T, *Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3, Nature*, Vol. 419 No 6905 pp 407-411, 2002

Shiio Y, Eisenman RN, *Histone sumoylation is associated with transcriptional repression, PNAS*, Vol. 100 No 23 pp 13225-13230, 2003

Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH, *Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL*, *Nature*, Vol. 373 No 6513 pp 432-434, 1995

Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T, *Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes*, *Nat Cell Biol*, Vol. 6 No 1 pp 73-77, 2004

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*, Vol. 14 No 1 pp 106-116, 1995

Strahl BD, Ohba R., Cook, R.G, and Allis, CD, *Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena*, *PNAS*, Vol. 96 pp 14967-14972, 1999

Strahl BD, Allis CD, *The language of covalent histone modifications*, *Nature*, Vol. 403 No 6765 pp 41-45, 2000

Strouboulis J, Dillon N, Grosveld F, *Developmental regulation of a complete 70-kb human beta-globin locus in transgenic mice*, *Genes Dev*, Vol. 6 No 10 pp 1857-1864, 1992

Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y, *Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3*, *J Biol Chem*, Vol. 276 No 27 pp 25309-25317, 2001

Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y, *G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis*, *Genes Dev*, Vol. 16 No 14 pp 1779-1791, 2002

Tagoh H, Melnik S, Lefevre P, Chong S, Riggs AD, Bonifer C, *Dynamic reorganization of chromatin structure and selective DNA demethylation prior to stable enhancer complex formation during differentiation of primary hematopoietic cells in vitro*, *Blood*, Vol. 103 No 8 pp 2950-2955, 2004

Talbot D, Philipsen S, Fraser P, Grosveld F, *Detailed Analysis of the Site 3 Region of the Human β -globin Dominant Control Region*, *EMBO*, Vol. 9 pp 2169-2178, 1990

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*, Vol. 10 No 6 pp 1391-1398, 1991

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*, Vol. 398 No 6725 pp 344-348, 1999

Tanimoto K, Sugiura A, Omori A, Felsenfeld G, Engel JD, Fukamizu A, *Human β -globin locus control region HS5 contains CTCF- and developmental stage-dependent enhancer-blocking activity in erythroid cells*, *Mol Cell Biol*, Vol. 23 No 24 pp 8946-8952, 2003

Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF, *Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code*, *Ann N Y Acad Sci*, Vol. 983 pp 84-100, 2003

Tolhuis B, Palstra RJ, Splinter E, Grosveld F, de Laat W, *Looping and Interaction between Hypersensitive Sites in the Active β -globin Locus*, *Mol Cell*, Vol. 10 pp 1453-1465, 2002

Trudel M, Costantini F, *A 3' enhancer contributes to the stage-specific expression of the human beta-globin gene*, *Genes Dev*, Vol. 1 No 9 pp 954-961, 1987

Tuan D, Abeliovich A, Lee-Oldham M, Lee D, *Identification of regulatory elements of human beta-like globin genes, Prog Clin Biol Res*, Vol. 251 pp 211-220, 1987

Tuan DY, Solomon WB, London IM, Lee DP, *An erythroid-specific, developmental-stage-independent enhancer far upstream of the human "beta-like globin" genes, PNAS*, Vol. 86 No 8 pp 2554-2558, 1989

Tuan D, Kong S, Hu K, *Transcription of the hypersensitive site HS2 enhancer in erythroid cells, PNAS*, Vol. 89 No 23 pp 11219-11223, 1992

Vermaak D, Ahmad K, Henikof S, *Maintenance of chromatin states : an open-and-shut case, Curr Opin Cell Biol*, Vol. 15 No 3 pp 266-274, 2003

Vogelauer M, Wu J, Suka N, Grunstein M, *Global histone acetylation and deacetylation in yeast, Nature*, Vol. 408 No 6811 pp 495-498, 2000

Wai AW, Gillemans N, Raguz-Bolognesi S, Pruzina S, Zafarana G, Meijer D, Philipsen S, Grosveld F, *HS5 of the human beta-globin locus control region: a developmental stage-specific border in erythroid cells, EMBO*, Vol. 22 No 17 pp 4489-4500, 2003

Wallrath LL, *Unfolding the mysteries of heterochromatin, Curr Opin Genet Dev*, Vol. 8 No 2 pp 147-153, 1998

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*, Vol. 406 No 6795 pp 519-524, 2000

Wiles MV, Keller G, *Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture, Development*, Vol. 111 No 2 pp 259-267, 1991

Wood SA, Allen ND, Rossant J, Auerbach A and Nagy A, *Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimeras*, *Nature*, Vol. 365 pp 87-89, 1993

Yao S, Osborne CS, Bharadwaj RR, Pasceri P, Sukonnik T, Pannell D, Recillas-Targa F, West AG, Ellis J, *Retrovirus silencer blocking by the cHS4 insulator is CTCF independent*, *Nucleic Acids Res*, Vol. 31 No 18 pp 5317-5323, 2003

Yao S, Sukonnik T, Kean T, Bharadwaj RR, Pasceri P, Ellis J, *Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications*, *Mol Ther*, Vol. 10 No 1 pp 27-36, 2004

Yoder MC, *Introduction: spatial origin of murine hematopoietic stem cells*, *Blood*, Vol. 98 No 1 pp 3-5, 2001

Zhang W, and JJ Bieker, *Acetylation and modulation of EKLF activity by interaction with histone acetyltransferases*, *PNAS*, Vol. 95 pp 9855-9860, 1998

Zhang Y, Reinberg D, *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*, *Genes Dev*, Vol. 15 No 18 pp 2343-2360, 2001

Zhang Y, *Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination*, *Genes Dev*, Vol. 17 No 22 pp 2733-2740, 2003

Zhu J et Emerson SG, *Hematopoietic Cytokines, Transcription Factors and Lineage Commitment*, *Oncogene*, Vol. 21 pp 3295-3313, 2002

